

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**М.Д.Мельничук, О.Л.Кляченко,
В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць**

**ПРОМИСЛОВА
БІОТЕХНОЛОГІЯ**

Київ-2014

УДК 663.078.7:691322/.58(075.8)

ББК 40.06.Я7

З 14

*Рекомендовано Міністерством освіти і науки України як навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів
Лист № 1/11-17916 від 11.11.2014*

Рецензенти:

Постоєнко В.О., доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник;

Григорюк І.П., доктор біологічних наук, професор;

Пасічник Л.А., доктор біологічних наук, старший науковий співробітник.

Автори-упорядники:

М.Д.Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць

Рекомендовано до друку рішенням вченої ради Національного університету біоресурсів і природокористування України (протокол № 4 від 19 грудня 2013 року)

Мельничук М.Д.

З 14 Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.

У навчальному посібнику 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 в лабораторних умовах, вивчення культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей мікроорганізмів-продуцентів промислово важливих речовин, дослідження особливостей росту мікроорганізмів в періодичній і безперервній культурі. Показано можливості і переваги використання на виробництві результатів практичного поєднання фундаментальних та прикладних досліджень у промисловій біотехнології.

Для наукових працівників, викладачів, аспірантів, студентів і магістрів біологічних й аграрних вузів, які спеціалізуються в галузі промислової біотехнології та мікробіології.

УДК 663.078.7:691322/.58(075.8)

ББК 40.06.Я7

©М.Д.Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць

© Навчально-науковий інститут рослинництва, екології і біотехнологій НУБіП України, 2014 р.

ЗМІСТ

Передмова.....	7
Перелік умовних скорочень.....	9
РОЗДІЛ 1. ОРГАНІЗАЦІЯ ДОСЛІДЖЕНЬ З ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ.....	10
1.1. Принципи організації та особливості роботи в лабораторії промислової біотехнології.....	10
1.2. Посуд, інструменти та матеріали.....	11
1.3. Правила роботи в лабораторії промислової біотехнології.....	12
1.4. Ведення лабораторного журналу	13
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ.....	15
2.1. Фізичні методи стерилізації.....	15
2.1.1. Термічні методи.....	15
2.1.2. Стерилізація опроміненням та газами.....	19
2.1.3. Метод фільтрування за допомогою мембранних фільтрів і фільтрів Зейтца.....	19
2.2. Хімічні методи стерилізації: дезінфекція антисептиками.....	21
Робота № 1. Методи стерилізації посуду та живильних середовищ.....	22
Робота № 2. Ефективність фізичних і хімічних методів стерилізації.....	24
2.3. Трофічні потреби мікроорганізмів.....	28
2.4. Живильні середовища.....	30
Робота № 3. Приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів – продуцентів.....	30
Робота № 4. Значення поживних елементів для росту <i>Aspergillus niger</i> . Культура цвілевих грибів на повному і неповному живильних середовищах.....	32
РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ.....	37
3.1. Особливості культивування мікроорганізмів.....	37
Робота № 5. Методи виділення накопичувальних культур мікроорганізмів...	39
Робота № 6. Методи виділення чистих культур мікроорганізмів.....	40
Робота № 7. Способи культивування аеробних та анаеробних мікроорганізмів.....	44
РОЗДІЛ 4. ТИПИ ФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ.....	49
4.1. Культивування мікроорганізмів у періодичній та безперервній культурі.....	49
Робота № 8. Фази росту культур-продуцентів і розрахунок кінетичних параметрів.....	52
Робота № 9. Моделі росту мікроорганізмів.....	55
Робота № 10. Вивчення кінетики росту дріжджів при глибинній ферментації.....	58
Робота № 11. Типи ферментаційних процесів.....	61
Робота № 12. Періодичне культивування мікроорганізмів та культивування з	

підживленням субстратів.....	62
Робота № 13.Проточні культури: хемостат, турбідостат.....	64
Робота № 14.Проведення процесу ферментації з лімітуванням субстрату....	67
РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ	71
Робота № 15. Виділення мікроорганізмів-антагоністів продуцентів біологічно-активних речовин з ґрунту.....	72
Робота № 16. Дослідження морфологічних особливостей промислово важливих штамів мікроорганізмів.....	75
Робота № 17. Визначення біохімічних властивостей <i>Bacillus subtilis</i>	78
Робота № 18. Ідентифікація мікроорганізмів за визначником бактерій Берджі.....	80
5.1. Ідентифікація мікроорганізмів-продуцентів із природних ценозів без виділення в чисті культури.....	83
5.1.1. Руйнування клітин, виділення і очищення ДНК.....	87
5.1.2. Ампліфікація фрагментів виділеної та очищеної ДНК за допомогою ПЛР.....	89
5.1.3. Денатуруючий градієнтний гель-електрофорез (ДГГЕ).....	91
Робота № 19. Аналіз ДГГЕ методом ПЛР ампліфікованих екстрактів ДНК мікроорганізмів.....	92
5.1.4. Виявлення і визначення мікроорганізмів FISH – методом.....	97
5.1.5. Застосування мікрочіпів в мікробіологічних дослідженнях.....	99
5.2. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотичних речовин.....	103
Робота № 20. Визначення антагоністичної активності штамів.....	104
5.3. Індукція мутацій у клітинах мікроорганізмів.....	106
Робота № 21. Індукція мутацій у клітинах бактерій нітритозогуанідіном.....	108
5.4. Способи відділення кінцевих продуктів і оцінка концентрації клітин.....	111
Робота № 22. Відділення продукту (клітинної маси) методом осадової фільтрації, методом мембранної фільтрації, методом центрифугування.....	116
5.5. Тривале зберігання і підтримання в активному стані промислових штамів мікроорганізмів-продуцентів.....	118
5.5.1. Періодичні пересіви на живильні середовища.....	119
5.5.2. Зберігання у ліофілізованому стані.....	119
5.5.3. Зберігання при низьких і наднизьких температурах.....	120
5.5.4. Зберігання у гліцеролі.....	121
5.5.5.Зберігання в дистильованій воді або 1%-му розчині хлориду натрію.....	122
РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ.....	123
6.1. Особливості молочнокислого бродіння.....	123
Робота № 23. Дослідження морфологічних особливостей молочнокислих бактерій.....	128
Робота № 24. Підготовка молочнокислих бактерій до ферментаційного	

процесу. Контроль якості заквасок.....	129
Робота № 25. Технологія заквашування живильної основи. Приготування заквасок методом накопичувальних культур.....	132
6.2. Кислотна коагуляція.....	135
Робота № 26. Виділення та дослідження властивостей казеїну.....	137
6.3. Сичужне згортання молока.....	138
Робота № 27. Механізм процесу сичужної коагуляції казеїну.....	141
Робота № 28. Визначення кількості молочної кислоти методом титрування....	142
РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ.....	146
7.1. Особливості використання культур дріжджів і молочнокислих бактерій у хлібопеченні.....	146
Робота № 29. Вивчення морфологічних і культуральних ознак дріжджів	149
Робота № 30. Визначення якості хлібопекарських дріжджів. Особливості підйомної сили дріжджів.....	150
Робота № 31. Дослідження вікових особливостей дріжджів.....	151
Робота № 32. Визначення активності молочнокислих бактерій.....	153
7.2. Біотехнологічні аспекти пивоваріння та виготовлення квасу.....	154
Робота № 33. Дослідження культур дріжджів, що використовуються в пивоварінні. Вивчення класичних технологій пивоваріння.....	155
Робота № 34. Приготування хлібного квасу з концентрату квасного суслу.....	159
РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ.....	162
8.1. Біотехнологія отримання мікробних ферментів.....	162
Робота № 35. Отримання екзоферментів бактерій роду <i>Pectobacterium</i>	166
Робота № 36. Визначення рівнів продукції β-каротину клітинами <i>Pantoea agglomerans</i>	168
Робота № 37. Імобілізація клітин <i>Pseudomonas fluorescens</i> у гелі альгінату кальцію. Визначення ефективності роботи каталази, оксидази і нітратредуктази у іммобілізованих клітин.....	169
Робота № 38. Вплив складу живильного середовища на накопичення амілази при твердофазному культивуванні мікроміцетів.....	171
Робота № 39. Визначення амілолітичної активності бактерій.....	175
Робота № 40. Визначення амілолітичної активності <i>Aspergillus oryzae</i>	175
8.2. Утворення лимонної кислоти <i>Aspergillus niger</i>	177
Робота № 41. Особливості утворення лимонної кислоти <i>Aspergillus niger</i> в різних умовах вирощування.....	179
8.3. Мікробіологічний синтез ціанкобаламіну (вітаміну B ₁₂).....	181
Робота № 42. Виробництво ціанкобаламіну (вітаміну B ₁₂) за допомогою пропіоновокислих бактерій.....	182

Робота № 43. Виробництво ціанкобаламіну (вітаміну В ₁₂) продуцентами <i>Pseudomonas denitrificans</i> та <i>Pseudomonas fluorescens</i>	184
РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ТА УПРАВЛІННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ ПРОЦЕСАМИ.	188
Робота № 44. Методи кількісного підрахунку мікроорганізмів.....	188
Робота № 45. Визначення біомаси мікроорганізмів ваговим методом.....	191
Робота № 46. Метод кількісного обліку мікроорганізмів висівом на щільні поживні середовища.....	193
Робота № 47. Стандарти мутності та їх застосування для підрахунку клітин.....	195
Робота № 48. Стандартизація та оцінка якості мікробіологічних препаратів шляхом визначення титру препаратів.....	196
Робота № 49. Визначення чутливості мікроорганізмів до різних концентрацій біопрепаратів методом паперових дисків.....	198
РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНІ ДОКУМЕНТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ.	201
10.1. Розробка технічних умов (ТУ У) на продукт.....	201
10.2. Розробка технологічного регламенту виробництва.....	202
Перелік найуживаніших стандартів, що використовуються у лабораторній практиці із промислової біотехнології.....	206
Словник ключових термінів	219
Додатки.....	233
Список рекомендованої літератури.....	252

ПЕРЕДМОВА

Промислова біотехнологія є однією з основних розділів загальної біотехнології, інтегральною галуззю науки і техніки, яка використовує теоретичні та методичні положення молекулярної біології і генетики, мікробіології, біохімії, фізіології і цитології, а також новітні хімічні технології.

Організація будь-якого мікробіологічного синтезу практично важливих речовин починається з вивчення фізіології продуцента. Необхідно вивчити характер живлення продуцента, а також вплив зовнішніх факторів на стан клітин і популяцій. Ці питання з'ясовуються шляхом оптимізації досліджуваного процесу. Основою для цього є культивування мікроорганізмів в контрольованих і керованих умовах. Зрештою встановлюють склад середовищ і режим культивування, найбільш прийнятні економічно, які надалі емпірично можливо вдосконалювати при веденні процесу в промисловому масштабі.

Наступним етапом є масштабування процесу та випробування його в промислових умовах. При цьому відбувається поступовий перехід від культивування мікроорганізмів в колбах (отримання посівного матеріалу) до вирощування в лабораторних ферментерах і потім - у промислових установках великого обсягу. На такому виробництві завжди функціонує мікробіологічна лабораторія, де підтримуються в культурі активні штами мікроорганізмів-продуцентів, здатні видозмінюватися в процесі виробництва і зберігання. Також контролюється відсутність сторонніх мікроорганізмів і бактеріофагів, створюють умови для підтримання високої активності продуцента, прослідковується розщеплення продуцентів на дисоціативні варіанти, проводять періодичні посіви, відбираються високопродуктивні колонії мікроорганізмів.

При підготовці навчального посібника автори виходили з досвіду роботи науковців і викладачів кафедри екобіотехнології та біорізноманіття ННІ рослинництва, екології і біотехнологій Національного університету біоресурсів і природокористування України (НУБіП України), де студенти слухають теоретичний курс й виконують практичні завдання з промислової біотехнології, навчаються за програмами підготовки бакалаврів. Основною метою лабораторних занять з дисципліни «Промислова біотехнологія» є поглиблення і закріплення набутих теоретичних знань і вмінь, отриманих під час вивчення теоретичного курсу та формування відповідних практичних навичок при дослідженні умов культивування промислових штамів-продуцентів та стадій біотехнологічних виробництв з урахуванням класичних та сучасних наукових підходів. Завдання лабораторних робіт полягає у виробленні у студентів навичок із загальних методів та принципів культивування мікроорганізмів, отримання накопичувальних культур бактерій та грибів, які використовують у біотехнологічних виробництвах, складанням типових схем та основних стадій біотехнологічних виробництв, методів

отримання первинних та вторинних метаболітів та окремих компонентів мікробних клітин, експериментального освоєння методів роботи з різними біотехнологічними об'єктами в умовах лабораторії та в дослідних господарствах.

Під час складання навчального посібника автори виходили з прийнятої в НУБіП України системи проведення практичних занять, в основі якої лежить самостійна робота студентів. Це дозволяє викладачу не розглядати весь матеріал, а лише перевірити готовність студентів до занять, уточнити найскладніші питання і закріпити практично засвоєння нової інформації.

Вищезгадані особливості обумовили побудову навчального посібника, що включає не лише системне описання методів і прийомів біотехнологічних робіт, але й викладення теоретичних основ деяких функціональних процесів. Це допоможе студентам свідомо і самостійно розібратись у поставлених завданнях. Окрім того, одночасно їм рекомендовано опрацювати підручник “Загальна біотехнологія” (Пирог Т.П., Ігнатова О.А., К.:НУХТ, 2009, 336 с.).

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДФ	—	аденозиндифосфат
АК	—	аспартаткіназа
АМФ	—	аденозинмонофосфат
АС	—	антранілатсинтетаза
АТФ	—	аденозинтрифосфат
БАР	—	біологічно-активні речовини
БВК	—	білково-вітамінний концентрат
БСК	—	біохімічне споживання кисню
ВАТ	—	відкрите акціонерне товариство
ДІВ	—	деіонізована вода
ДНК	—	дезоксирибонуклеїнова кислота
кДНК	—	синтезована дезоксирибонуклеїнова кислота, комплементарна мРНК
ЕПС	—	екзополісахариди
КоА	—	коензим А
КУО	—	колоніє утворююча одиниця
НАД	—	нікотинамідаденіндинуклеотид
НАДН	—	нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
НАДФ	—	нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
НАДФН	—	нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
НАД(Ф)	—	нікотинамідаденіндинуклеотид
ПАР	—	поверхнево-активні речовини
ПВК	—	піровиноградна кислота
РНК	—	рибонуклеїнова кислота
мРНК	—	матрична (інформаційна) рибонуклеїнова кислота
РР	—	редуючі речовини
СР	—	сухі речовини
УФ	—	ультрафіолет
ЦТК	—	цикл трикарбонних кислот
ЄБФ	—	Європейська біотехнологічна федерація
НЕРА	—	High Efficiency Particle Absorbption

**РОЗДІЛ 1
ОРГАНІЗАЦІЯ ДОСЛІДЖЕНЬ З ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ**

1.1. Принципи організації та особливості роботи в лабораторії промислової біотехнології.

Лабораторія промислової біотехнології повинна бути ізольована від інших підрозділів і включати такі приміщення:

1. Кімнату для миття посуду, оснащену раковинами із кислотостійкого матеріалу, дистильатором, стелажами для сушіння посуду.
2. Кімнату для приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів, забезпечену технічними, аналітичними вагами, рН-метром, бідистильатором, холодильними камерами, лабораторними столами, шафами для зберігання чистого посуду, складовими живильних середовищ.
3. Приміщення для стерилізації живильних середовищ, інструментів, посуду, оснащене горизонтальними чи вертикальними автоклавами класу “В”(наприклад, АВ – 75), сушильною шафою з режимом роботи 160-180°C (наприклад, ШСС – 80).
4. Стерильне асептичне приміщення (бокси, операційні кімнати) для ізолювання, отримання чистих, накопичувальних культур, для культивування штамів-продуцентів, забезпечену ламінар-боксами (камерами, у яких повітря проходить через бактерицидні фільтри). Стерилізують бокс за допомогою бактерицидних ламп типу ОБП – 300, БУФ – 15, БУФ – 30 або альтернативних іноземних марок.
5. Кімнату для зберігання чистих культур мікроорганізмів-продуцентів, оснащену термостатами та холодильними камерами з регульованими умовами.
6. Лабораторну кімнату з термостатом (прилад, який підтримує постійну задану температуру протягом значного інтервалу часу), мікроанаеростатом (прилад для вирощування анаеробних мікроорганізмів), фотоелектроколориметром, водяною банею, люміностантною камерою для вирощування фотоавтотрофних мікроорганізмів, електричними шейкерами (пристрої для культивування мікроорганізмів при постійному струшуванні («качалки»); центрифугами, мікроскопами з освітлювачами.
7. Робочі місця повинні бути обладнані газовими пальниками, штативами для бактеріальних петель та пробірок, дезінфікуючим розчином.

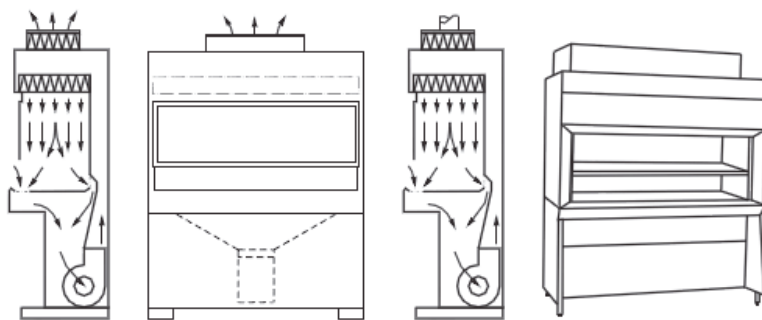


Рис.1. Ламінарний бокс

Конструкція ламінарного боксу дозволяє працювати в стерильних умовах з мікроорганізмами в нестерильному приміщенні.

Асептичні умови в ламінарі створюються за рахунок струменя стерильного повітря, забір якого відбувається з приміщення, і який стерилізується, проходячи через бактерицидні фільтри. Ламінарний рух повітря – рух, при якому хвилі повітря рухаються паралельно, обтікаючи перепони рівномірними шарами. Потік повітря, проходячи через ламінар, рухається до дослідника, що дозволяє звільнити внутрішній простір ламінарну від спор мікроорганізмів. Таким чином, посіви мікроорганізмів проводяться в потоці стерильного повітря, що пройшов через бактерицидні фільтри та розподілився всередині ламінарну у вигляді ламінарного потоку (без завихрень). Однак в ламінарі слід працювати біля полум'я спиртівки.

Інша назва ламінарного боксу – установка обезпилювання з горизонтальними або вертикальними потоками повітря (УО-БГ або УО-БВ, Ужгород або КПГ-1М; ШЛВ-1 або ШЛВ -2а-01в, м.Харків, «БіоАналітичні Технології»).

1.2. Посуд, інструменти та матеріали

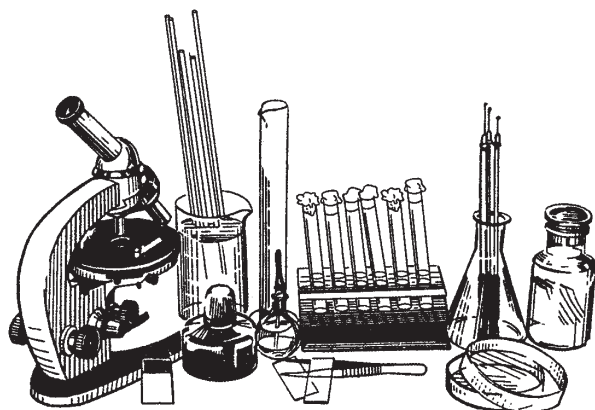


Рис. 2. Інвентар, необхідний для проведення лабораторних робіт

Лабораторія повинна бути укомплектована приладами й обладнанням, необхідним для роботи з різними групами мікроорганізмів з урахуванням особливостей їх біології, а також для проведення дослідів і виконання аналізів різних матеріалів (рис.2.).

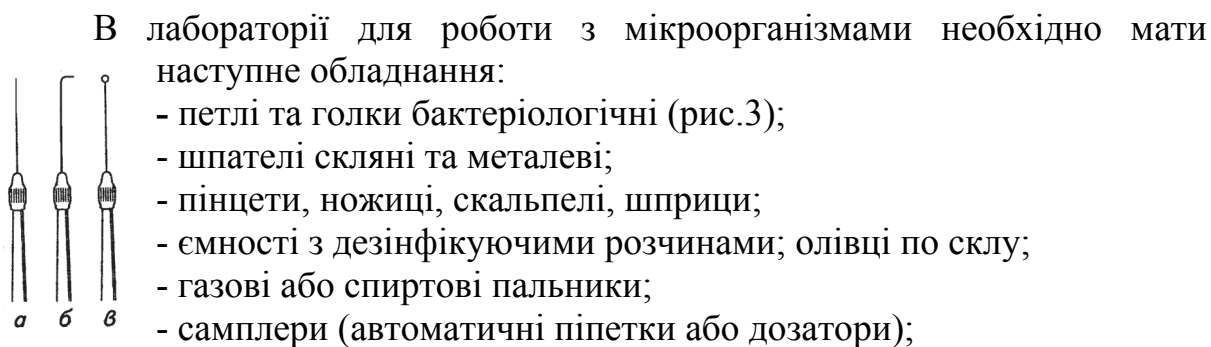


Рис.3. Бактеріологічні голка (а), гачок (б) та петля (в).

- набір стерильного посуду (чашки Петрі, пробірки, колби, мірні пляшки, піпетки градуйовані, скляні матраци тощо).
- набір фарб і реактивів для фарбування препаратів;
- пристрої для фарбування препаратів;
- скельця предметні та покривні; скельця з лунками;
- штативи для пробірок;
- негігроскопічна вата і марля з метою виготовлення ватно – марлевих пробок, ватних пробок для піпеток й скляних трубок, дезінфекції та стерилізації робочих поверхонь, інструментів, рук, для фільтрування середовищ
- прибори для фільтрування (фільтри Зейтца, бактеріальні фільтри різної конструкції тощо).

Якщо використовується одноразовий пластиковий мікробіологічний посуд (пробірки, піпетки, чашки Петрі), необхідно мати спеціальне обладнання для його дезінфекції та утилізації.

1.3. Правила роботи в лабораторії промислової біотехнології

Співробітники мікробіологічних лабораторій та студенти на лабораторних заняттях повинні пам'ятати, що вони працюють із культурами мікроорганізмів, які не завжди є нешкідливими для здоров'я людини. Тому, при роботі в лабораторії промислової лабораторії необхідно завжди дотримуватись правил безпеки:

1. До приміщення лабораторії заборонено заходити без спеціального одягу - халату.
2. Забороняється заносити до лабораторії сторонні речі.
3. Робоче місце мікробіолога повинно бути добре освітленим та зручним.
4. Працювати у лабораторії дозволяються лише у спецодязі (халаті) з прибраним волоссям.
5. Не дозволяється виходити за межі лабораторії в халатах або одягати верхній одяг на халат.
6. Двері лабораторії повинні бути постійно зачиненими.

7. У приміщенні лабораторії не дозволяється приймати їжу, не допускається зайвих розмов і непотрібних переходів. Працювати бажано сидячи.
8. При використанні біологічного матеріалу не дозволяється ставити посуд, який містить матеріал для дослідження, безпосередньо на стіл. Для цього використовуються підноси або кювети, посуд попередньо протирають ззовні дезінфікуючим розчином.
9. У випадках пошкодження посуду з мікробіологічним матеріалом або його витіканням слід негайно повідомити відповідальну особу і провести заходи для обеззараження забрудненого одягу, частин тіла, предметів робочого місця.
10. При роботі з мікробіологічним матеріалом необхідно використовувати загальноприйняті технічні прийоми, які виключають можливість контакту рук з мікробіологічним матеріалом.
11. Користуватися лише своїм робочим місцем і прикріпленим до нього обладнанням.
12. Всі посіви мають бути підписані.
13. Під час роботи підтримувати чистоту та порядок. Уникати зайвих рухів руками над відкритими чашками Петрі. Всі реактиви та барвники ставити на свої місця, не класти на столи пробки від пробірок, піпетки, бактеріологічні петлі.
14. Використані піпетки, предметні й покривні скельця, шпатель і т.д. поміщують у дезінфікуючий розчин. Пінцети, бактеріологічні петлі фламбують у полум'ї пальника і ставлять у штатив.
15. Усі використані матеріали (відпрацьовані пробірки з культурами мікроорганізмів, інфіковані матеріали) знешкоджують в автоклаві. Ця робота виконується співробітниками лабораторії.
16. Інструменти, які використовувалися в роботі, та поверхню робочого столу необхідно дезінфікувати.
17. Необхідно також пильно слідкувати за чистотою рук - по закінченні роботи руки дезінфікуються.
18. Після закінчення роботи поставити в термостат засіяні чашки й пробірки. Культури мікроорганізмів і залишки досліджуваного матеріалу необхідно здати викладачеві, а робоче місце привести в порядок і продезінфікувати.
19. Необхідно проводити вологе прибирання і періодичну дезінфекцію всіх робочих приміщень.

1.4. Ведення лабораторного журналу

Журнал лабораторних робіт є документом, що дозволяє контролювати правильність отриманих результатів, їх узагальнювати і аналізувати. Записи роблять ретельно і розбірливим почерком, у певному порядку:

РОЗДІЛ 1. ОРГАНІЗАЦІЯ ДОСЛІДЖЕНЬ З ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

- 1 – дата досліджень;
- 2 – об'єкт досліджень;
- 3 – мета досліджень;
- 4 – умови проведення досліджу;
- 5 – основні методи досліджень і аналізу;
- 6 – отримані результати (як правило, оформляють у вигляді таблиці, графіка, діаграми);
- 7 – аналіз отриманих результатів, оформлення висновків.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

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.

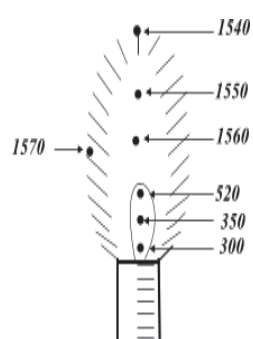
Стерилізація (від лат. *sterilis* – безплідний) – це повне знешкодження матеріалу від вегетативних клітин мікроорганізмів та їх форм спокою (спор, цист та ін.).

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.

2.1. Фізичні методи стерилізації

2.1.1. 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 (рис. 4).

Рис. 4. Значення температури ($^{\circ}\text{C}$) в різних 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 (табл. 1).

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

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

гумовими грушами, але зручніше використовувати спеціальні автоматичні піпетки з одноразовими змінними наконечниками.

Таблиця 1

Режими стерилізації

Температура	Час стерилізації, год.
170 ⁰ С	1,0
160 ⁰ С	2,0
150 ⁰ С	2,5
140 ⁰ С	3,0

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 обвуглюються при температурі понад 180⁰С.



в) стерилізація насиченою парою (вологим жаром) під тиском (автоклавування). Це найбільш надійний та поширений спосіб стерилізації. Проводять за допомогою спеціальних пристроїв – автоклавів (рис. 5), металевих резервуарів, що герметично закриваються і здатні витримувати високий тиск.

Рис. 5. Сучасний електричний автоклав марки HS-61.

Принцип дії автоклава заснований на зростанні температури кипіння води при підвищенні тиску (при тиску в 1 атм температура кипіння води 99,1⁰С, а при тиску в 2 атм - 119,6⁰С). При звичайному атмосферному тиску вода закипає при температурі 100⁰С. При підвищенні тиску на 1 ат (98,0665 кПа) понад звичайного, кип'ятіння і пароутворення починається, коли температура досягає 120-120,5⁰С. Пара, що утворюється при цих умовах, згубно діє на мікроорганізми протягом 30 хв. Пара при тиску, що перевищує звичайний на 2 атм (196,133 кПа), має температуру 134⁰С 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 121⁰С.*

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

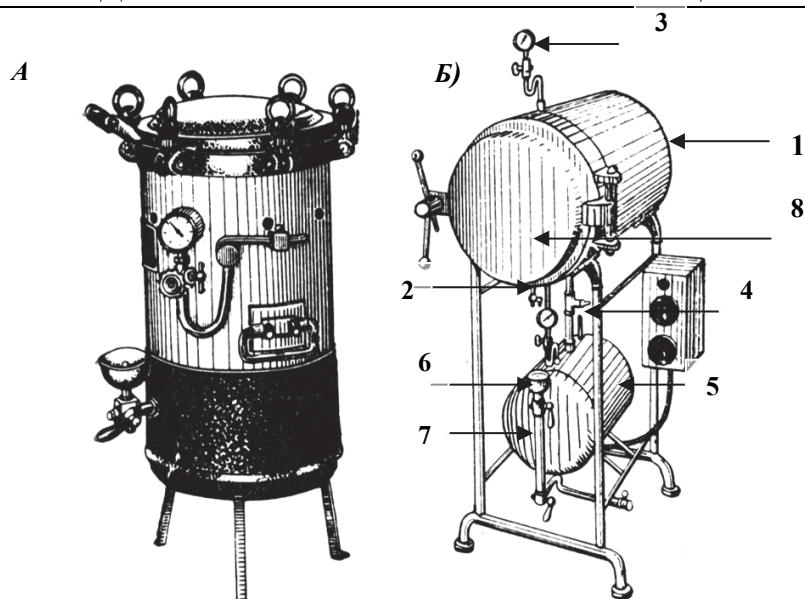


Рис. 6. Автоклави: А – вертикальний; Б – горизонтальний:

1 – стерилізаційна камера; 2 – кран для виходу повітря; 3 – манометр; 4 – запобіжний клапан; 5 – паровий котел; 6 – воронка для заповнення автоклава водою; 7 – водомірна трубка; 8 – кришка автоклава

Автоклави можуть бути різноманітні за формою, розмірами, робочим тиском, конструкцією, але всі вони виконують одну і ту ж функцію – стерилізацію, і принцип їх роботи – практично однаковий. У верхній двостінний металевий резервуар, який герметично закривається, складають матеріал, який підлягає стерилізації (рис.6). Нижній резервуар представляє собою котел, який заповнюється водою. Необхідний рівень води відмічено на спеціальній водомірній трубці автоклава. Верхній та нижній резервуари з'єднані між собою трубою, по якій піднімається пара при закипанні води у котлі. Пара збирається у верхньому резервуарі і, так як він герметично закритий, в ньому створюється надлишок тиску. Для того, щоб надлишковий тиск не перевищував дозволеної межі, верхній резервуар оснащено спеціальним паровивідним клапаном. 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. 2).

Температура й тривалість автоклавування визначаються матеріалом, який стерилізується. Живильні середовища, які містять молоко, желатин, пивне сусло, дріжджовий автолізат, вітаміни, цукри стерилізують при 0,5

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

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).

Таблиця 2

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

Принцип такої стерилізації полягає в тому, що середовище (чи його компоненти) прогривається без надлишкового тиску (при 100⁰ C) декілька раз, 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 60⁰C. Матеріал, який стерилізується, прогривають на водяних банях та апаратах Коха 5-6 раз, із перервою для переходу спорових форм мікроорганізмів у вегетативні.

д) Одноразове прогрівання матеріалу при температурі нижче 100⁰C направлене 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 60-75⁰ C протягом 15-30 хв. або при 80⁰ C – 10-15 хв. (у деяких випадках матеріал нагрівають до 90⁰ C) із наступним швидким охолодженням до температури нижче 10⁰ 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

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

стерилізацію кип'ятінням проводити в 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.

2.1.2. Стерилізація опроміненням та газами

При опроміненні найбільш пригніченими в клітині процесами є окисне фосфорилування, змінюються фізико-хімічні властивості нуклеопротеїдів, 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.

2.1.3. Метод фільтрування за допомогою мембранних фільтрів і фільтрів Зейтца

Стерилізація *фільтруванням* використовується для обробки живильних середовищ та розчинів, компоненти яких не витримують

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

нагрівання, зокрема, розчини білків, сировотки, деякі вітаміни, леткі сполуки. Метод полягає у пропусканні (фільтрації) розчинів через дрібнопористі фільтри (табл. 3).

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.

Таблиця 3

Характеристика мембранних фільтрів “Сінпор”

Позначення (№) фільтра	Діаметр пор, мкм	Варіації діаметра пор, \pm мкм
1	4,0	1,0
2	2,5	0,5
3	1,5	0,4
4	0,85	0,15
5	0,60	0,10
6	0,40	0,06
7	0,30	0,04
8	0,23	0,03
9	0,17	0,03
10	0,12	0,02

Фільтрування проводять за допомогою спеціальних приладів (фільтри Зейтца, свіча Шамберлана) (рис. 7). 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 самостійно, 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.

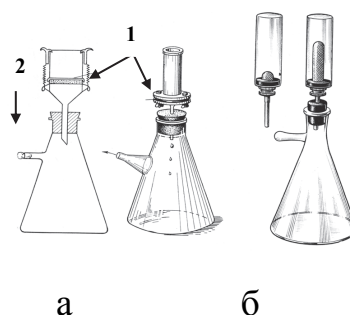


Рис. 7. Фільтри Зейтца із скляним (а) і металевим (б) тримачем та керамічний фільтр (в), з'єднані з колбою Бунзена:

1 – фільтри; 2 – вихід до вакуумного насоса

2.2. 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 (етилловий та ізопропіловий). Їх дезінфікуючі властивості зростають прямо пропорційно концентрації, від 50^0 до 70^0 . При більш високих концентраціях їх бактерицидна дія різко знижується. Спирти не здійснюють летального впливу на спори бактерій і мають повільний дезінфікуючий ефект (декілька хвилин).
- в. Цидні гази. Формальдегід – максимальний стерилізаційний ефект досягається при вологості повітря 70% і температурі 22^0 С. При більш низькій температурі він втрачає свій дезінфікуючий ефект. Оксидом етилену обробляють термолабільні середовища та пластмасовий посуд. Оксид етилену летка сполука і виділяється з обробленого матеріалу при температурі 37^0 С.
- 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;

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

- 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.

Робота № 1. Методи стерилізації посуду та живильних середовищ

Стерилізація скляного посуду та інструментів.

Скляний посуд, вимитий, висушений і загорнутий в папір, стерилізують, в основному, гарячим повітрям у сушильних шафах при температурі 165-170°C протягом 2 год. Посуд можна стерилізувати і в автоклаві. Посуд розгортають безпосередньо перед використанням. Кожну піпетку загортають окремо в довгі смужки паперу шириною 4-5 см. Попередньо вставляють ватні кульки у кінці піпеток. Обмотування починають з протилежного кінця поступовим рухом паперу по спіралі. Папір повинна щільно охоплювати піпетку. Загорнуті піпетки загортають по кілька штук разом або поміщають в спеціальні металеві або картонні пенали. Шпателі обгортають окремо аналогічно піпеткам, використовуючи для обмотування смужки паперу більшої ширини.

Чашки Петрі загортають разом по 2-4 штуки. Колби, пробірки та інший посуд з середовищем закривають ватними корками, а зверху папером.

Дрібні металеві лабораторні предмети (пінцети, бактеріологічні петлі та ін.) під час роботи можна стерилізувати пропалюванням у полум'ї пальника (фламбування) безпосередньо перед використанням. На полум'ї також короткочасно обпалюють горлечка колб, пробірок, пляшок, ватні пробки при пересіві культур і розливі середовищ. У полум'ї спиртівки гинуть клітини і спори мікроорганізмів. Відпрацьовані піпетки з культурою опускають у дезінфікуючі розчини (наприклад, в 5%-ний розчин фенолу).

Мета роботи. Ознайомитися з організацією та обладнанням лабораторії промислової біотехнології, вимогами до стерилізації та дезінфекції. Навчитися готувати посуд, обладнання, поживні середовища до стерилізації та обирати необхідний метод стерилізації. Оволодіти технікою стерилізації.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

Матеріали та обладнання: термостат; сушильна шафа; піпетки об'ємом 1 мл, 2 мл та 5 мл (по дві на кожного студента), піпетки об'ємом 1 мл, 2 мл та 5 мл (по дві на кожного студента), чашки Петрі (по дві на кожного студента), колби різних розмірів, скляні палички (по дві на кожного студента), бактеріологічні пробірки (по дві на кожного студента), металеві пінцети, бинти або марля, вата гігроскопічна, папір, нитки, сірники, ножиці.

Хід роботи:

М'ясо-пептонний бульйон (МПБ) розлити у 12 стерильних пробірок. Чотири пробірки кип'ятити 30 хв. Інші чотири – простерилізувати в автоклаві 15 хв. при 1 атмосфері. Останні чотири пробірки залишити без обробки. Після цього всі пробірки помістити у термостат при температурі 28–30⁰С і спостерігати за ними протягом 4–5 діб, відмічаючи зміни, які відбуваються в пробірках.

Результати досліджень свідчать, що тільки після автоклавування живильне середовище надовго залишається стерильним. При інших методах обробки у пробірках спостерігається утворення плівок та каламуті внаслідок розмноження бактерій.

Оформлення результатів роботи.

1. Підготувати стерильний посуд до наступних занять.
2. Провести оцінку якості стерилізації живильного середовища в залежності від методів стерилізації, оформити у вигляді наступної таблиці

Таблиця 4

Оцінка ефективності стерилізації поживного середовища в залежності від методів стерилізації

Тип стерилізації	Наявність мікробного росту
<i>Автоклавування (1 атм., 15 хв.)</i>	
<i>Кип'ятіння (30 хв.)</i>	
<i>Контроль (без обробки)</i>	

Контрольні питання:

1. Які кімнати повинна містити лабораторія промислової біотехнології?
2. Які методи стерилізації ви знаєте?
3. Які режими використовують при стерилізації в автоклаві?
4. Яка будова автоклава?
5. У чому полягає суть хімічних методів стерилізації?
6. Що таке стерилізація, дезінфекція, пастеризація? Чим вони відрізняються між собою?

Робота № 2. Ефективність фізичних і хімічних методів стерилізації

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.

Під *стерилізацією* розуміють повне очищення будь-якого матеріального потоку, а також обладнання та комунікацій від життєздатних мікроорганізмів, їх спор.

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.

Цидна 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.

Мета роботи: вивчення ефективності режимів стерилізації фізичними і хімічними методами. Об'єктами для обробки є суспензія декількох видів мікроорганізмів: бактерій, дріжджів, спори мікроміцетів, які піддаються впливу термічної обробки, опроміненню УФ - променями і впливу оцтової кислоти.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

Хід роботи:

Для вивчення впливу величини температури на загибель мікроорганізмів:

1. Три пробірки з 10 мл вихідної суспензії поміщають по черзі на 15 хв. в автоклав і стерилізують, відповідно, при 0,5 атм (112 °С), при 1 атм (121°С) і при 1, 5 атм (127°С).

2. Після стерилізації з дотриманням умов асептики стерильною піпеткою на 1 мл по одній краплі обробленої суспензії вносять на поверхню агаризованого середовища СА і МПА в чашки Петрі і шпателем рівномірно розподіляють по поверхні. Чашки підписують, перевертають і поміщають у термостат на 1-2 доби при 37 °С.

3. Слід визначити кількість клітин у вихідній суспензії. Для цього з пробірки з вихідною суспензією береться 1 мл і вноситься в пробірку з 9 мл стерильної води, потім 1 мл розведеної суспензії розбавляється в 100 і 1000 разів. З цих пробірок по 1 краплі вносять суспензію на чашки Петрі з СА і МПА, розтирають шпателем, підписують і відправляють в термостат.

Для вивчення кінетики загибелі клітин одну пробірку з вихідною суспензією, поміщають на водяну баню і через кожні 15 хв. протягом години відбирають стерильною піпеткою (щоразу новою) краплю суспензії та вносять на агаризовані пластинки з СА і МПА в чашки Петрі. Розтирають краплю шпателем по поверхні середовища. Чашки підписують, перевертають і поміщають в термостат.

Для вивчення впливу дози опромінення з пробірок з вихідними суспензіями мікроорганізмів, стерильною піпеткою на поверхні чотирьох чашок з МПА і чотирьох чашок з СА вносять з дотриманням правил асептики по одній краплі суспензії. Розподіляють шпателем по поверхні.

Встановлюють вісім чашок під бактерицидною лампою на відстані 40 см. Через 10 хв. виймають перші дві чашки, наступні попарно з інтервалом 10 хв. Підписують, перевертають і встановлюють чашки Петрі в термостат.

Для вивчення впливу концентрації органічних кислот на мікроорганізми:

1. Використовують чотири пробірки з вихідною суспензією, в кожную з яких вносять крижану оцтову кислоту за схемою.

Схема внесення реагенту

Номер пробірки	1	2	3	4
Об'єм суспензії, мл	10	10	10	10
Кількість льодяної оцтової кислоти, мл	0,01	0,02	0,03	0,04

2. Обережно збовтують вміст пробірок і залишають на 15 хв. Потім з кожної пробірки стерильними піпетками відбирають по одній краплі обробленої суспензії та наносять на агаризоване

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

середовище СА і МПА. Розподіляють краплю по всій поверхні пластинки середовища шпателем. Чашки підписують, перевертають і поміщають в термостат.

Результати дії стерилізуючих факторів оцінюють за числом колоній на поверхні агаризованого середовища, шляхом прямого підрахунку. Для полегшення підрахунку пластинку з боку дна чашки ділять на сектори і рахують колонії по секторах. Отримані дані заносять у таблиці (табл. 5). Для наочності результати можливо оформити у вигляді діаграми (рис.8).

Таблиця 5

Результати обліку кількості життєздатних організмів після обробки вихідної суспензії методом _____ за умов _____ (назва методу стерилізації)

Поживне середовище	Бактерії		Дріжджі		Мікоміцети	
	кількість колоній, шт.	титр клітин, кл/мл	кількість колоній, шт.	титр клітин, кл/мл	кількість колоній, шт.	титр клітин, кл/мл
Сусло-агар						
М'ясо-пептонний агар						

Розрахувати для кожного режиму величину критерію стерилізації Δ як натуральний логарифм відношення життєздатних клітин після обробки до вихідної кількості клітин і побудувати графік залежності: $\Delta = f(t \text{ } ^\circ\text{C})$, $\Delta = f(\tau, \text{ хв.})$, $\Delta = f(C_{\text{асептика}}, \%)$.

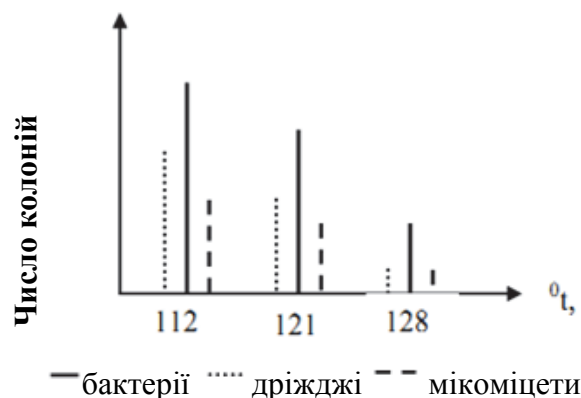


Рис. 8. Кількість колоній життєздатних клітин після автоклавування

За отриманими результатами зробити розгорнутий висновок, який має містити короткий виклад характеру впливу стерилізуючого фактору, механізм його дії на клітини мікроорганізмів, умови ефективного впливу фактора, область використання в харчовій біотехнології цього чинника.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

Форма звіту з роботи 2

1. Назва лабораторної роботи.
2. Мета роботи.
3. Визначення термінів «асептичні умови», «стерилізація», «пастеризація».
4. Вказати у вигляді схеми групи процесів, що забезпечують асептичні умови.
5. Вказати послідовність операцій для виконання першого заняття.
6. Вказати дії при виконанні другого заняття.
7. Оформити таблицю 5.
8. Побудувати діаграми.
9. Заповнити зведену таблицю 6.

Таблиця 6

Титр клітин, кл/мл	Бактерії		Дріжджі		Мікоміцети	
	СА	МПА	СА	МПА	СА	МПА
Вихідного матеріалу						
Після автоклавування 15 хв.						
0,5 атм (112°C)						
1 атм (121°C)						
1,5 атм (128 °C)						
Після кип'ятіння при 100°C						
10 хв.						
20 хв.						
30 хв.						
40 хв.						
Після опромінення УФ променями, потужністю 13 Вт						
15 хв.						
30 хв.						
45 хв.						
60 хв.						
Після обробки оцтовою кислотою						
1 крапля						
2 краплі						
3 краплі						
4 краплі						

Контрольні питання:

1. Що розуміють під асептичними умовами?
2. Які фактори зовнішнього середовища можуть здійснювати бактерицидну дію?
3. Від яких параметрів залежить інтенсивність згубного впливу?
4. Які причини загибелі клітин мікроорганізмів при дії високих температур, випромінювання, хімічних сполук?
5. Чим відрізняється пастеризація від стерилізації?

6. Які хімічні речовини використовують для забезпечення асептичних умов?

2.3. Трофічні потреби мікроорганізмів

Дослідження фізіологічної і біохімічної мінливості клітин мікроорганізмів-продуцентів відкриває можливості для управління мікробним біосинтезом, змін метаболізму в бажану сторону. 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). Живильні 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.

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.

У конструктивному метаболізмі головна роль належить вуглецю, оскільки всі сполуки, з яких побудовані живі організми – це вуглецеві

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

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 CO₂, неорганічний N та H₂O). 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.

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 окисненій 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.

2.4. Живильні середовища

В лабораторних умовах мікроорганізми вирощують на живильних середовищах, які повинні відповідати певним вимогам: бути поживними, тобто вони повинні задовольняти всі необхідні харчові потреби мікроорганізмів; містити необхідні поживні речовини у легкозасвоюваній формі (азотисті, вуглеводневі, мінеральні речовини, вітаміни); містити необхідну кількість води; мати певні в'язкість, окисно-відновний потенціал E_h , значення рН; бути ізотонічними по відношенню до мікробної клітини; володіти буферними властивостями; бути стерильними і прозорими.

Робота № 3. Приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів - продуцентів

Мета роботи. Приготувати живильні середовища для культивування штамів мікроорганізмів-продуцентів з різноманітними трофічними потребами.

Матеріали та обладнання:

NaCl, NaNO₃, KH₂PO₄, KCl, MgSO₄, FeSO₄, K₂SO₄, CaCO₃, сахароза, сухий порошок МПА, агар-агар, пептон, 10% HCl, 30% NaOH, вода дистильована, вода водопровідна, індикаторний папір, технічні та торсійні ваги; вата, марля, фільтрувальний папір, скляні палички, великі лійки – 2 шт., термостійкі стакани на 1 л – 2 шт., мірні циліндри на 0,5 л – 2 шт., стерильний посуд для розливу середовищ, рН-метр.

Практичне завдання:

1. Ознайомитися з інгредієнтами, що використовуються для поживних середовищ, ростом мікроорганізмів на поживних середовищах (основних, диференційно-діагностичних, синтетичних), сухими живильними середовищами, освоїти методи посіву та вирощування бактерій та грибів в рідкому і щільному живильному середовищі.
2. Приготувати живильні середовища для культивування штамів-продуцентів:
 - пептонну воду – 100 мл;
 - м'ясо-пептонний агар (МПА) – 500 мл;
 - середовище Чапека – 200 мл;
 - середовище Ешбі – 200 мл;
 - картопляно-глюкозний агар (КГА) – 200 мл (див. додаток).

Хід роботи:

1. Ознайомтесь з живильними середовищами. Складіть таблицю класифікації поживних середовищ за їх складом, консистенцією і призначенням.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

2. Для приготування **м'ясо-пептонного агару (МПА)** використовують виготовлену промисловим способом суміш, що містить усі компоненти і характеризується стандартністю, стабільністю та простотою приготування. До його складу входять, г/л:

- *гідролізат м'яса або риби* – 17,9;
- *пептон* – 10,0;
- *NaCl* – 5,0;
- *агар-агар* – 20,0.

Указану в інструкції кількість сухого порошку слід розмішати в колбі з 1000 мл холодної дистильованої води. Перевірити рН за допомогою індикаторного паперу й за необхідності довести його до 7,2–7,4 розчином NaOH. Потім, при постійному перемішуванні, довести розчин до кипіння та до повного розчинення інгредієнтів.

Отримане середовище профільтрувати в гарячому вигляді через ватно-марлевий фільтр. Стерилізувати при 121°C (при 1 атм в автоклаві) протягом 15–20 хв.

3. Для приготування **пептонної води** до дистильованої води необхідно додати 1% пептону та 0,5% NaCl або розчинити в дистильованій воді стандартну суміш, виготовлену промисловим способом. Встановити значення рН на рівні 7,2–7,4 розчином NaOH. У разі застосування стандартного середовища, суміш прокип'ятити упродовж 3 хв. Потім розчин профільтрувати через паперовий фільтр і простерилізувати при 121°C (при 1 атм в автоклаві) упродовж 30 хв.

4. Для приготування **картопляного агару** 200 г картоплі (добре помитої та очищеної) подрібнити, залити 1 л водогінної води, кип'ятити 15 хв. Відвар профільтрувати через ватно-марлевий фільтр, довести об'єм водогінною водою до початкового рівня, додати 0,2% NaCl та 2% агар-агар. Нагріти, постійно перемішуючи, до повного розплавлення агару, за необхідності знову профільтрувати. Установити значення рН на рівні 7,0. Середовище простерилізувати при 121°C (при 1 атм в автоклаві) упродовж 30 хв.

5. Для приготування синтетичного середовища Чапека в 1 л дистильованої води розчинити солі, виміряти рН, за необхідності довести значення рН до рівня 5,0–6,0, додати агар-агар, витримати протягом 15–20 хв. для його набухання і одержане середовище довести до кипіння при постійному перемішуванні. Профільтрувати гарячим через ватно-марлевий фільтр, додати CaCO₃ (крейду) за прописом та розлити у флакони для стерилізації. Середовище простерилізувати при 116,5°C (при 0,75 атм в автоклаві) 10 хв.

Компоненти середовища, г/л:

- *NaNO₃* – 2,0
- *KH₂PO₄* – 1,0
- *KCl* – 0,5
- *MgSO₄ × 7H₂O* – 0,5

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

- $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,01
- сахароза або глюкоза – 0,03
- $CaCO_3$ – 3,0
- агар-агар – 20,0.

6. Уважно розгляньте характер росту різних бактерій на рідких, напіврідких і щільних поживних середовищах, використовуючи готові демонстраційні посіви.

7. Опишіть і замалюйте ріст бактерій на різних поживних середовищах.

8. Зробіть посів бактерій на рідких, напіврідких і щільних поживних середовищах.

Контрольні питання:

1. Назвіть макро- та мікроелементи, які повинно містити живильне середовище.
2. Що таке фактори росту та за яких умов їх додають у живильне середовище?
3. На які групи поділяють мікроорганізми в залежності від джерела вуглецю?
4. Що являє собою агар-агар та які його фізичні характеристики?
5. Чому желатин має обмежене використання для ущільнення живильних середовищ?
6. Яким вимогам повинні відповідати живильні середовища?
7. Як класифікують живильні середовища в залежності від походження, призначення та консистенції?

Робота № 4. Значення живильних елементів для росту *Aspergillus niger*. Культура цвілевих грибів на повному і неповному живильних середовищах

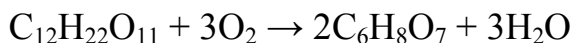
Для вивчення особливостей живлення мікроорганізмів зручним модельним об'єктом є *Aspergillus niger*, який легко отримати і використовувати в постановці різних експериментів, у тому числі для визначення значення окремих мінеральних елементів для росту (рис.9).

Умови культивування. Пліснявий гриб *A. niger* добре засвоює глюкозу, фруктозу, сахарозу, погано - галактозу, лактозу. Найбільша кількість ЛК (лимонної кислоти) утворюється при зброджуванні середовищ, що містять сахарозу. Оптимальна концентрація цукру в середовищі складає 10-15%.

Бурякова меляса, використовувана у виробництві ЛК, містить 70-82% сухих речовин (42-49% сахарози) і має рН в діапазоні 6-9. Меляса, одержувана при переробці тростинного цукру-сирцю, містить близько 80% сухих речовин, в тому числі близько 44% зброджується цукрів, рН =6,5.

Процес утворення ЛК при ферментації цукру може бути представлений наступним рівнянням:

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ



Як джерело азоту, як правило, використовуються амонійні солі: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl і NH_4NO_3 .

Масова частка азоту в середовищі повинна знаходитися в межах 0,1-0,2 мас. %.

Найбільш ефективними джерелами фосфору є KH_2PO_4 і K_2HPO_4 , що є і джерелом калію. Однак надлишок фосфат-іонів чинить негативний вплив на біосинтез ЛК.

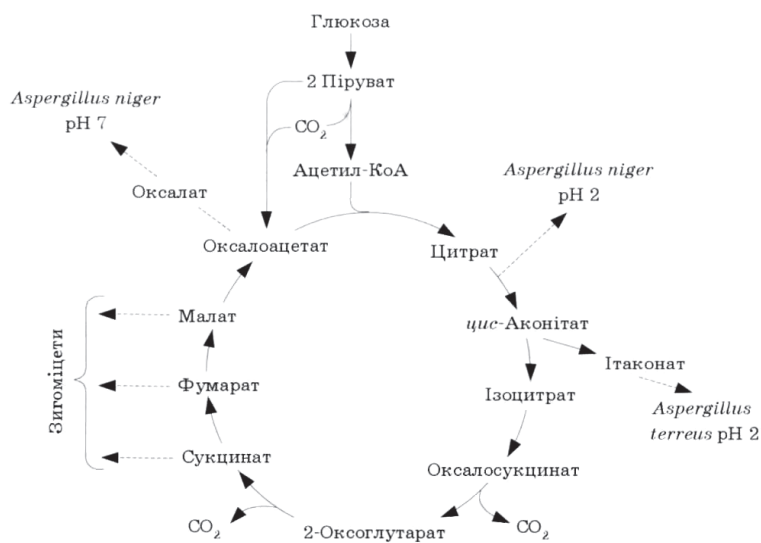


Рис. 9. Утворення органічних кислот мікроміцетами
(за Пирог Т.П., Ігнатова О.А., 2009)

Масова частка фосфору в розрахунку на P_2O_5 повинна бути при поверхневому культивуванні 0,025, а при глибинному - 0,08 мас. %. Вміст сірки має бути близько 0,07 мас. %.

При високих концентраціях іонів заліза зростає швидкість перетворення ЛК в ізолимонну кислоту. У відсутності іонів заліза слабо розвивається міцелій. Тому необхідно підтримувати концентрацію іонів заліза в межах 0,3-1,5 мг / л.

Важливе значення для біосинтезу відіграють інші мікроелементи, оптимальна концентрація яких становить, мг/л: Cu^{2+} - 0,5-3,0 (в розрахунку на $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Zn^{2+} - 0,14, Mn^{2+} - 0,02.

Мета роботи: вивчити значення поживних елементів для росту гриба *Aspergillus niger*.

Обладнання та матеріали: 20%-й розчин сахарози; 1%-е розчини ZnSO_4 , H_3BO_3 , MnSO_4 ; 10%-ні розчини NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , KCl , NaH_2PO_4 , MgSO_4 , MgCl_2 , FeSO_4 , FeCl_3 , Na_2SO_4 ; колби ємністю 100 мл; циліндри ємністю 100 мл; піпетки на 10 і 1 мл; препарувальні голки; вата.

Хід роботи:

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

Готують різні поживні середовища для культивування гриба *Aspergillus niger*.

Варіант 1 - повне живильне середовище без мікроелементів, %: сахароза - 10,0; NH_4NO_3 - 0,3; KH_2PO_4 - 0,2; MgSO_4 - 0,05; FeSO_4 - 0,01.

Варіант 2 - середовище без вуглецю: виключена сахароза. Для компенсації осмотичної активності середовища можна внести відповідну по осмотичного еквіваленту кількість хлориду натрію (NaCl), яка не впливає на розвиток *Aspergillus niger*.

Варіант 3 - середовище без азоту: виключений NH_4NO_3 .

Варіант 4 - середовище без фосфору: KH_2PO_4 замінений еквівалентною кількістю KCl .

Варіант 5 - середовище без калію: KH_2PO_4 замінений еквівалентною кількістю NaH_2PO_4 .

Варіант 6 - середовище без сірки: MgSO_4 та FeSO_4 замінені еквівалентними кількостями MgCl_2 і FeCl_3 .

Варіант 7 - середовище без магнію: MgSO_4 замінений еквівалентною кількістю Na_2SO_4 .

Варіант 8 - середовище без заліза: FeSO_4 замінений еквівалентною кількістю Na_2SO_4 .

Варіант 9 - повне живильне середовище з додаванням цинку: ZnSO_4 - 0,01%.

Варіант 10 - повне живильне середовище з додаванням марганцю: MnSO_4 - 0,01%.

Варіант 11 - повне живильне середовище з додаванням бору: H_3BO_3 - 0,01%.

Слід розрахувати еквівалентний відсоток заміненої речовини (це відноситься до всіх варіантів, за винятком перших трьох). Якщо в кожному з цих варіантів виключити певну сіль, то одночасно видаляються два елементи живлення замість одного. Так, у варіанті № 4 (середовище без фосфору) при видаленні KH_2PO_4 одночасно видаляється фосфор і калій. Тому калій необхідно внести в середовище в еквівалентній кількості у вигляді KCl . Крім того, необхідно пам'ятати, що *Aspergillus niger* є аеробним організмом, тому для створення оптимальних умов аерації використовують колби ємністю 100 мл з 30 мл середовищем.

Приклад розрахунку

Варіант 4 - середовище без фосфору: KH_2PO_4 (0,2% в середовищі) замінюють на KCl . Молекулярна маса KH_2PO_4 - 136, KCl - 74. Спочатку визначають вміст (у%) калію (x) в середовищі: 136 г KH_2PO_4 складають 0,2%; 39 г K - x%; $x = 0,06\%$. Потім встановлюють кількість KCl (в %), еквівалентну вилученій кількості KH_2PO_4 :

39 г K відповідають 0,06% K;

74 г - у% KCl ; $y = 0,1\%$.

Далі розраховують кількість кожної речовини в грамах в 30 мл середовища, знаючи їх процентний вміст.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

Приклад розрахунку.

Необхідний розчин, концентрація в якому NH_4NO_3 0,3%:
в 100 мл розчину міститься 0,3 г NH_4NO_3 ;
в 30 мл - x г NH_4NO_3 ;
 $x = 0,09$ г.

Таким же чином розраховують наважки усіх інших компонентів середовища. Так як наважки у більшості своїй дуже малі, що ускладнює зважування, зручніше використовувати готові розчини: 20%-й розчин сахарози; 1%-й розчин мікроелементів; 10%-ні розчини всіх інших солей. Для цього слід визначити, скільки мл кожного розчину треба взяти, щоб внести відповідну наважку.

Приклад розрахунку.

Для NH_4NO_3 :
в 10 мл 10%-го розчину NH_4NO_3 міститься 10 г NH_4NO_3 ;
в y мл 10%-го розчину NH_4NO_3 - 0,09 г NH_4NO_3 ;
 $y = 0,9$ мл.

Подібним чином розраховують (в мл) усі інгредієнти для кожного варіанту і вносять їх в колбу. Підсумувавши об'єми розчинів в кожному варіанті, віднявши отриману суму з 30 мл, отримують кількість дистильованої води, яку необхідно додати в кожену колбу. Колби із середовищем заражають спорами гриба *Aspergillus niger*, закривають ватними пробками і підписують варіанти досліду. Середовища перед внесенням спор гриба не стерилізують, оскільки висока концентрація цукру і кисла реакція середовища за рахунок кислих солей калію, магнію і заліза перешкоджають росту бактерій. Для кожного варіанту дослід бажано повторити двічі. Досліджені колби розміщують в термостат при 28-30°C. Матеріал аналізують через сім днів, так як до цього часу міцелій активно розростається по середовищу. Плівка, що виросла в першому варіанті, приймається як зразок, з нею порівнюють всі інші. Зазвичай в цьому варіанті ріст гриба дуже активний. Ріст гриба оцінюють візуально. Відзначають стан культури гриба:

- а) характер міцелію - суцільна плівка або острівцями, щільна або драглиста, складчаста або гладка;
- б) спороношення - сильне або слабке, зрілі чи незрілі спорангії.

Для більш точної оцінки плівку гриба ретельно промивають з нижньої сторони водою. Потім плівку з кожного варіанту досліду можна висушити в сушильній шафі при 105°C до постійної маси і зважити, приймаючи вагу плівки гриба в першому варіанті за 100%. На середовищах, де виключений той чи інший елемент живлення (особливо при великій потребі в ньому), гриб не росте або росте дуже слабо. При повному видаленні з живильного середовища необхідного елемента гриб розвиватися не буде.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

Завдання. Результати дослідження записати в таблицю і замалювати. Зробити висновки про необхідність різних живильних елементів для нормального росту гриба *Aspergillus niger* і про особливості розвитку гриба при відсутності і при додатковому внесенні певного елемента живлення.

Контрольні питання:

1. Які органічні кислоти синтезуються мікроміцетами?
2. Який механізм синтезу органічних кислот у грибів?
3. Як впливає концентрація заліза у живильному середовищі на синтез лимонної кислоти?
4. Як впливають мікро- та мікроелементи на ріст та розвиток *Aspergillus niger* ?

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ
НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ.

3.1. Особливості культивування мікроорганізмів

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 целюлоз розкладаючі 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

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ

клітини. Для виділення чистої культури використовують, як правило, щільні живильні середовища, на яких кожна клітина виростає у вигляді *ізольованої колонії* - потомства 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 вирощеної на живильному середовищі культури мікроорганізмів на інше свіже живильне середовище.

Культивування - вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах. При культивуванні на живильних середовищах виростають *культури* мікроорганізмів. *Ріст культури* - фізіологічний процес, в результаті якого збільшується *біомаса* - маса клітинної речовини даного мікроорганізму.

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.

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ

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

Культивування анаеробів виробляється 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 заливається 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. Строгі анаеробні мікроорганізми вирощують в спеціальних апаратах - скляних вакуумних ексикаторах 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.

Робота № 5. 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. Одним з методів, 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.

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ

2) Метод нагрівання. Застосовують для виділення чистих культур спорових форм бактерій (бацил). У цьому випадку перед посівом досліджуваній 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.

Мета роботи: приготування середовища Ешбі та отримання накопичувальної культури *Azotobacter chroococcum*, яку використовують в якості основи для приготування бактеріальних добрив.

Хід виконання роботи:

1. Для одержання азотфіксуючих бактерій використовують селективне безазотне середовище **Ешбі** наступного складу, г/л:
 - K_2HPO_4 – 0,2
 - $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2
 - $NaCl$ – 0,2
 - K_2SO_4 – 0,1
 - глюкоза (або манніт) – 20,0
 - крейда – 5,0
 - агар-агар – 20,0.
2. Стерильне середовище Ешбі розливають в чашки Петрі.
3. На поверхні застиглого середовища розкладають грудочки родючого ґрунту, після чого термостатують за $t^0 = 25-28^0C$.
4. Через 4–5 діб навкруги деяких ґрунтових грудочок з'являються ослизненні колонії азотобактера. В тому випадку, коли колонії належать до виду *Azotobacter chroococcum*, вони з часом набувають бурого забарвлення.
5. З колоній виготовляють мазок та розглядають його під мікроскопом.

Робота № 6. Методи виділення чистих культур мікроорганізмів

Найбільш поширеним способом виділення чистих культур є непрямі методи, засновані на ізоляції однієї мікробної клітини від маси мікроорганізмів і наступному вирощуванні потомства цієї клітини на поживних середовищах ізольовано від інших видів.

Для посіву частіше використовуються агаризовані поживні середовища в чашках Петрі. Цей метод запропонований відомим німецьким мікробіологом Кохом і називається методом пластинчастих (або чашкових) культур Коха.

Основним завданням методу є розведення концентрації мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі з таким розрахунком, щоб

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ

після висіву його на поживне середовище вирости ізольовані колонії. Існують два основні методи розведення досліджуваного матеріалу:

1) попереднє розведення матеріалу в фізіологічному розчині або в стерильній водопровідній воді в пробірках і висів готового розведення на щільне поживне середовище;

2) на поверхні щільного поживного середовища «методом виснажливого посіву».

Метод Пастера (метод граничних розведень) полягає в тому, що з досліджуваного матеріалу роблять ряд послідовних розведень в рідкому живильному середовищі.

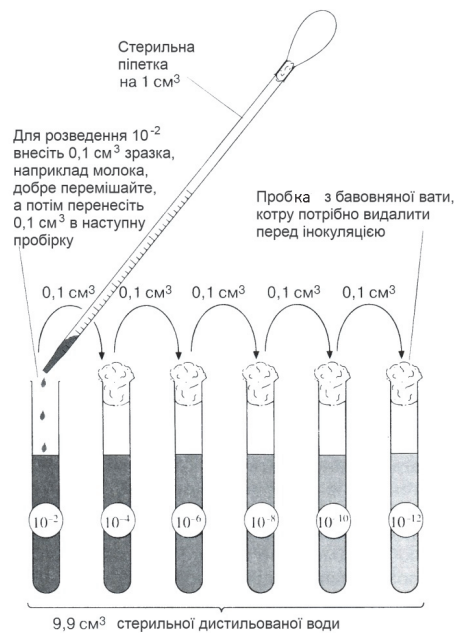


Рис. 10. Приготування серійних розведень (за Тейлор та ін., 2005).

Для цього краплю посівного матеріалу вносять в пробірку зі стерильною рідким середовищем, з неї краплю переносять у наступну пробірку і так засівають до 8 ... 10 пробірок. З кожним розведенням кількість мікробних клітин, що потрапляють в середовище, буде зменшуватися і можна отримати таке розведення, в якому у всій пробірці з середовищем буде знаходитися тільки одна мікробна клітина, з якої утвориться чиста культура мікроорганізму. Так як в рідких середовищах мікроорганізми ростуть дифузно, тобто легко розподіляються по всьому середовищі, то ізолювати одну мікробну клітину від іншої важко. Таким чином, метод Пастера не завжди забезпечує отримання чистої культури. Тому в даний час цей метод використовується, головним чином, для попереднього зменшення концентрації мікроорганізмів в матеріалі перед посівом його в щільне середовище для одержання ізольованих колоній.

2) Методи механічного розділення мікроорганізмів з використанням щільних поживних середовищ. До таких методів відносяться метод Коха (метод глибинного посіву) і метод Дригальського.

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ

Метод Дригальського заснований на механічному розподілі мікробних клітин на поверхні щільного живильного середовища в чашках Петрі. Кожна мікробна клітина, фіксуючись в певному місці, починає розмножуватися, утворюючи колонію.

Для посіву за методом Дригальського використовують декілька чашок Петрі, залитих щільним поживним середовищем. На поверхню середовища вносять краплю досліджуваного матеріалу.

Потім за допомогою стерильного шпателя цю краплю розподіляють по всьому живильному середовищі (посів газonom). Посів також можна проводити штрихом, використовуючи бактеріологічну петлю (рис.11).

Цим же шпателем або петлею здійснюють посів у другу, третю і т.д. чашки. Як правило, в першій чашці після культивування посіву мікроорганізми ростуть у вигляді суцільного шару, в подальших чашках кількість мікроорганізмів знижується і утворюються ізольовані колонії, з яких відсівом можна легко виділити чисту культуру.

Таким чином, у перших секторах спостерігається суцільний ріст, а уздовж наступних штрихів виростуть відокремлені колонії, що представляють собою потомство однієї клітини.

Хід роботи:

1. Для виділення ізольованих колоній з бактеріальної суміші № 1 зробити посів штрихом у чашку Петрі з м'ясо-пептонним агаром за методом виснаджучих штрихів. Далі чашки поміщають в термостат з температурою 37°C для культивування протягом 1 ... 2 доби.

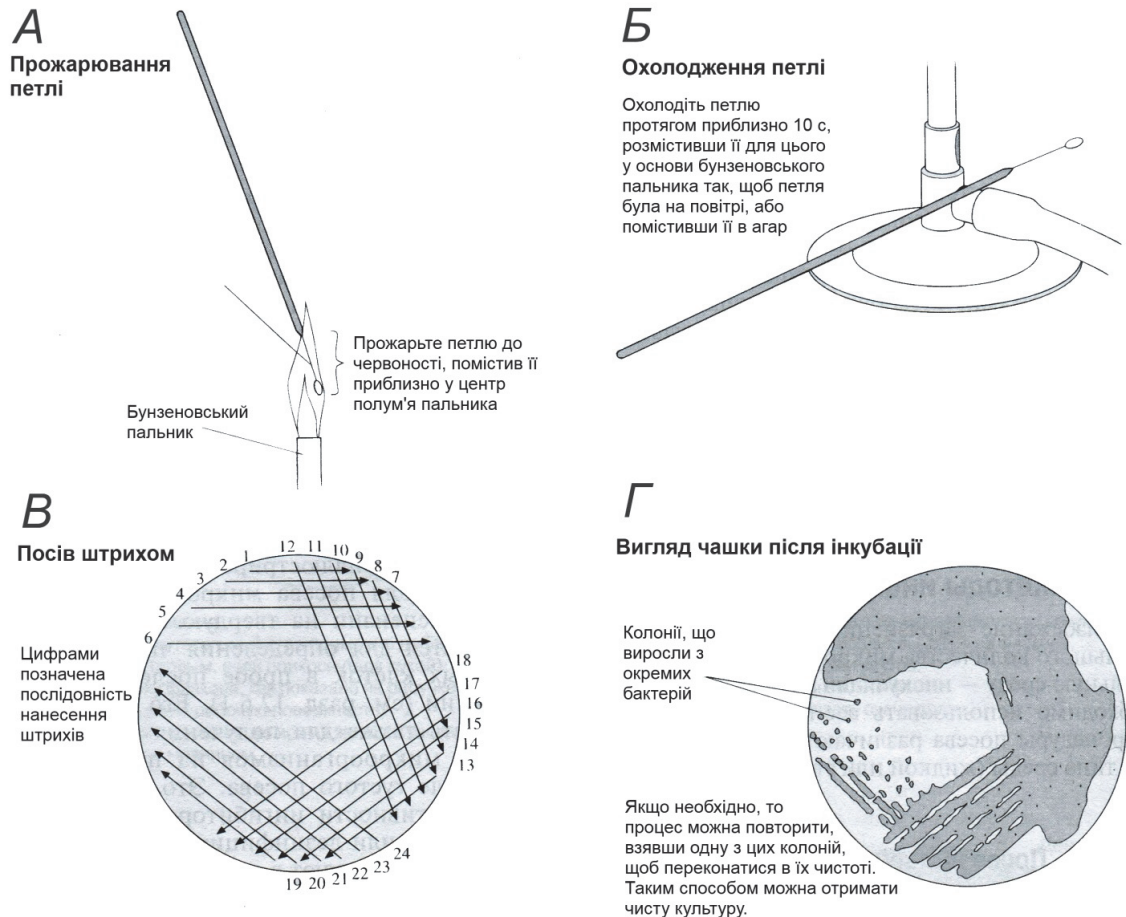
Посіви розглядають, виділяють ізольовані колонії, що відрізняються за зовнішнім виглядом, описують культуральні властивості виділених чистих культур мікроорганізмів, готують з описаних колоній фіксовані мазки і фарбують їх за Грамом. Далі замальовують мікроскопічну картину і роблять висновок про якісний склад мікрофлори бактеріальної суміші.

2. Для виділення спороутворюючих бактерій бактеріальну суміш № 2 нагріти на водяній бані до 75 ... 85°C і витримати протягом 20 ... 30 хв. Далі суміш остудити і зробити посів штрихом бактеріологічною петлею на поверхню скошеного м'ясо-пептонного агару в пробірку. Посів культивують протягом 1 ... 2 діб при 37°C.

Посіви досліджують, приготувавши фіксований мазок, пофарбувавши його за методом Грама і провівши мікроскопування для того, щоб переконатися, що накопичувальна культура спороутворюючих бактерій виділена. Замальовують мікроскопічну картину.

3. Для виділення молочнокислих бактерій з сирого молока 0,5 мл молока вносять стерильною піпеткою у пробірку із стерильним знежиреним молоком з додаванням 5% етилового спирту. Далі пробірки

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ



Заповніть петлю культурою, якщо вона знаходиться в рідкому середовищі.
Доторкніться до культури петлею, якщо вона знаходиться на твердому середовищі.
Привідкрийте чашки Петрі, наскільки потрібно, та легким дотиком розподіліть пробу, як це показано на малюнку, не пошкоджуючи поверхню агару.
Беріться за ручку петлі приблизно у середині (точка рівноваги) і тримайте петлю плоско.
Кожна лінія відповідає одному штриху петлі.
Прожарюйте та охолоджуйте петлю після кожної серії з шести ліній.
Ще раз прожарьте петлю в кінці. Підпишіть денце чашки*.
Інкубуйте чашки в перевернутому стані, щоб уникнути потрапляння конденсату в культуру.

*** Підпис чашок**

Дата
Ініціали
Вміст
Якщо ви підписуєте у зеркальному відображенні, то напис можна буде прочитати крізь кришку

Рис.11. Посів штрихом, або розведення культури
(за Тейлор Д.та ін., 2005)

поміщають у термостат з температурою 30°C і проводять культивування протягом доби.

Розглядають і описують характерні особливості згустку, що утворився. Далі готують фіксований препарат, фарбують його фарбою Муромцева. При мікроскопії звертають увагу на зовнішні ознаки виростилих на стерильному молоці з 5% спирту молочнокислих бактерій. Замальовують мікроскопічну картину.

Контрольні питання:

1. Що розуміють під термінами «чиста культура» (ЧК), «накопичувальна культура», «посів»?
2. На яких прийомах засновані методи виділення ЧК?
3. Чим відрізняються методи виділення ЧК?
4. Які ознаки встановлюють при ідентифікації ЧК?
5. Які поживні середовища рекомендуються для виділення ЧК?

**Робота № 7. Способи культивування аеробних та анаеробних
мікроорганізмів**

Аеробні мікроорганізми

Культивування на поверхні рідкого та щільного поживного середовища. В цьому випадку мікроорганізми отримують кисень безпосередньо з повітря. При поверхневому культивуванні важливо збільшити площу дотику середовища з повітрям. Для цього середовище наливають тонким шаром у посуд із широким дном – чашки Петрі, матраци, скошені поверхні у пробірках, колби. Поверхнєве культивування аеробів проводять на щільному або сипучому середовищі, а також у тонкому шарі рідкого середовища в скляному посуді із широким дном: чашках Петрі, колбах Виноградського, матрацах, кюветах.

Засіяні посудини культивують при постійній температурі в термостатах або термостатних кімнатах (термокамерах). Мікроорганізми розвиваються на поверхні середовища й використовують кисень безпосередньо з повітря. На рідких середовищах облігатні аероби ростуть у вигляді рясних плівок. Факультативні аероби (анаероби) розвиваються як у товщі рідкого середовища, утворюючи суспензії, пластівці, осад, так і на поверхні у вигляді тонкої плівки. На щільних середовищах мікроорганізми ростуть у вигляді окремих колоній або суцільного газону. Поверхнєве культивування широко застосовують для одержання накопичувальних і чистих культур, їх зберігання, вивчення морфологічних, культуральних і біохімічних ознак мікроорганізмів.

У промисловості метод поверхневих культур на рідких середовищах використовують для одержання лимонної кислоти, на сипучих - для виробництва ферментних препаратів.

Глибинне культивування у рідкому середовищі. При глибинному культивуванні мікроорганізми використовують кисень, розчинений у воді. Розчинність кисню у воді не досить велика, тому, щоб забезпечити ріст аеробів у товщі рідкого середовища, його необхідно штучно аерувати. Найбільш простий спосіб аерації це струшування колб або пробірок на спеціальних качалках. При цьому відбувається збільшення поверхні дотику живильного середовища з киснем повітря.

Простим і доступним способом періодичного глибинного культивування є вирощування аеробних культур у суспендованому стані в

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ

рідкому середовищі, розлитому в невеликих обсягах у пробірки або колби різної місткості, які після засівання поміщають на качалки в термокамери. Качалки забезпечують безперервне струшування або обертання посудин з частотою 100-300 об/хв. Ступінь аерації культуральної рідини регулюють зміною частоти обертання (струшування) качалки, обсягом середовища в посудинах і застосуванням спеціальних колб із 4-8 втисненими усередину відросткам - відбійниками для розбризкування рідини. Ефективність насичення середовища киснем при такому методі можна виміряти з певною погрішністю сульфитним методом. Водяний розчин сульфиту, рівний обсягу поживного середовища поміщають у колби, аналогічні колбам, які використовуються для культивування, ставлять на качалки й через певні проміжки часу вимірюють кількість окисленого сульфиту. Вирощування культур у колбах застосовують у лабораторній практиці для вивчення фізіологічних властивостей, установлення закономірностей їх росту залежно від складу компонентів середовища, з'ясування впливу факторів зовнішнього середовища; на життєдіяльність клітин, визначення продуктів метаболізму.

Безперервне глибинне культивування ведуть у лабораторних ферментерах (рис. 12).



**Рис. 12. Лабораторний ферментер
для глибинного культивування аеробних мікроорганізмів**

В промисловості, при вирощуванні мікроорганізмів у ферментерах, досить часто разом із механічним перемішуванням використовують ще й продування через середовище стерильного кисню (рис. 13).

Анаеробні мікроорганізми

Вирощування у високому шарі середовища. Рідке середовище наливають до країв пробірок чи колб. Перед використанням середовище прогрівають на водяній бані 30-40 хвилин, і швидко охолоджують, щоб не встиг розчинитись кисень. Посівний матеріал вносять на дно пробірки.

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ

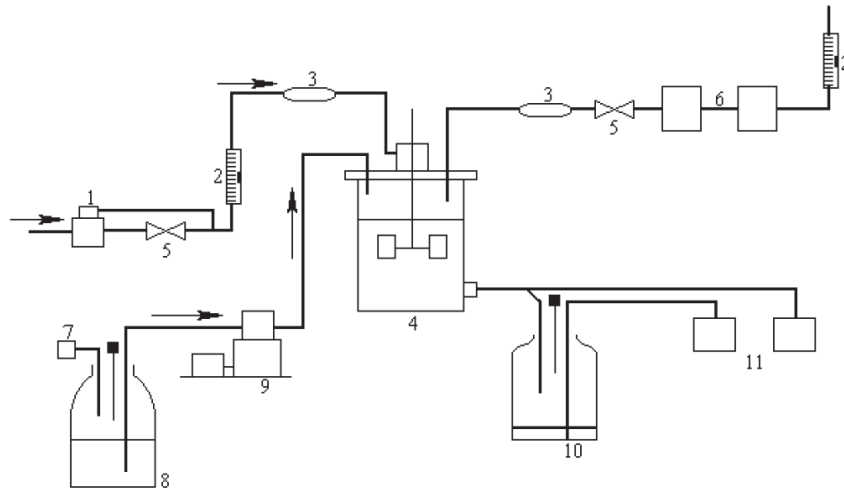


Рис.13. Схема лабораторної установки для безперервного процесу культивування:

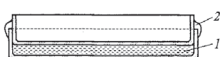
1 – регулятор подавання повітря; 2 – ротаметр (прилад для визначення об'ємної витрати газу або рідини в одиницю часу); 3 – фільтр для повітря; 4 – біореактор; 5- вентиль; 6 – аналізатор вихідного повітря; 7 – фільтр для живильного середовища; 8 ,10 – збирачі живильного середовища та готового продукту; 9 – насос; 10 – закриті пробовідбірники

Пробірки закривають гумовими або скляними пробками. Якщо ріст мікроорганізмів не супроводжується виділенням газів, поверхню середовища заливають стерильним вазеліном або парафіном.

Культивування у в'язкому середовищі. Дифузія кисню у рідину зменшується зі збільшенням її в'язкості. Готують середовище з додаванням 0,5% агар-агару (ущільнювача).

Вирощування у шарі щільного середовища. Посівний матеріал вносять у розплавлене та охолоджене до 45-50⁰С агаризоване середовище. У пробірках поверхню заливають стерильною вазеліновою олією. При використанні чашок Петрі для вирощування анаеробів агаризоване середовище із культурою мікроорганізмів розливають в кришки чашок і, після того як середовище застигне, щільно прижимають до її поверхні дно чашки. Зазор між стінками дна та кришки, де середовище стикається з повітрям, заливають стерильним парафіном (рис.14).

Рис. 14. Культивування анаеробів в чашці Петрі:



1 – агаризоване середовище; 2 – парафін.

Вирощування в анаеростатах. З анаеростатів відкачують повітря, а потім заповнюють сумішшю азоту (80-90%) та вуглекислого газу (10-20%), за рахунок якої створюється надлишковий тиск, який перешкоджає проникненню кисню з повітря.

Щодо відношення мікроорганізмів до світла, то більшості мікроорганізмів воно не потрібно, за винятком фототрофних бактерій.

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ

При посіві анаеробних мікроорганізмів головною метою є одержання середовища без кисню. Для цього:



а) розливають нагріте середовище, заливають його стерильною олією і через олію роблять засів;

б) вносять рідке або тверде середовище в пробірку, продувають його аргоном або азотом із балона, герметично перекривають корком. В середовища можна додавати деякі відновники, що поглинають залишки кисню (наприклад, Fe^{2+} , пірогалол, цистеїн та т.ін.) (рис. 15);

Рис. 15. Культивування анаеробів при поглинанні кисню лужним розчином пірогалолу

в) але найпростіший спосіб – це високий стовпчик, перекритий гумовим корком; г) чашки з анаеробами наливають агаром "під кришки" та вміщують:



в анаеростат (ємність, з якої насосом відкачується повітря); вакуумний ексикатор, на дно якого можна помістити хімічні поглиначі кисню (гіпосульфід Na , пірогалол і т.ін.) (рис. 16);

д) для облигатних анаеробів існує складна техніка культивування в атмосфері інертного газу, з постійною перевіркою на відсутність кисню.

Рис. 16. Металевий мікроанаеростат

Мета роботи. Ознайомитись с основними способами культивування аеробних та анаеробних мікроорганізмів. Освоїти фізичні, хімічні та біологічні методи видалення кисню, ознайомитися з демонстрацією методів культивування анаеробних бактерій.

Матеріали та обладнання:

поживні середовища: МПА і пептонна вода; стерильний посуд (3 пробірки і одна чашка Петрі на студента); бактеріологічні петлі (кожному студенту); штативи; культури мікроорганізмів. Пробірки з анаеробними мікроорганізмами, що вирости в глибині щільного поживного середовища, пробірки з анаеробами, анаеростат, ексикатор з хімічними речовинами, що поглинають кисень (пірогалол, гідросульфід натрію), чашки Петрі з щільним поживним середовищем, на якій сумісно вирощені аероби і анаероби, ґрунт, колби місткістю 250 мл, стерильна вода, піпетки, спиртівки, термостат.

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ

Хід роботи:

1. Розплавити щільні поживні середовища.
2. Розлити поживні середовища:
 - пептонну воду у пробірки;
 - МПА у пробірки (стовпчиком та у вигляді скошеної поверхні) та чашки Петрі.
3. Засіяти:
 - штрихом на чашку Петрі з МПА;
 - штрихом у пробірку зі скошеним МПА;
 - уколом в стовпчик у пробірку з МПА;
 - піпеткою у пробірку з пептонною водою.
4. Уважно перегляньте на демонстраційних посівах:
 - ріст анаеробів в глибині щільних живильних середовищ
 - ріст бактерій у середовищах, що містять редуруючі речовини.
 - розвиток анаеробів в анаеростатах.
 - ріст анаеробів в ексікаторі з хімічними речовинами, поглинаючими кисень (пірогаллол, гідросульфід натрію).
 - ріст аеробів і анаеробів.
5. Всі демонстраційні посіви замалюйте в альбом.

Контрольні питання:

1. Які умови необхідно забезпечити для нормального вирощування мікроорганізмів?
2. На які групи поділяються мікроорганізми по відношенню до температури?
3. Як забезпечити вирощування аеробних та анаеробних форм мікроорганізмів?
4. Яка техніка посіву на рідкі та щільні поживні середовища?

РОЗДІЛ 4. ТИПИ ФЕРМЕНЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

4.1. Культивування мікроорганізмів у періодичній та безперервній культурі

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

Біореактор або ферментер - це закрита або відкрита ємність, в якій за певних умов (тиск, температура, концентрація сухих речовин, рН середовища (і т.д.) протікають на клітинному або молекулярному рівні контрольовані реакції, здійснювані за допомогою мікроорганізмів (рис.17).

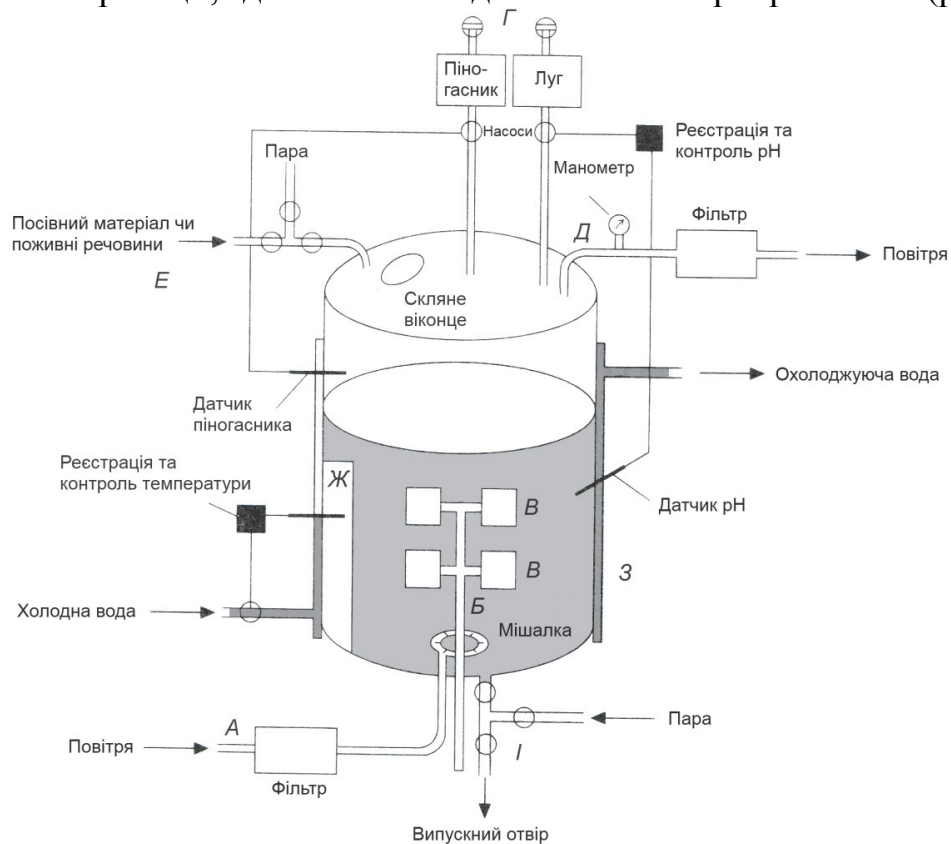


Рис.17. Типовий ферментер.

Розміри посудини можуть варіювати від 1 дм³ (експериментальний) до 500 000 дм³ (для комерційного виробництва). Форма й використаний для конструкції матеріал також різняться, хоча найчастіше ферментери виготовляють у вигляді циліндрів з нержавіючої сталі.

Позначення:

А. Вхідний отвір для повітря. У більшості випадків ферментація є аеробною та вимагає великих обсягів стерильного повітря, що подається через спеціальну конструкцію — розбризкувач. Пухирці повітря

допомагають перемішувати вміст, забезпечують доступ кисню для аеробного дихання і сприяють виведенню летких відходів.

Б. Мішалка присутня в більшості ферментерах. Завдяки перемішуванню підвищується швидкість розчинення кисню, підтримуються градієнти дифузії кисню й поживних речовин всередині клітин і продуктів із клітин, запобігається злипання клітин або міцелію грибів; здійснюється теплообмін між середовищем і охолоджуючими поверхнями. Стрижень мішалки повинен бути міцним і стерильним.

В. Лопаті мішалки, зазвичай плоскі, розташовані вертикально.

Г. Вхідні отвори для луку та піногасника. Вони з'єднані з датчиками, що контролюють рН і піноутворення у ферментері. При аерації та перемішуванні утворюється піна (в основному, через присутність білків), яка перешкоджає відбору вмісту через вивідний отвір. При контакті піни з датчиком піногасника він замикає електричне коло, яке пускає в хід насос, що впорскує піногасник. Інші датчики зв'язані електричним колом з іншими «ефекторами». У тих випадках, коли при ферментації підвищується кислотність середовища, додається луг, так що значення рН завжди стає.

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.

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'ємнодоливне 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 ріст 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 (**хеMOSTAT**).

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.

Робота № 8. Фази росту культур-продуцентів
і розрахунок кінетичних параметрів

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 (рис.18).

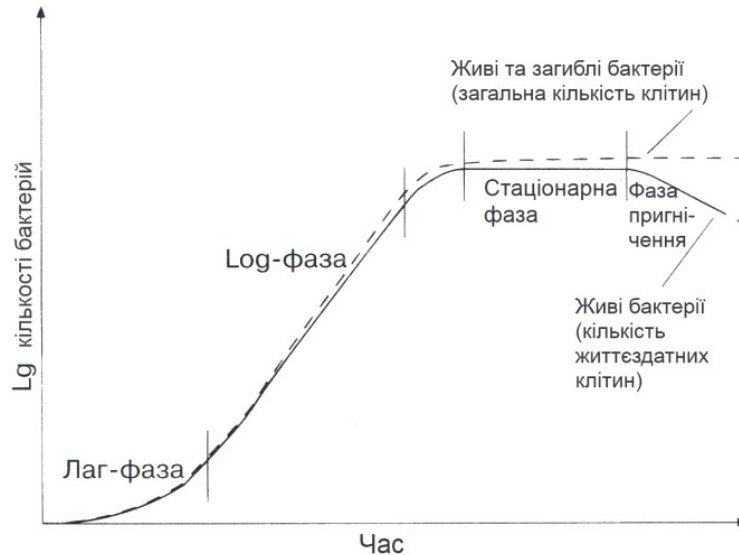


Рис. 18. Типовий ріст бактеріальної популяції
(За Тейлор Д.та ін., 2005)

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 і 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 вповільнюватися, 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.д. - так звані вторинні метаболіти або ідіоліти) (див.Додатки). Первинні метаболіти — це продукти метаболізму, необхідні для росту і виживання. 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 вповільненні 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.

Мета роботи: ознайомлення з циклом розвитку мікробних культур і специфікою фаз періодичної культури.

Матеріали та обладнання:

1. Музейна культура штаму роду *Pseudomonas*;
2. Стерильний розчин базового фосфатного буфера для середовища;
3. Маточні стерильні розчини мікроелементів, заліза лимонно-кислого, сульфату магнію та хлористого амонію;
4. Шпателі, спиртівка, мірний посуд, піпетки, колби для вирощування бактерій, гумові пробки з мікробіологічними фільтрами;
5. Термостатуєма качалка.

Хід роботи:

1. Приготувати живильне середовище для вирощування бактерій:
 - В мікробіологічному боксі до 0,5 л основного середовища (фосфатний буфер) в стерильних умовах над спиртівкою додати 2,5 мл стандартного розчину заліза, 1,5 мл розчину мікроелементів, 2 мл розчину сульфату магнію і необхідний об'єм розчину хлориду амонію (в 1 мл якого затримується 100 мг солі); вуглецевий субстрат (з розрахунку 10 г/л фруктози);
 - Інокулят розлити в 10 ферментаційних колб по 100 мл (10 колб для періодичної культури), використовуючи стерильний мірний посуд; колби підписати (наприклад, 1а, 1б, 1в і т. д.);
 - Виміряти вихідну оптичну густину (ОГ) культури.
2. Колби встановити на качалку.
3. Періодично проводити відбір проб для вимірювання оптичної щільності культури на ФЕК і мікроскопіювання клітин. У колби, призначені для підживлення, через 12, 24 і 36 годин після початку культивування внести додатковий субстрат (розчин фруктози з розрахунку 10 г/л).
4. Дані занести в табл. 7.
5. За результатами експерименту побудувати криві росту культур (за накопиченням біомаси в культурі) бактерій.

Показники росту культури бактерій роду *Pseudomonas* в ході розвитку періодичної культури

Група	Вихідні показники інокуляту		Поточні показники культури	
	ОГ	X, г/л	ОГ	X, г/л
№1. Час від початку досліду, год.	1			
	2			
	3			
	4			
	5			

Контрольні питання:

1. Які дослідження дозволяє проводити техніка періодичного культивування мікроорганізмів?
2. У чому «вузькі» місця періодичної культури?
3. Які відмінності та переваги періодичного режиму культивування мікроорганізмів з підживленням субстратом, тубулярної культури і безперервних культур?

Робота № 9. Моделі росту мікроорганізмів

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.

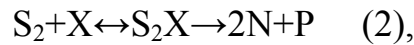
В якості нижчого рівня при розробці кінетичної моделі зазвичай розглядають дослідження, пов'язані з аналізом внутрішньоклітинних процесів. При цьому достатня глибина розробки кінетичної моделі може бути реалізована при розгляді кінетики росту мікробних популяцій з урахуванням узагальнених ферментативних 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.

У даній роботі розглядається кінетика утилізації субстрату при гетеротрофному культивуванні бактерій. При культивуванні водневих бактерій *Ralstonia eutropha* зазвичай використовується збалансований

РОЗДІЛ 4. ТИПИ ФЕРМЕНЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

живильний склад, за основу якого прийнята сольове середовище Шлегеля: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ - 9,1; KH_2PO_4 - 1,5; $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ - 0,2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,025(г/л). Мікроелементи вводяться за прописом Хоагlanda з розрахунку 3 мл стандартного розчину на 1 л середовища. Стандартний розчин містить: H_3BO_3 - 0,288; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,030; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,08; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,008; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,176; $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,050; NiCl_2 - 0,008 (г/л). В якості субстратів можуть бути прийняті хлористий амоній і фруктоза.

З ферментативного каталізу відомі дві принципово різні найпростіші кінетичні схеми, що призводять до дискримінуємих залежностей швидкості процесу від концентрацій двох субстратів. З урахуванням автокаталітичного процесу мікробного росту ці дві схеми можуть бути представлені в наступному вигляді:



де S_1 , S_2 - концентрації субстратів, N - ненасичена форма клітини, X - «насичена» форма клітини, здатна до поділу; P - продукт.

Механізм (1) включає дві оборотні рівноважні стадії приєднання субстратів (механізм потрійного комплексу). Механізм (2) включає стадії приєднання субстратів, які, принаймні, розділені однією незворотною стадією (пінг-понг-механізм).

Для механізму групи (2) характерна наступна залежність від концентрації субстратів:

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \frac{K_1}{S_1} + \frac{K_2}{S_2}}, \quad (3)$$

де K_1 і K_2 - ефективні константи спорідненості мікроорганізму до субстратів S_1 і S_2 . Для механізмів групи (1) рівняння питомої швидкості росту може бути записано у вигляді

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \frac{K_2}{S_2} + \frac{K_1K_2}{S_1S_2}}. \quad (4)$$

Подальші дослідження зводяться до аналізу рівнянь (3) або (4).

Для цього проводять дослідження і будують залежність виду $\mu = f(S_1; S_2)$ (Рис.19.)

Обробка експериментальних даних дозволяє отримати значення ефективних констант спорідненості мікроорганізму до субстратів в обернених координатах. Точки (1 - 3, дані рис.20):

1 - $X_{\text{фр}} = 1 \text{ кг/м}^3$; 2 - 2,5; 3 - 8.

Мета роботи: побудова моделі для розрахунку питомої швидкості росту біомаси в умовах збалансованого субстрату при гетеротрофному культивуванні бактерій *Ralstonia eutropha*.

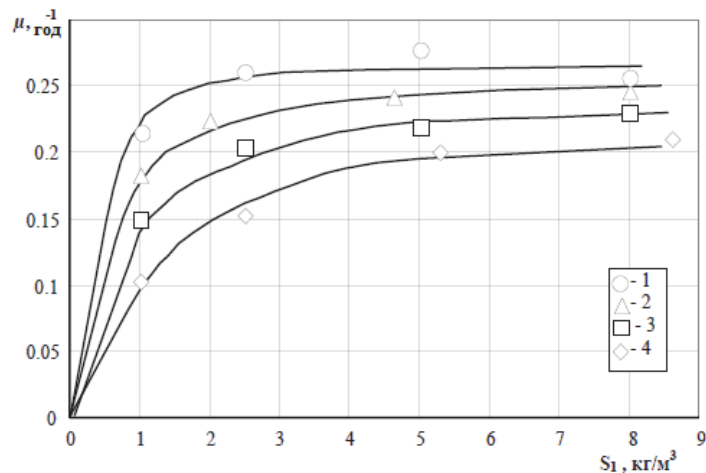


Рис. 19. Зміна питомої швидкості росту сумарної біомаси від концентрації фруктози S_1 . Експериментальні точки (1-4): 1 - $S_2 = 1,2$ кг/м³; 2 - 0,6; 3 - 0,4; 4 - 0,2

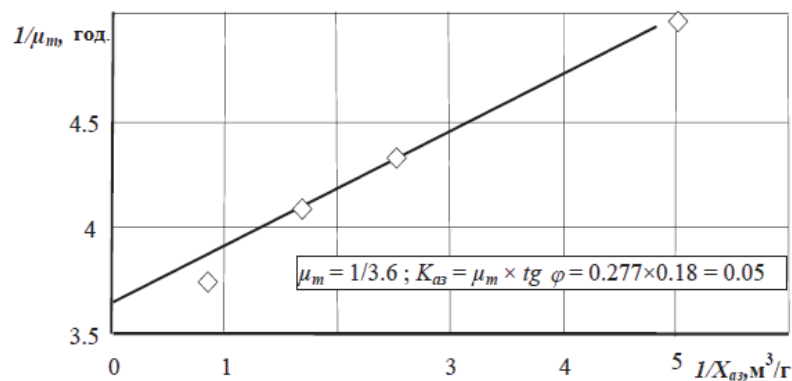


Рис. 20. Залежність кінетичних параметрів $1/\mu_m$ від $1/X_{a3}$

Матеріали та обладнання:

- Музейна культура штаму *Ralstonia eutrophus* B-5786;
- Стерильний розчин базового фосфатного буфера для середовища;
- Маточні стерильні розчини мікроелементів, заліза лимоннокислого, сульфату магнію і хлористого амонію;
- Шпателі, спиртівка, мірний посуд, піпетки, колби для вирощування бактерій, гумові пробки з мікробіологічними фільтрами;
- Термостатуєма качалка.

Хід роботи:

- Розділитися на 4 групи по числу заданих значень концентрації хлористого амонію в середовищі (0,2, 0,4; 0,6 і 1,2 кг/м³) і концентрації фруктози (1, 2, 4, 8 кг/м³).
- Кожній групі приготувати варіанти живильного середовища для бактерій із заданим значенням концентрацій фруктози і азоту:

- в мікробіологічному боксі до 0,5 л середовища в стерильних умовах над спиртівкою додати 2,5 мл стандартного розчину заліза, 1,5 мл розчину мікроелементів, 2 мл розчину сульфату магнію і необхідний обсяг розчину хлориду амонію (в 1 мл якого міститься 100 мг солі);

- близько 200 мл середовища відлити;
- залишені 300 мл середовища засіяти інокулятом, для цього змити культуру з одного музейного "косяка" (використовувати шпателі);
- інокулят розлити в ферментаційні колби об'ємом 100 мл;
- колби щільно закрити пробками;
- колби підписати згідно номеру експерименту;
- на ФЕК виміряти оптичну щільність (без розведення) кожного інокуляту;
- колби встановити на качалку.

3. Після закінчення 15 годин культивування через кожні 30 хв. (здійснити чотири повторності) провести вимірювання оптичної щільності культури та по калібрувальній кривій визначити концентрацію біомаси в культурі, а потім розрахувати питому швидкість росту μ , год⁻¹.

4. Дані представити у вигляді графічної залежності (рис.1).

5. Побудувати залежності $1/\mu = f(1/S_1)$ і $1/\mu = f(1/S_2)$ і визначити вид механізму і константи, що входять до рівняння (3) або (4).

6. Оформити роботу і зробити висновки.

Контрольні питання:

1. Якими методами визначають питому швидкість росту мікроорганізмів?
2. Періодичне і безперервне культивування.
3. Моделі росту культури.

Робота № 10. Вивчення кінетики росту дріжджів при глибинній ферментації

Існує два способи культивування популяції мікроорганізмів у глибині рідкого середовища: періодичний і безперервний. Вид кривої росту дріжджів змінюється в залежності від умов культивування, але послідовність фаз залишається незмінною.

Для кількісної характеристики культивування мікроорганізмів користуються 2 показниками – середньою та питомою швидкістю росту. Середня швидкість росту V характеризується приростом біомаси за одиницю часу

$$V = \frac{x - x_0}{t - t_0},$$

де x_0 – кількість біомаси на початку культивування, кг/м³; x – біомаса за час культивування, кг/м³; t_0 , t – початковий та кінцевий час відліку, год.

Для вивчення кінетики росту мікробної популяції в умовах глибинної ферментації використовують дріжджі роду *Saccharomyces*. Експериментальні дані для визначення технологічних показників процесу культивування отримують на лабораторній установці (рис.21).

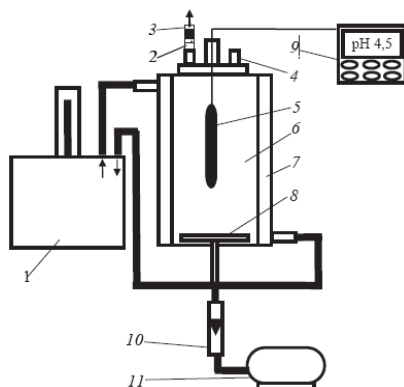


Рис.21. Схема лабораторної установки для вирощування дріжджів:

1 – ультраатермостат, 2 – фільтр очищення повітря; 3 – штуцер виходу повітря, 4-штуцер введення середовища та відбирання проб, 5 – електрод рН-метра, 6 – ємність культиватора, 7 – рубашка, 8 – барботер, 9 – іонометр, 10 – ротаметр, 11- компресор.

Установка складається з ємності об'ємом 1 л для вирощування дріжджів (6), забезпеченою барботером (8) для рівномірного розподілу повітря, що нагнітається компресором (11). Відпрацьоване повітря очищається, проходячи систему фільтрів (2). Ємність культиватора забезпечена рубашкою (7), в яку подається вода від ультраатермостату (1) для підтримки температури процесу вирощування. Рівні рН і температура середовища вимірюється електродом (5) іонометра (9). Витрата повітря встановлюється ротаметром (10).

Мета роботи: визначення основних технологічних характеристик періодичного процесу глибинної ферментації дріжджів.

Хід роботи:

1. Приготувати 1 л живильного середовища, наступного складу: цукор - 9%; діамоній фосфат - 0,3%; амоній сірчаноокислий - 0,16%; хлористий калій - 0,06%; магній сірчаноокислий - 0,02%. Заміряти величину рН розчину на іонометр і довести при необхідності до 4,5 70%-ною ортофосфорною кислотою або аміачною водою.
2. Провести асептичну обробку ємності культиватора етанолом. Після чого заповнити його живильним середовищем, відібравши в пробірку 15 мл вихідної суміші для визначення в ній вмісту цукру.
3. Включити ультраатермостат і нагріти живильний розчин до температури 30-31°C. Після чого через штуцер (8) ввести через воронку засівну суспензію: дріжджів (посівного матеріалу) в кількості 12% до об'єму живильного середовища. Температура середовища протягом процесу, також як і рН середовища контролюється за допомогою іонометра, електрод якого постійно знаходиться в рідині.

РОЗДІЛ 4. ТИПИ ФЕРМЕНЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

4. Включити компресор 3 і встановити витрати повітря з розрахунку 5 - 10 м³/м³год за допомогою ротаметра (10). Відпрацьоване повітря видаляється через штуцер (3), забезпечений фільтром (2) з активованого вугілля і скловати для затримки крапель середовища і клітин дріжджів.

5. Відлік часу культивування слід починати з моменту внесення в живильне середовище дріжджів. Першу пробу для визначення початкової концентрації дріжджових клітин x_0 відбирають в кількості 1 мл стерильної піпеткою через штуцер (4) через 1 - 3 хв. після початку процесу. Потім відбір проб проводять через кожну годину для визначення x_n - кількості виростлої біомаси.

6. Провести підрахунок кількості дріжджових клітин, використовуючи камеру Горяєва, результати внести в табл. Для підрахунку дріжджів невелику краплю живильного середовища з біомасою клітин відібрати піпеткою або скляною паличкою, нанести її на поверхню лічильної камери і накрити шліфувальним склом, і притерти покривне скло до сторін камери до появи райдужних кілець. Камеру помістити на предметний столик і з об'єктивом 8×, знайти зображення сітки, а потім замінити об'єктив на 40×. Вести підрахунок через 3 - 5 хв. від моменту заповнення. Підрахувати кількість клітин в 10 великих або 20 малих квадратах сітки, розкладених по діагоналі. Врахувати всі клітини, що лежать в квадратику сітки і перетинають верхню і праву сторони квадрата. Визначити середнє число n_{cp} дріжджів в квадраті (табл.8). Число дріжджів в одному квадраті не повинно бути більше 20, в іншому випадку вихідну суспензію розбавляють і повторюють розрахунок.

Таблиця 8

Результати розрахунку дріжджових клітин

Час росту	Кількість клітин в одному квадраті сітки, шт.					Середня кількість клітин, шт.	Кількість клітин в 1 мл
	1	2	3	4	5		

Кількість клітин в 1 мл суспензії обчислити за формулою :

$$x = \frac{N_{cp} \cdot 1000}{hS},$$

де N_{cp} - середнє число дріжджів у квадраті, шт.; h - глибина камери; S - площа квадрата сітки, мм (площа великого квадрату 1/25 мм²; малого – 1/400 мм²).

7. В кожній пробі, починаючи з вихідного моменту культивування, визначити вміст цукру в середовищі, як основного вуглецевомісного субстрату, а також вимірюють кількість розчиненого азоту.

Одночасно зафіксувати в табл. 9 значення рН середовища та температур за показниками шкали іонометра.

РОЗДІЛ 4. ТИПИ ФЕРМЕНЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

8. Побудувати графічну залежність концентрації біомаси дріжджових клітин у часі, а також зміни концентрації цукру і засвоєного азоту.

Таблиця 9

Технологічна характеристика росту дріжджів в умовах глибинної ферментації при періодичному культивуванні

Час відбору проб	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Концентрація дріжджових клітин, х, млн. кл/мл										
pH середовища										
Температура середовища, °C										
Концентрація цукру, S _c , %										
Кількість розчиненого азоту										

Робота № 11. Типи ферментаційних процесів

Стадія ферментації є основною стадією в біотехнологічному процесі. На цій стадії відбувається взаємодія продуцента з субстратом і утворення цільових продуктів (біомаси, ендо- та екзопродуктів). Ця стадія здійснюється в біохімічному реакторі (ферментері) і може бути організована в залежності від особливостей використаного продуценту і вимог до типу і якості кінцевого продукту різними способами.

Ферментація може проходити в строго асептичних умовах або без дотримання правил стерильності (так звана «незахищена» ферментація). Ферментація може здійснюватися на рідких (рідкофазна) і на твердих (твердофазна) середовищах; анаеробно і аеробно. Аеробна ферментація може протікати поверхнево або глибинно (по всій товщі живильного середовища).

Забезпечення процесу ферментації зводиться до дозованому поступанню в ферментер потоків (інокуляту, повітря (або газових сумішей), живильних біогенів, піногасників) і відводу з нього тепла, відпрацьованого повітря, культуральної рідини, а також вимірюванню і стабілізації основних параметрів процесу на рівні, необхідному для оптимального розвитку продуцента і утворення цільового продукту.

Мета роботи: дати уявлення про техніку и методи культивування мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання:

1. Термостатуєма качалка-шейкер для культивування мікроорганізмів;
2. Лабораторний ферментаційний комплекс «Bio-Flo»;
3. Дослідне виробництво мікробіологічних препаратів.

Хід роботи:

Проведення екскурсії та знайомство з типами ферментаційних процесів:

- Періодичним аеробним рідкофазним;
- Проточним в лабораторному ферментері на гетеротрофному субстраті;
- Проточному в лабораторному ферментері на газовому субстраті;
- Відвідування дослідного виробництва мікробіологічних препаратів.

Робота № 12. Періодичне культивування мікроорганізмів та культивування з підживленням субстратів

Найпростіше лабораторне обладнання для вирощування мікроорганізмів у періодичному режимі включає термостатуєму качалку або магнітні мішалки, на які встановлюються колби (рис.22).

Мета роботи: вивчення техніки культивування мікроорганізмів в режимі періодичного процесу.

Матеріали та обладнання:

1. Музейна культура штаму *R. eutrophus* B-5786;
2. Стерильний розчин базового фосфатного буфера для середовища;
3. Маточні стерильні розчини мікроелементів, заліза лимонно-кислого, сульфату магнію і хлористого амонію;
4. Шпателі, спиртівка, мірний посуд, піпетки, колби для вирощування бактерій, гумові пробки з мікробіологічними фільтрами;
5. Термостатуєма качалка, газгольдер, вакуумний насос, газові субстрати (водень, кисень, вуглекислота).

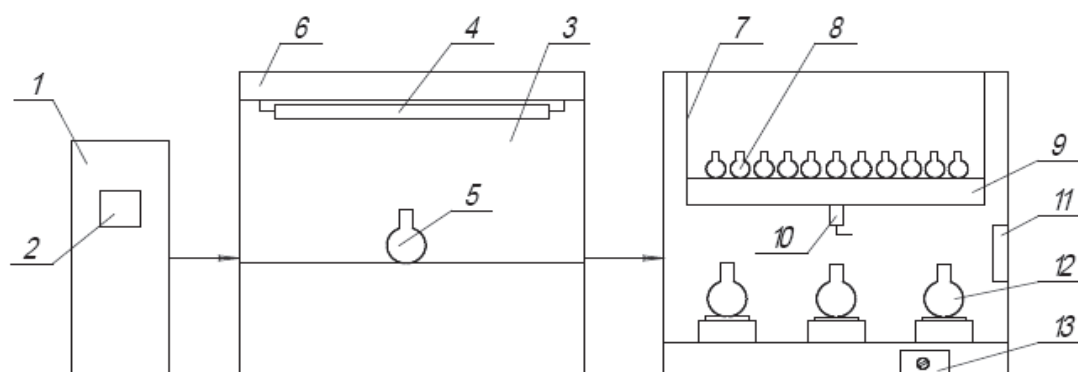


Рис. 22. Апаратурна схема культивування мікроорганізмів при періодичному режимі:

- 1- холодильна камера для зберігання штамів-продуцентів; 2 – колекція штамів; 3- ламінар-бокс; 4 – УФ-опромінення; 5 – колби для отримання накопичувальних культур; 6 – фільтр; 7 – качалка; 8 – колби для отримання посівного матеріалу; 9 – платформа для колб; 10 – електродвигун; 11 – блок термостабілізації; 12 – колби на магнітних мішалках; 13 – регулятор току.

Хід роботи:

1. Приготувати живильне середовище для вирощування бактерій: в мікробіологічному боксі до 0,5 л основного середовища (фосфатний буфер) в стерильних умовах над спиртівкою додати 2,5 мл стандартного розчину заліза, 1,5 мл розчину мікроелементів, 2 мл розчину сульфату магнію і необхідний обсяг розчину хлориду амонію (в 1 мл якого міститься 100 мг солі); вуглецевий субстрат (з розрахунку 10 г / л фруктози).
2. Інокулят розлити в три ферментаційні колби по 100 мл (п'ять біологічних повторностей для періодичної культури і 5 - для культури з підживленням субстратом), використовуючи стерильний мірний посуд.
3. Колби щільно закрити гумовими пробками;
4. Колби підписати (наприклад, 1а, 1б, 1в і т.д.);
5. Виміряти вихідну оптичну щільність культури;
6. Колби встановити на качалку;
7. У 5 колб для культивування з підживленням субстратом через 12, 24 і 36 год. після початку росту культури внести добавку вуглецевого субстрату (з розрахунку 1-2 г / л);
8. Періодично проводити відбір проб для вимірювання оптичної щільності культури на ФЕК і мікроскопіювання клітин.
9. Дані занести в табл. 10
10. За результатами експерименту побудувати криву накопичення біомаси культур.

Контрольні питання:

1. Які основні вимоги до організації періодичного культивування мікроорганізмів?
2. Які основні характеристики мікробного росту в періодичній культурі?
3. Які відмінності та переваги періодичного режиму культивування мікроорганізмів з підживленням субстратом?

Таблиця 10

Показники росту культури бактерій роду *R. eutrophus* В-5786 в ході розвитку періодичної культури

Група	Вихідні показники інокуляту		Поточні показники культури	
	ОГ	X, г/л	ОГ	X, г/л
№1. Час від початку досліду, год.	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
№2 (з підживленням субстратом) Час від початку досліду, год.	1			
	2			
	3			
	4			
	5			

Робота № 13. Проточні культури: хемостат, турбідостат

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 організуються 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 (рис.23). Перемішування не відбувається.



Рис.23. 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.

Безперервні процеси. У безперервних процесах біооб'єкт постійно підтримується в експоненційній фазі росту. Забезпечується безперервний приплив свіжого живильного середовища в біореактор і відтік з нього натуральної рідини, що містить клітини та продукти їх життєдіяльності.

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

$$\mu = D,$$

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.24).

РОЗДІЛ 4. ТИПИ ФЕРМЕНЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

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

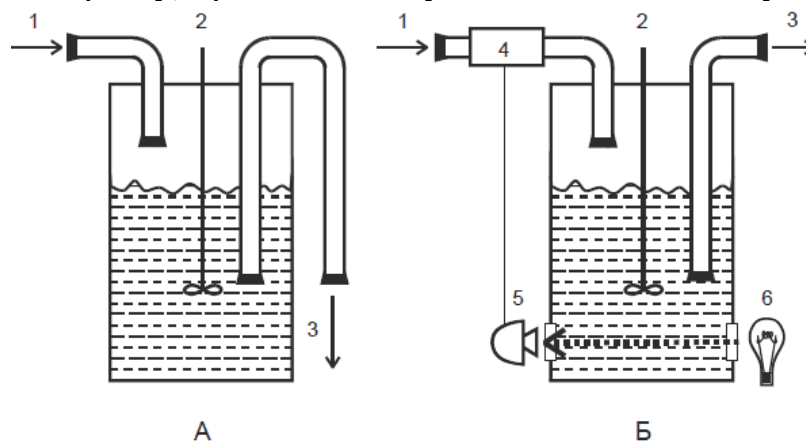


Рис.24. Схеми біореакторів для проточного культивування мікроорганізмів:

А - Хемостат; Б - турбідостат з автоматичною регуляцією оптичної щільності;
1 - надходження середовища, 2 - мішалка, 3 - збирання культури, 4 - насос, 5 - фотоелемент, 6 - джерело світла

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 популяція 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 потоку.

Один з найпростіших варіантів хемостату містить насос, постійно 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.

Мета: дати уявлення про методи, інструментальне оформлення та можливості методу проточних культур.

Матеріали та обладнання:

1. Лабораторний ферментаційний комплекс «Bio-Flo»;
2. Стерильні розчини для приготування живильного середовища;
3. Інокулят (посівна культура);
4. ФЕК;
5. Скляний посуд, колби, мірні склянки, піпетки, бюкси.

Хід роботи:

1. У мікробіологічному боксі (або боксі-ламінарі) з маточних стерильних розчинів приготувати 1 л живильного середовища;

2. У оброблену УФ-опромінювачами кімнату внести необхідне обладнання (середовище, інокулят);
3. Посуд з середовищем з'єднати з насосом-дозатором, підключеним до ферментеру;
4. У ферментер влити інокулят (1 л);
5. Включити аеропомпу;
6. Включити систему перемішування і термостабілізації;
7. Виміряти вихідну оптичну щільність (ОЩ) інокуляту;
8. Фіксувати в робочому журналі температуру культури;
9. При досягненні температури 30°C почнеться ріст культури;
10. Періодично (через 30 хв.) відбирати проби для визначення оптичної щільності культури. При оптичній щільності культури 0,1 (без розведення) включити насос-дозатор на мінімальну швидкість потоку (0,1 год⁻¹);
11. Щогодини визначати ОЩ культури;
12. При збільшенні ОЩ поступово збільшувати швидкість потоку середовища до стану steady-state (величина X, г/л - постійна);
13. Обчислити значення питомої швидкості росту культури, визначити час досягнення стану steady-state, отримати культуру (зберігати в холодильнику) для наступних занять.

Контрольні питання :

1. У чому принципова відмінність проточної культури від періодичної?
2. Які основні вимоги до організації проточної ферментації?
3. Які переваги проточної культури?

Робота № 14. Проведення процесу ферментації з лімітуванням субстрату

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 дерепресія 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 про 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 принципіальних 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, направляють 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.

Мета: освоєння техніки ведення процесу вирощування мікроорганізмів з лімітуванням субстрату для знаходження умов росту, що впливають на біохімічну програму синтезу макромолекул.

Матеріали та обладнання:

1. Музейна культура штаму *R. eutrophus* B-5786;

РОЗДІЛ 4. ТИПИ ФЕРМЕНЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

2. Стерильний розчин базового фосфатного буфера для середовища;
3. Маточні стерильні розчини мікроелементів, заліза лимонно-кислого, сульфату магнію і хлористого амонію;
4. Шпателі, спиртівка, мірний посуд, піпетки, колби для вирощування бактерій, гумові пробки з мікробіологічними фільтрами;
5. Термостатуєма качалка (або шейкер-інкубатор).

Хід роботи:

1. Приготувати 4 варіанти середовища з різними концентраціями хлористого амонію в середовищі (0,8; 0,4; 0,2 і 0,1 г/л):

- В мікробіологічному боксі до 0,5 л фосфатного буфера над спиртівкою (або в боксі-ламінарії) додати 2,5 мл стандартного розчину заліза, 1,5 мл розчину мікроелементів, 2 мл розчину сульфату магнію і необхідний об'єм розчину хлориду амонію (в 1 мл якого міститься 100 мг солі); розчин вуглецевого субстрату (з розрахунку 5 - 10 г / л фруктози);

- Близько 200 мл середовища відібрати;

- 300 мл середовища, що залишилось засіяти інокулятом, змивши культуру з однієї музейної пробірки (використовувати шпателі);

- Інокулят розлити в три ферментаційні колби по 100 мл (три біологічні повторності), використовуючи стерильну мірний посуд;

- Колби закрити ватно-марлевими пробками;

- Колби підписати (наприклад, 1а, 1б, 1в);

- На ФЕК виміряти оптичну щільність (без розведення) кожного інокуляту;

- Колби встановити на качалку.

2. Протягом 3-4 днів проводити вимірювання оптичної щільності культури та по калібрувальній кривій - визначити концентрацію біомаси в культурі X, г/л.

3. Дані занести в табл.11.

Таблиця 11

Група	Поточні показники культури		
	T, °C	ОЩ	X, г/л
№1. Час від початку досліду, год.			
№2. Час від початку досліду, год.			
№3. Час від початку досліду, год.			
№4. Час від початку досліду, год.			

4. Зробити посів культури мікроорганізмів в колби для отримання посівного матеріалу і періодичного вирощування, відбір проб і визначення біомаси за оптичною щільністю і світінням на спеціальній установці.

5. Провести відбір проб культури з колб в процесі періодичного вирощування бактерій, визначення їх оптичної щільності та інтенсивності світіння.

6. Ознайомитись з пристроєм і принципом роботи ферментера, підготувати його до стерилізації. Приготувати і стерилізувати поживні середовища для періодичного процесу в ферментері.

РОЗДІЛ 4. ТИПИ ФЕРМЕНЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

7. Провести посів культури в ферментер для періодичного вирощування бактерій, відбір проб і визначення в них інтенсивності світіння і оптичної щільності.

8. Провести відбір проб з ферментера, визначення світіння і оптичної щільності. Провести злив ферментера, підготовку до стерилізації та стерилізацію ферментера. Розрахунок умов безперервного культивування клітин.

9. Посіяти культури в ферментер для безперервного культивування бактерій, відібрати проби для визначення оптичної щільності і світіння. Перевести культури на безперервний процес вирощування, зробити відбір проб, проведення аналізів, побудову графіків кривої росту культури.

10. Провести злив ферментера, розбирання та миття, відділення біомаси, руйнування на пресі або ультразвуком, визначення ферментативної активності і кількості АТФ.

Контрольні питання:

1. У чому специфіка метаболізму воденьокиснюючих хемоавтотрофних мікроорганізмів?

2. У чому основні труднощі культивування газовикористовуючих мікроорганізмів?

3. Що дозволяє фіксувати в ході культивування водневих бактерій метод Шлегеля?

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ
ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

Мікроорганізми, які використовуються у промисловій біотехнології, належать до різних фізіологічних і таксономічних груп та істотно відрізняються одні від одних за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками. З більш як 100 000 відомих видів мікроорганізмів у промисловості використовують відносно мало — близько 100 видів, до яких належать кілька тисяч штамів.

Промислові штами повинні відповідати таким вимогам: рости на дешевих і доступних субстратах; характеризуватися високою швидкістю росту і синтезу цільового продукту; синтезувати максимум цільового продукту за мінімального утворення побічних; бути генетично й фізіологічно стабільними, стійкими до фагів і сторонньої мікрофлори, нешкідливими (непатогенними) для людей і навколишнього середовища; бажано, щоб продуценти були термофільними, ацидофільними (або алкалофільними), оскільки у цьому разі знижується можливість контамінації сторонньою мікрофлорою; технологія продуктів мікробного синтезу повинна бути економічно доцільною.

Надсинтез, тобто здатність мікроорганізмів синтезувати певний продукт у кількостях, що перевищують фізіологічні потреби, досить часто зустрічається в природі. Часто той або інший продукт обміну речовин (органічні кислоти, спирти, антибактеріальні речовини), що виділяється мікроорганізмами у навколишнє середовище, є токсичним для інших видів і забезпечує успіх у конкурентній боротьбі за джерела живлення. Саме мікроорганізми з такими властивостями були першими використані у господарській діяльності людини тисячоліття тому, тоді ж було здійснено стихійний відбір найпродуктивніших форм.

Природні штами мікроорганізмів використовують для виробництва мікробної біомаси (мікробного білка), бактеріальних азотних добрив, біопестицидів, у виробництві харчових продуктів та інших галузях. Проте більшість промислових мікроорганізмів представлено штучно селекціонованими штамми. Удосконалені продуценти можуть бути:

1) змінені в результаті індукованих мутацій. Мутації є основою селекції мікроорганізмів з корисними властивостями, штамів-продуцентів антибіотиків, амінокислот або вітамінів. Збільшення мутантів в популяції мікроорганізмів досягається за допомогою індукованих мутацій, що досягається обробкою клітин спеціальними хімічними, фізичними або біологічними агентами.

2) одержані методами генної або клітинної інженерії. Даний підхід отримав назву сайт-спрямованого мутагенезу.

У сучасних умовах промислові масштаби виробництва потребують використання нових високоактивних мутантних і рекомбінантних штамів.

Також використовують штами із *колекцій наукових установ*.

**Робота № 15. Виділення мікроорганізмів-продуцентів
біологічно-активних речовин з ґрунту**

З усіх субстратів докільця найбільш густо заселений мікроорганізмами ґрунт, в якому вони знаходять всі необхідні умови для своєї життєдіяльності: поживні речовини, вологу, оптимальні значення рН та Eh, співвідношення газів, захист від дії сонячних променів. Найбільшу кількість мікроорганізмів, які в подальшому використовуються в промисловій біотехнології як продуценти промислово важливих речовин виділяють з ґрунту.

Матеріали та обладнання. Сухі поживні середовища, рідкі (МПБ, пептонна вода), щільні (МПА), напів-рідкі середовища, спеціальні (середовище Чапека для грибів), елективні, диференційно-діагностичні, чисті культури бактерій, вирощені на рідких, напіврідких і щільних поживних середовищах, бактеріологічні петлі; спиртівка; термостат з температурою 37°C; мікроскоп; столик для фарбування препаратів; промивалка з водою; фільтрувальний папір; карболовий фуксин Циля; дистильована вода; імерсійне масло для мікроскопії.

Хід роботи:

1. *Відбирання проби ґрунту для аналізу.* Ґрунт і мікрофлора ґрунту дуже гетерогенні, тому необхідно відібрати по можливості більш однорідну пробу.

Проби відбирають з верхніх шарів стерильними ковпачками або ножами, з глибини - спеціальними бурами.

Зразки відбирають за принципом "конверта" - в 4-х різних кутах і по діагоналі.

З поверхні дослідної ділянки зсувають рослинні рештки і 0,5-1 см верхнього ґрунту. В кожній точці відбирають по 100-200г ґрунту в стерильні мішечки або в стерильні банки із притертими корками. Загальна маса проби повинна бути не менше 1 кг. Ґрунт пересівають через сито з діаметром отворів 2мм, потім поміщають у стерильні скляні банки з притертими корками або в пластмасові мішки і зберігають при помірній температурі.

2. *Виготовлення ґрунтової суспензії для посіву.* Перед аналізом з ґрунту вибирають дрібні корінці, різні сторонні рештки. Зважують 10 г ґрунту і висипають у колбу з 100 мл стерильної води. Закриту ватним тампоном колбу струшують на качалці протягом 15 хв. (руками 5 хв.), чекають 30 сек, щоб осіли грубі часточки ґрунту і роблять наступні розведення. Розведення необхідні для одержання ізольованих клітин

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

мікроорганізмів. Коли в колбу до 100 мл води додали 10 г ґрунту, то одержали розведення 1:10, або перше розведення. Новою стерильною піпеткою набирають 10 мл з першої колби і переносять у другу з 100 мл стерильної води (рис.25).

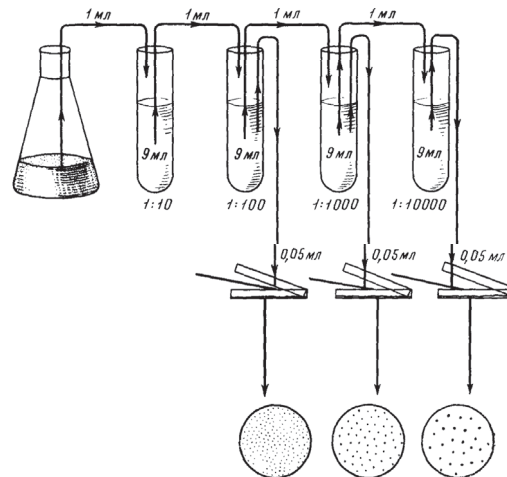


Рис. 25. Схема приготування і розсіву суспензії мікроорганізмів

Одержують розведення 1:100 (або друге), можна готувати і третє, і четверте розведення.

Одночасно визначають вологість ґрунту. Для цього в чисті алюмінієві бюкси, попередньо висушені при 105°C протягом 24 годин до постійної маси і зважені, поміщають 10 г ґрунту і зважують. Висушують бюкси в сушильній шафі при 105°C протягом 24 год. і знову зважують.

Вологість ґрунту розраховують за формулою :

$$W = \frac{(P_1 - P_2) \times 100}{P_2 - P}$$

де W - вологість,%; P - маса бюкса, г; P_1 - маса ґрунту разом з бюксом до висушування; P_2 - маса ґрунту разом з бюксом після висушування.

Поправку на вологість розраховують за формулою:

$$k = \frac{100 + W}{100}$$

де k - поправка на вологість.

3.Посів в чашки Петрі з поживним середовищем. Залежно від насичення ґрунту мікроорганізмами, вибір кількості розведень може змінюватись, але повинно бути не менше двох. Чим родючіший ґрунт, тим більше необхідно зробити розведень (4-5). Висівати суспензію можна поверхневим або глибинним способами (повторність досліду 2-4).

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

П о в е р х н е в и й п о с і в . Агаризовне середовище розігривають на водяній бані. Розливають по 20 мл у стерильні чашки Петрі, дотримуючись правил стерильності, і чекають поки воно застигне. На поверхню стерильного агару біля запаленої спиртівки наносять 0,1 мл суспензії стерильною піпеткою і рівномірно розподіляють її по всій поверхні агару за допомогою стерильного скляного шпателью.

Засіяні чашки поміщають у термостат кришками донизу. На чашках пишуть прізвище студента, групу, факультет і номер розведення.

4. *Підрахунок колоній у чашці Петрі і розрахунок кількості мікроорганізмів у 1 г ґрунту.* На поживному середовищі в чашці Петрі виростають колонії ґрунтових мікроорганізмів. Колонія - це видиме неозброєним оком скупчення мікробних клітин.

Колонії бактерій підраховують через 3-5, грибів - через 2-7, актиноміцетів - через 7-15 днів інкубації в термостаті. Колонії рахують, не відкриваючи чашки Петрі. Підрахунок ведуть у тих чашках, де при посіві виросло від 50 до 150 колоній бактерій і актиноміцетів, 30-50 колоній грибів. Якщо колонії менше 10, то такі чашки не враховують. Якщо колоній багато, то чашку Петрі ділять на чотири сектори восковим олівцем і підраховують кількість колоній в секторі, потім результат сумують. Підрахувавши кількість колоній на всіх паралельних чашках, знаходять середнє значення для однієї чашки і за формулою вираховують кількість мікроорганізмів у 1 г сухого ґрунту.

$$x = a \times b \times k,$$

де x - кількість мікроорганізмів у 1 г сухого ґрунту, колоній/г; a - середня кількість колоній у чашці Петрі; b - розведення, з якого зроблено посів (з протилежним знаком $\times 10$); k - поправка на вологість. Наприклад, середня кількість колоній 60, розведення 10000, вологість 20%.

$$k = \frac{100 + 20}{100} = \frac{120}{100} = 1,2;$$

$$x = 60 \times 10000 \times 10 \times 1,2 = 7200000 \text{ колоній/г} = 7,2 \times 10^6 \text{ колоній/г}$$

Найбільш типові колонії відсівають у пробірки зі скошеним агаром для одержання чистої культури мікроорганізмів і зберігають для подальшого вивчення.

Контрольні питання:

1. Назвіть методи вивчення кількості мікроорганізмів у ґрунті. З'ясуйте переваги і недоліки методів.

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

2. Через який час підраховують кількість вирослих колоній мікроорганізмів?
3. Чи є залежність між родючістю ґрунту і чисельністю мікроорганізмів певних еколого-трофічних груп ?
4. Охарактеризуйте методику визначення загальної кількості сапрофітних мікроорганізмів.
5. Охарактеризуйте методику визначення кількості мікроорганізмів різних фізіологічних груп (азотфіксаторів, амоніфікаторів, нітрифікаторів і т.д.).
6. Охарактеризуйте методику визначення мікробів-антагоністів і встановлення їх активності.

Робота №16. Дослідження морфологічних особливостей промислово важливих штамів мікроорганізмів

Характеристика культуральних і фізіолого-біохімічних особливостей мікроорганізмів включає опис їх здатності рости на різноманітних живильних середовищах і викликати певні перетворення речовин, що входять до складу цих середовищ.

1. Ріст на щільних живильних середовищах.

На поверхні щільних живильних середовищ в залежності від посіву мікроорганізми можуть рости у вигляді колонії, штриха або суцільного газону. *Колонією* називають ізольоване скупчення клітин одного виду, що виросли в більшості випадків з однієї клітини. При їх описі враховуються наступні ознаки:

- Форму колонії - округла, амебовидних, неправильна, ризоїдна і т. д.;
- Розмір (діаметр) колонії, вимірюють в міліметрах; якщо розміри колонії не перевищують 1 мм, то їх називають точковими;
- Поверхня колонії - гладка, шорстка, бороздчата, складчаста; зморшкувата, з концентричними колами або радіально складчаста;
- Профіль колонії - плоский, опуклий, кратероподібний, конусоподібний;
- Блиск і прозорість - колонія блискуча, матова, тьмяна, мучниста, прозора;
- Колір колонії - безбарвна (темно-білі колонії відносять до безбарвних) або пігментована - біла, жовта, золотава, помаранчева, бузкова, червона, чорна. Особливо відзначають виділення пігменту в субстрат.

2. Ріст в рідких живильних середовищах.

Характеризуючи ріст мікроорганізмів в рідкому середовищі, відзначають ступінь мутності - слабка, помірна або сильна, особливості плівки – тонка, щільна або пухка, гладенька або складчаста, а при утворенні осаду вказують на його кількість (невелика чи велика), щільний, пухкий, слизистий або пластівчастий. Нерідко ріст мікроорганізмів

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

супроводжується появою запаху, пігментацією середовища, виділенням газу.

3. *Крохмаль-йодна реакція на нітрити* заснована на тому, що нітрити в кислому середовищі окислюють йодистий цинк з виділенням йоду, присутність якого виявляють за допомогою крохмалю. Для проведення реакції до краплі культуральної рідини додають краплю розчину, що містить $ZnCl_2$, KI і крохмаль, і краплю розчину HCl. При наявності в середовищі нітритів з'являється синє забарвлення.

4. *Протеолітична активність* визначається наявністю ферментів (протеази), які каталізують розщеплення білків на полі-і олігопептиди. Протеази виділяються різними видами бацил, актиноміцетів, міцеліальних грибів та іншими мікроорганізмами. Активність позаклітинних протеаз визначають, використовуючи як субстрат желатину, казеїн або інші білки.

5. *Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотичних речовин.* Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків зручно визначати за допомогою паперових дисків, просочених певними антибіотиками. Концентрація антибіотиків в дисках підібрана з таким розрахунком, щоб діаметри затримки росту стандартних тест-організмів були 28 - 32 мм. Якщо досліджувані мікроорганізми чутливі до даних антибіотиків, то навколо дисків утворюються зони відсутності росту. Діаметр зони вимірюють міліметровою лінійкою. Зона більше 30 мм свідчить про високу чутливість мікроорганізму до антибіотика, а менше 12 мм - про слабку чутливість.

На сьогодні актиноміцети є одними з найважливіших об'єктів сучасної генетики та промислової біотехнології. Дві третини антибіотиків є метаболітами актиноміцетів, 80% із яких синтезують представники роду *Streptomyces*. Ці бактерії активно вивчаються на предмет генетичного контролю біосинтезу антибіотиків, що сприяє активному розвитку методів генетичної інженерії та селекції їх продуцентів. Актиноміцети родів *Nocardia* є продуцентами нокардіоміцину, рифаміцину (некласичні β -лактамі антибіотики), *Streptomyces griseus* – стрептоміцину (аміноглікозидний антибіотик), протеолітичних ферментів. *S. antibioticus* – олеандоміцину (макролідний антибіотик), протипухлинних хіміо-терапевтичних препаратів. *S. aureofaciens* – тетрациклінових антибіотиків, вітамінів групи B; *S. olivaceus* – β -лактамічних антибіотиків, вітамінів групи B; *Saccharopolispora erythraea* – еритроміцину (макролідний антибіотик); *Micromonospora purpurea* – гентаміцину (аміноглікозидний антибіотик); *M. olivoasterospora* – фортицину (аміноглікозидний антибіотик) (Див.Додатки).

Мета роботи:

1. Приготувати та розглянути препарат-відбиток *Streptomyces griseus*.

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

2. Розглянути морфологію колоній та будову конідієносців грибів (*Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* та *Mucor nigricans*) у препараті роздавлена крапля.
3. Дослідити морфологію *Saccharomyces cerevisiae* та *Candida albicans* у фіксованих та фарбованих препаратах.
4. Досліджувані препарати замалювати в альбомах.

Матеріали та обладнання: Голки препарувальні, ланцети, предметні скельця, покривні скельця, мікроскопи, розчин метиленової синьки, суміш спирт + гліцерин + метиленова синька.

Культури мікроорганізмів: *Streptomyces griseus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Mucor nigricans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*.

Хід роботи:

1. Приготувати препарат-відбиток **актиноміцетів**.
 - Скальпелем вирізати невеликий фрагмент агаризованого середовища з колонією актиноміцетів.
 - Перенести цей блок на предметне скло (колонією донизу!) і злегка притиснути. Блок зняти, а відбиток підсушити на повітрі.
 - Наступні етапи виготовлення препарату, як для фіксованого забарвленого мазка (зафіксувати над полум'ям пальника, фарбувати фуксином 2-3 хв., промити водою, висушити).
 - Розглянути з імерсією. Замалювати (рис.26).



Рис. 26. Культура актиноміцетів після розвитку протягом, днів:
1- 2; 2 – 4-5; 3 – 7-8.

2. Виготовити препарат роздавлена крапля для дослідження будови конідієносців **грибів**.
 - На предметне скло нанести краплину суміші “спирт + гліцерин + метиленовий синій”.
 - Обережно, за допомогою двох препарувальних голок перенести частину повітряного міцелію у краплину суміші й розправити його.

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

- Накрити покривним скельцем і розглядати з об'єктивом 40х. Замалювати (рис.27).



Рис. 27. Міцелій актиноміцетів (1) та грибів(2) при однаковому збільшенні

- 3. Для дослідження **морфології дріжджів** виготовити фіксований та забарвлений препарат (фарбують розчином метиленового синього). Звертають увагу на клітини із бруньками. Замалювати (рис.28).

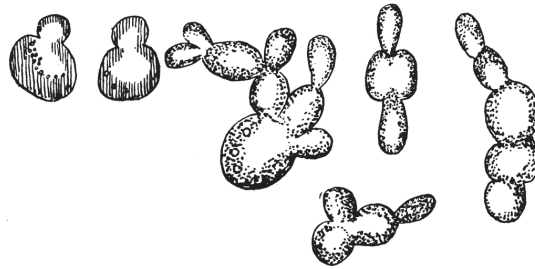


Рис. 28. Клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*

Контрольні питання:

1. Назвіть типові ознаки актиноміцетів.
2. Як можуть розмножуватись актиноміцети?
3. В чому полягає практичне значення актиноміцетів?
4. Особливості морфологічної будови дріжджів.
5. Охарактеризуйте типи розмноження дріжджів.
6. Опишіть морфологічні особливості мукорових, пеніцилів та аспергилів.
7. Практичне значення цвільових грибів, дріжджів та дріжджеподібних грибів.

Лабораторна робота № 17. Визначення біохімічних властивостей *Bacillus subtilis*

Визначення здатності синтезувати цільовий продукт - головний критерій при відборі продуцентів. Мікроорганізми повинні відповідати наступним вимогам:

- 1) володіти високою швидкістю росту;
- 2) використовувати для життєдіяльності дешеві субстрати;
- 3) бути стійкими до зараження сторонньою мікрофлорою.

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

Мета роботи. Освоїти методики проведення біохімічних тестів для визначення ферментативних властивостей та ідентифікації бактерій.

Матеріали та обладнання. Чиста культура *Bacillus subtilis* в чашках Петрі з МПА, бактеріологічні петлі, спиртівки, стерильні пробірки, предметні скельця, перекис водню, середовища з моно-, ди-, полісахаридами і спиртами, що містять індикатори; пробірки з МПБ; пробірки з 2 - 3%-ною пептонною водою; розчини цистину і цистеїну, лакмусовий папір; стерильний фізіологічний розчин, термостат з температурою 37°C.

Хід виконання роботи

1. Розлийте стерильний фізіологічний розчин в стерильні пробірки по 0,3 мл (по дві пробірки на один тест: одна контрольна, інкубується без бактерій, а друга - дослідна), внесіть в ряд дослідних пробірок однакову кількість (одна петля агарової культури або 0,1 мл бульйонної культури) досліджуваної культури бактерій.

2. Відповідно до інструкції внесіть в пробірки паперові диски тестів та інкубуйте пробірки при температурі 37°C. 3. Засійте чисту культуру досліджуваних бактерій бактеріологічною петлею на середовища з моно-, ди-, полісахаридами та спиртами, наданих викладачем, і інкубуйте їх протягом 18 -24 год. при температурі 37°C.

4. Для визначення каталазної активності на предметне скло нанесіть краплю 3%-ного розчину перекису водню, внесіть в неї петлю досліджуваної агарової або бульйонної культури бактерій і ретельно перемішайте. При позитивній реакції (наявності каталази) перекис водню буде розкладатися з утворенням води і кисню в вигляді бульбашок.

5. Через 24 год. уважно перегляньте всі контрольні та дослідні пробірки з тестами і посіви на середовища з цукрами і спиртами. Результати визначення ферментативних властивостей *Bacillus subtilis* оформити у вигляді табл. 12.

Ідентифікація мікроорганізмів базується на вивченні морфологічних, цитологічних, культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей. У роботі з ідентифікації мікроорганізмів необхідно дотримуватись наступних правил: використовувати чисті культури, застосовувати при вивченні стандартні методи, використовувати для інокуляції діагностичних середовищ культури, що знаходяться в активному фізіологічному стані.

Таблиця 12

Ферментативні властивості *Bacillus subtilis*

Сахаролітичні властивості				Протеолітичні властивості			Наявність каталази
Глюкоза	Лактоза	Манніт	Сорбіт	Індол	H ₂ S	NH ₃	

**Лабораторна робота № 18. Ідентифікація мікроорганізмів за
визначником бактерій Берджі**

До останнього часу систематика мікроорганізмів базувалася переважно на фенотипових ознаках: морфологічних, фізіологічних, біохімічних та ін., тому існуючі системи класифікації носять значною мірою штучний характер. Однак вони дозволяють порівняно легко ідентифікувати деякі знову виділені види та штами мікроорганізмів (вид - сукупність особин, що характеризуються низкою спільних морфологічних, фізіолого-біохімічних, молекулярно-генетичних ознак; під терміном «штам» розуміють чисту культуру мікроорганізмів, виділену з певного місця проживання (води, ґрунту, організму тварини і т.д.). Різні штами одного виду мікроорганізмів можуть відрізнятися за деякими ознаками, наприклад чутливості до антибіотиків, здатності синтезувати деякі продукти метаболізму і т.д., але ці відмінності менші, ніж видові.

Вивчення генотипу мікроорганізмів стало можливим в результаті успішного розвитку молекулярної біології і призвело до виникнення геносистематики. Дослідження генотипу, засноване на аналізі нуклеїнових кислот, в принципі дає можливість побудувати з часом природну (філогенетичну) систему мікроорганізмів. Філогенетичні взаємини бактерій оцінюють визначенням молярного вмісту ГЦ в ДНК, методами ДНК-ДНК і ДНК-рРНК-гібридизації, за допомогою ДНК-зондів, а також вивченням послідовності нуклеотидів в 5S, 16S і 23SpРНК.

Визначення молярного вмісту ГЦ від загальної кількості основ ДНК у прокаріотів, як уже вказувалося, коливається від 25 до 75%. Кожен вид бактерій має ДНК з характерним середнім вмістом ГЦ. Однак оскільки генетичний код вироджений, а генетичне кодування ґрунтується не тільки на змісті нуклеотидних основ в одиницях кодування (триплети), але і на взаємному розміщенні, то однаковий середній вміст ГЦ в ДНК двох видів бактерій може супроводжуватись їх значним генотиповим поділом. Якщо два організми дуже близькі за нуклеотидним складом, це може бути свідченням їх еволюційної спорідненості тільки за умови, що вони володіють великим числом загальних фенотипових ознак або генетичною схожістю, підтвердженою іншими методами. У той же час розбіжність (більше 10-15%) в нуклеотидному складі ДНК двох штамів бактерій з загальними фенотиповими властивостями показує, що вони відносяться до різних видів.

Метод ДНК-ДНК-гібридизації є більш важливим для оцінки генетичної спорідненості бактерій. При ретельному проведенні експериментів можна отримати цікаву інформацію про ступінь їх генетичної гомології. У середині одного виду бактерій ступінь генетичної гомології штамів досягає 70 - 100%. Однак якщо в результаті еволюційної дивергенції послідовності нуклеотидних основ геномів двох бактерій

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

розрізняються в більшому ступені, то специфічна реасоціація ДНК-ДНК стає такою слабкою, що не піддається вимірюванню. У такому випадку гібридизація ДНК-рРНК дозволяє значно збільшити коло організмів, у яких можна визначити ступінь генетичної гомології завдяки тому, що на відповідно невеликій ділянці бактеріального генома, що кодуєть рибосомальні РНК, вихідна послідовність основи зберігається значно повніше, ніж на інших ділянках хромосоми. У підсумку методом ДНК-рРНК-гібридизації часто знаходять досить високу гомологію геномів бактерій, у яких реасоціація ДНК-ДНК не виявляє помітної гомології.

Для ідентифікації бактерій іноді використовують також метод ДНК-зондів (генних зондів) - різновид методу молекулярної гібридизації ДНК-ДНК. Реакція гібридизації ведеться в цьому випадку не між двома препаратами тотальної ДНК, а між фрагментом нуклеотидної послідовності ДНК (зондом), що включає ген (генетичний маркер), відповідальний за якусь певну функцію (наприклад, стійкість до антибіотика), і ДНК досліджуваної бактерії. Найпоширенішим способом створення генних зондів є виділення специфічних фрагментів шляхом молекулярного клонування. Для цього спочатку створюють банк генів досліджуваної бактерії розщепленням її ДНК ендонуклеазами рестрикції, а потім відбирають потрібний клон із суми фрагментів ДНК методом електрофорезу з наступною перевіркою генетичних властивостей цих фрагментів методом трансформації.

Далі обраний фрагмент ДНК лігують до складу відповідної плазмиди (вектора), а цю комбіновану плазмиду вводять в зручний для роботи штам бактерій (наприклад, *Escherichia coli*). З біомаси бактерії, що несе ДНК-зонд, виокремлюють плазмідну ДНК і мітять її, наприклад, радіоізотопної міткою. Потім здійснюють гібридизацію ДНК-зонда з ДНК бактерії. Гібридні ділянки, що утворились проявляють методом авторадіографії. За відносної частоти гібридизації генетичного маркера з хромосоною тієї чи іншої бактерії роблять висновок про генетичну спорідненість цих бактерій з досліджуваним штамом.

Для ідентифікації бактерій і створення філогенетичної системи їх класифікації найбільш широке поширення і значення набув метод аналізу нуклеотидних послідовностей в рибосомальних РНК. Молекули 5S, 16S і 23S рРНК містять ділянки з найвищим ступенем генетичної стабільності. Вважають, що вони перебувають поза механізму дії природного відбору і еволюціонують лише в результаті спонтанних мутацій, що відбуваються з постійною швидкістю. Накопичення мутацій залежить тільки від часу, тому інформація про нуклеотидні послідовності цих молекул вважається найбільш об'єктивною для визначення філогенетичної спорідненості організмів на рівні від підвиду до царства. У разі аналізу 5S рРНК зазвичай визначають повну послідовність нуклеотидів, яка в цій молекулі у прокариотів складає 120 нуклеотидів. При дослідженні 16S і 23S рРНК, що

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

містять 1500 і 2500 нуклеотидів відповідно, часто проводять аналіз олігонуклеотидів, отриманих з цих молекул за допомогою специфічних ендонуклеаз рестрикції. Найбільш широке поширення набуло вивчення послідовності нуклеотидів в 16S рРНК. Вивчення структури 16S рРНК представників різних мікроорганізмів привело до виявлення серед прокариотів групи архей. Значення коефіцієнта подібності SAB, що відокремлюють 16S рРНК бактерій і архей, лежать в межах 0,1, в той час як значення $<SAB$, рівне 1,0, відповідає повній гомології нуклеотидних послідовностей, а 0,02 - рівню випадкового збігу.

Все частіше для ідентифікації бактерій пропонують дендрограми, що показують взаємини між бактеріальними родами, видами або штамми на основі вивчення послідовності нуклеотидів (або олігонуклеотидів) в рРНК, а також ДНК-ДНК і ДНК-рРНК гібридизації. Однак ідентифікація бактерій до родів на підставі тільки генетичних методів без попереднього вивчення їх фенотипових характеристик часто взагалі неможлива. Тому кращим підходом у роботі з систематики бактерій вважається вивчення як генотипових, так і фенотипових властивостей. У разі невідповідності між філогенетичними і фенотиповими даними пріоритет тимчасово віддають останнім.

Особливою проблемою є ідентифікація таких бактерій і архей, особливо морських видів, які не спроможні рости на відомих лабораторних живильних середовищах і для яких тому не можна було отримати чисту культуру. До недавнього часу ця проблема здавалася нерозв'язаною. Однак приблизно 15 років тому були розроблені методи, що дозволили екстрагувати, клонувати, секвенувати і порівнювати рибосомальні РНК прямо з навколишнього середовища. Це дозволило точно порахувати і ідентифікувати мікроорганізми, що населяють даний біотоп без їх виділення в чисту культуру. Ідентифіковані таким чином «некультивовані» в лабораторії мікроорганізми можуть бути навіть описані, але з приєднанням слова «candidatus» (кандидат). Слово «candidatus» буде супроводжувати новий вид до тих пір, поки ученими не будуть знайдені умови культивування цього організму в лабораторій і не буде отримана його чиста культура, що дозволить вивчити всі його властивості та опублікувати в якості узаконеного.

Ідентифікацію бактерій проводять зазвичай за допомогою «Визначника бактерій Берджі» (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology). Перше видання цього посібника було здійснено в 1923 р. під керівництвом відомого американського бактеріолога Д. Берджі (D.H. Bergey, 1860-1937). З тих пір воно регулярно перевидається за участю провідних вчених-мікробіологів світу. В 9-му виданні визначника (1994) усі бактерії розділені на 35 груп за фенотиповими ознаки, що легко визначаються. Ці ознаки винесені в назви груп. Таксономічне положення бактерій всередині груп визначається за допомогою таблиць і ключів, складених на основі

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

невеликого числа фенотипових ознак. Диференціювальні таблиці для диференціації видів бактерій деяких родів, наприклад роду *Bacillus*, не наводяться, а читач відсилається до "Посібника Берджі з систематики бактерій».

У 5-томному «Керівництві Берджі з систематики бактерій» (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001-2011) міститься більш повна інформація про таксономічне положення бактерій. Для кожної групи бактерій дається опис притаманних їм родів і видів, у тому числі з неясним таксономічним статусом. Крім докладного фенотипового опису, що включає морфологію, організацію і хімічний склад клітин, антигенні властивості, вид колоній, особливості життєвого циклу та екології, в характеристиці родів наводяться також відомості про зміст ГЦ в ДНК, результатах гібридизації ДНК-ДНК і ДНК-рРНК. Ключі та таблиці дозволяють ідентифікувати бактерії не тільки до роду, але і до виду. Крім цього є ряд статей і книг, в яких пропонуються оригінальні ключі для ідентифікації окремих груп бактерій, наприклад бацил, псевдомонад, актиноміцетів, ентеробактерій.

Мета роботи. Освоїти роботу з визначником бактерій Берджі.

Матеріали та обладнання. Визначник бактерій Берджі, данні визначення ферментативних властивостей зашифрованих викладачем культур бактерій, предметні скельця з готовими препаратами зашифрованих культур бактерій, мікроскоп, імерсійне масло.

Хід виконання роботи:

1. Уважно промікроскопіюйте з імерсійною системою готовий препарат невідомої Вам культури бактерій, охарактеризуйте морфологію клітин бактерій, їх розмір і забарвлення по Граму (табл.13).
2. Ознайомтесь з даними ферментативних властивостей культури.
3. За визначником бактерій Берджі визначте родини, рід і вид даних мікроорганізмів.
4. Детально запишіть характеристику ідентифікованої культури бактерій в табл.14.

5.1. Ідентифікація мікроорганізмів - продуцентів із природних ценозів без виділення в чисті культури

В останні десятиліття ХХ в. було розроблено досить багато методів для характеристики мікробної різноманітності в природних середовищах

**РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ
ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ**

Таблиця 13

Ідентифікація мікроорганізмів за визначником бактерій Берджі	
Властивість (ознака)	Характеристика
Морфологія колонії:	
- форма	
- розмір, мм	
- колір	
- прозорість	
- край	
- блиск	
- поверхня	
- профіль	
Морфологія клітин:	
- розташування клітин	
- розмір, мкм	
- рухливість	
- наявність ендоспор	
- забарвлення за Грамом	
Середовище існування	
Фізіолого-біохімічні властивості:	
- тест на каталазу	
- тест на оксидазу	
- ставлення до O ₂	
- ставлення до температури	
- окислення та ферментація глюкози	
- ріст на середовищі з крохмалем	
Ферментація цукрів і спиртів	
Протеолітичні властивості	

Таблиця 14

Номер культури	Ідентифікація		
	родина	рід	вид
1			
2			

існування і в першу чергу ґрунту як найбільш складної системи методів, заснованих на екстрагуванні і дослідженні ДНК тотального мікробного ценозу (Muzyer and Smalla, 1998).

До таких методів відносяться: аналіз реасоціації ДНК; гібридизація ДНК мікробного ценозу; визначення профілів процентного складу ГЦ-основ ДНК; порівняльний аналіз сіквенс фрагментів рестрикції ДНК; аналіз поліморфізму фрагментів рестрикції 16S рДНК; рестрикційний аналіз ампліфікованих рибосомальних ДНК 16S рДНК генів; клонування ДНК-фрагментів, отриманих зворотною транскрипцією 16S рРНК і клонування ампліфікованих за допомогою ПЛР рДНК фрагментів,

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

денатуруючий градієнтний гель електрофорез (ДГГЕ в англійській транскрипції - DGGE) 16S РДНК амплікон (Muyzer et al., 1998) та деякі інші. У результаті з'явилася реальна можливість здійснювати виявлення та ідентифікацію відомих бактерій в природних зразках без виділення цих бактерій в чисті культури, а також виявляти присутність в зразку, що досліджується, неідентифікованих (відсутніх у банку даних, колекціях), нових організмів.

При виконанні таких досліджень необхідне проведення ряду послідовних операцій:

1. Перша операція – це руйнування клітин, виділення нуклеїнових кислот (НК) і при необхідності їх додаткове очищення за допомогою відповідних наборів реактивів.

2. Наступна найважливіша операція – ампліфікація досліджуваних ділянок у виділеній суміші НК для збільшення і вирівнювання концентрації цих ділянок (із застосуванням відповідних праймерів - затравок) в результаті полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

3. Після цього проводиться перевірка наявності та чистоти продуктів ПЛР електрофоретично в агарозному гелі.

4. Отримані ПЛР-продукти – концентрована FISH суміш ампліфікованих ділянок НК (амплікон), що належать різним бактеріям, розділяють, наприклад, методом ДГГЕ. Якщо на цій стадії ввести відповідні контролю, то можна провести і попередню ідентифікацію досліджуваних мікроорганізмів. Однак для достовірної ідентифікації, як і для виявлення нових організмів, потрібно буде провести вилучення (вирізання) окремих смуг (амплікон) з електрофореграми гелю і визначення їх нуклеотидних послідовностей (секвенування).

5. Виявлені послідовності порівнюють з даними, наявними в міжнародному банку генів, після чого складають списки виявлених мікроорганізмів і будують філогенетичні схеми мікробного ценозу.

В якості додаткової, але обов'язкової інформації при описі нових мікроорганізмів використовують дані про процентний склад ГЦ-основ ДНК кожної чистої культури і ступінь ДНК-ДНК гомології знову описуваних штамів і відомих або близькоспоріднених з колекцій культур. Однак обидві операції правомірні тільки лише при роботі з чистими культурами.

Кожна з перерахованих вище операцій досить складна і відповідальна і вимагає певних навичок, точної відповідності прописам відповідних методик, а саме головне - використання стандартних реактивів та спеціального обладнання. Залежно від поставленого завдання деякі операції можуть бути виключені, а інші, навпаки, розширені або проведені багаторазово. В результаті таких досліджень можна ідентифікувати окрему чисту культуру, а також отримати перелік мікроорганізмів, вирощених, наприклад, у вигляді окремих колоній на агаризованому середовищі або,

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

більше того, визначити різноманітність мікроорганізмів, існуючих в будь-якій еконіші (екотопі) без попереднього культивування. Існує досить багато й інших методів, що дозволяють охарактеризувати мікробне різноманіття, і в кожному конкретному випадку вибір методу повинен визначатися поставленим завданням.

Як і в традиційних мікробіологічних методах, в молекулярно-біологічних методах є свої обмеження і умовності. Як неможливо виділити на одному середовищі і в одних умовах в чисті культури сильно відмінні за метаболізмом бактерії, так і, наприклад, для виявлення еубактерій і архей молекулярно-біологічними методами потрібні різні праймери. Для ізоляції НК рекомендується використовувати мінімальну кількість зразка, наприклад 0,5 г ґрунту, і, отже, виявлене розмаїття буде відображати екотопи розміром у 0,5 г.

При ідентифікації мікроорганізмів із природних зразків без виділення в чисті культури передбачається, що після проведення ПЛР отримують приблизно рівну кількість амплікон всіх присутніх у зразку бактерій. Однак це може бути далеко не так. У результаті проведення ПЛР з універсальним праймером отримують більше амплікон тих бактерій, чисельність яких була більше в початковому зразку і НК яких із зразка було виділено більше. При поділі продуктів ПЛР-методом ДГГЕ через дуже низьку концентрацію деяких амплікон їх смуги можуть бути важко помітні на тлі інших смуг. З іншого боку, високі концентрації амплікон близькоспоріднених організмів на недостатньо якісній ДГГЕ-фореграмі можуть виглядати у вигляді однієї об'ємної смуги. Крім цих проблем, що легше чи важче перевіряються та розв'язуються, але перевіряються й розв'язуваних, існують і більш важкі завдання, такі, як спонтанний синтез химерних амплікон при проведенні ПЛР, які легко можуть бути прийняті за наявність в зразку нових, неідентифікованих або некультивованих організмів. Зокрема, і через цей факт Міжнародним комітетом по систематиці і таксономії бактерій було прийнято рішення не приймати до розгляду опис нових мікроорганізмів без виділення чистих культур цих організмів.

У результаті проведення всіх стандартних операцій будуть отримані дані, що відображають тільки різноманітність мікроорганізмів у дослідженому зразку за типом «є-ні», але не кількісна присутність кожного виду. Формально вид, представлений у зразку однією клітиною і мільйоном клітин, має рівні шанси бути представленим у списку. Для подолання цієї істотної незручності в даний час розробляються методи кількісної ПЛР. В одному з них використовується внутрішній контроль у вигляді відомих концентрацій НК. Такі стандартні контрольні зразки підлягають ампліфікації поряд з експериментальними. Після проходження відповідної кількості циклів контрольні та експериментальні зразки порівнюються, а кількість НК і число циклів дають можливість

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

розрахувати вихідну кількість того чи іншого мікроорганізму. Однак цей метод має ряд істотних недоліків через високу чутливість кінцевих етапів ПЛР до різного роду хімічних і фізичних факторів.

В іншому, більш точному методі, де використовується TaqMan 5'-нуклеази, має місце визначення накопичення ПЛР-продукту протягом реакції ампліфікації по зміні світіння флуоресцентної проби. При цьому відбувається накопичення флуоресцентного продукту, що призводить до посилення флуоресценції-оресценції, яка пропорційна накопиченню ПЛР-продукту. У цьому методі фактично контролюється кількість циклів, а не кількість ПЛР-продукту після фіксованої кількості циклів. Цей метод і його деякі модифікації отримали назву Real-Time PCR.

5.1.1. Руйнування клітин, виділення і очищення ДНК

Перший етап при ідентифікації мікроорганізмів молекулярно-біологічними методами - руйнування клітин і виділення НК. Відома велика кількість методів, що дозволяють руйнувати бактеріальні клітини як чистих культур, так і мікробних спільнот в зразках природних субстратів. В цілому слід зазначити, що для руйнування клітин чистих культур частіше використовують комбінацію детергентів і літичних ферментів, а для руйнування клітин в природних зразках (грунті, воді та ін.) - механічне руйнування. У тому випадку, якщо збираються проводити ідентифікацію бактерій, представлених колоніями різних розмірів на агаризованому середовищі, для зменшення наступних похибок рекомендується не просто змивати всі колонії, а відібрати рівну кількість біомаси кожній колонії. Відомо, що з 0,1 г сирової бактеріальної біомаси може бути виділено 40 - 200 мкг ДНК в залежності від виду бактерії і умов вирощування. При цьому зі збільшенням обсягу біомаси, використовуваної для виділення ДНК, ефективність виділення знижується.

При виділенні НК з природних зразків, об'єм зразка, використовуваного для виділення НК, залежить від передбачуваної великої кількості в ньому мікроорганізмів, а також типу зразка - вода, ґрунт або ін. Так як в природних зразках, особливо в ґрунті, часто присутні досить багато гумінових речовин, мінімізація зразка визначається і цим чинником. Зазвичай у разі ґрунтових зразків використовують 0,5 - 2,0 г ґрунту (у перерахунку на сухий стан зразка).

Послідовність операцій при руйнуванні клітин і екстрагуванні НК може бути наступною:

1. У пластикову пробірку на 15 мл вносять 2 г ґрунту, заливають 3 мл фосфатного буфера (120 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ з рН 8,0), додають 3 г скляних стерильних бус розміром 0,1 мм. Закривають пробірку відповідної пробкою і поміщають її на 30 с (або два рази по 15 с) під струшувач (Bead Beater, Brown, Germany). У відсутність спеціального струшувачу суспензію

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

зразку в буфері готують у стерильній порцеляновій ступці. Зразок заморожують рідким азотом і пестиком розтирають протягом приблизно 5 хв. до отримання гомогенної маси. Метод застосовують також і для руйнування грибних гіф.

2. Виділення тотальної фракції нуклеїнових кислот зазвичай здійснюють після додавання додецилсульфату натрію (від 30 мкл 10%-го розчину), ретельного перемішування та наступного внесення (від 0,5 мл) холодного водного (30%-го, рН 7,5 - 8,0) розчину фенолу (Duineveld et al., 2001). Суміш перемішують в руках (без використання Вортекс) і витримують на льоду, після чого центрифугують на протязі 5 хв. на центрифугу при 15 тис. об/хв. при кімнатній температурі. При цьому вміст пробірки розшаровується на верхню водну фракцію і нижню - фенольну.

3. Піпеткою відбирають верхню частину супернатанту, намагаючись не захопити нижню фенольну частину. Відібрану верхню частину змішують з рівним об'ємом суміші хлороформу і ізоамілового спирту (24:1), перемішують в руках і відбирають водну фазу.

4. Додають до відібраної водної фази ОД обсягом 5 М NaCl і два об'єми холодного 96%-го етанолу. Суміш витримують на льоду протягом 20 хв. і 1 год. при -20°C .

5. Після цього суміш знову центрифугують 10 хв. на центрифугу при 15 тис. об/хв., але з охолодженням до -6°C .

6. Видаляють супернатант і промивають осад 1,5 мл 70%-го холодним етанолом. Осад виділеної ДНК повинен бути безбарвним (білим). Якщо ізольована ДНК залишається забарвленою (різної інтенсивності коричневий відтінок), то промивання спиртом повторюють. У цій же операції відбувається і видалення солі.

7. Відмитий зразок високополімерної ДНК підсушують на повітрі. Після цього суху ДНК розчиняють в деіонізованій воді і зберігають у замороженому вигляді при -20°C .

Частина отриманого препарату ДНК може бути використана для визначення процентного складу ГЦ-основ ДНК і ступеня ДНК-ДНК гомології, якщо ДНК була виділена з чистої культури. Якщо тотальний препарат ДНК був виділений з зразків природних субстратів, особливо ґрунту, компостів та ін., фактично обов'язковою додатковою стадією є очищення ДНК. Для цієї мети краще використовувати набори реактивів і пристосування (колонки), що випускаються відповідними компаніями. Одна з них - Wizard DNA cleanup system (Promega, USA). Інструкція по застосуванню набору реактивів для додаткової очистки ДНК додається до кожного набору.

5.1.2. Ампліфікація фрагментів виділеної та очищеної ДНК за допомогою ПЛР

Для ампліфікації (збільшення числа копій) окремих фрагментів або сіквенсів (послідовностей) ДНК застосовують полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). Вона відбувається, коли два олігонуклеотидних праймера гібридизуються на дволанцюговій матриці ДНК з двох різних кінців (5' і 3'), що дозволяє ДНК-полімеразі синтезувати ДНК-послідовність, що знаходиться між цими двома праймерами (рис.29).

Для проведення ПЛР необхідно мати: дволанцюгову ДНК-матрицю, що містить ділянку, яка повинна піддатися ампліфікації; праймери (в надлишку!), що представляють собою одноланцюгові фрагменти НК, які можуть «віджигати» (роз'єднувати) нитки ДНК, зв'язуючись з того або іншого кінця з одним з ланцюгів ДНК-матриці, комплементарної праймерам ділянки; суміш (надлишок!) чотирьох дезоксирибонуклеотидфосфатів (ДНФ), з яких буде синтезуватися нова ДНК; ДНК-полімераза - фермент, який здійснює синтез нового фрагмента ДНК, амплікона. В ПЛР зазвичай використовують Taq-ДНК-полімераза, високотермостабільний фермент, отриманий з термофільної бактерії *Thermus aquaticus*. Ця полімераза запатентована фірмою, що її виробляє. Крім цього у реакційну суміш вносять також деякі необхідні компоненти для стабільності протікання реакцій.

ПЛР-продукти, що характеризують більшість ґрунтових бактерій, можна отримати з використанням бактеріальних праймерів U968 і L1401 і схеми сполуки-від'єднання праймерів протягом 30 теплових циклів. 17-мірні праймери U968 і L1401 представляють собою нуклеотидні послідовності, специфічні висококонсервативні 16S РДНК області прокаріотів і відповідні положенню у *E. coli* між 968 і 984; 1385 і 1401 нуклеотидами хромосомної ДНК відповідно.

Структура праймерів: U968 + GC: sequence 5' - (GC clamp)-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3' L140: sequence 5' - CGG TGT GTA CAA GAC CC-3' . Компонент GC clamp (зажим, доважок), являє собою 40-мірний фрагмент ДНК (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3'), призначений для розділення продуктів ПЛР методом ДГГЕ. Типова робоча суміш (master mix), використовувана для ампліфікації ґрунтових і ризосферних бактерій, містить: 23,34 мкл деіонізованої води; 5 мкл спеціального буфера (stoffel buffer), що містить 100 мМ трис-НС1, 100 мМ КС1, рН 8,3; 7,5 мкл (25мм) MgCl₂; 10 мкл суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів: АТФ, ГТФ, ТГФ і ЦТФ; 1 мкл (10 мМ) U968 GC праймера; 1 мкл (10 мМ) L1401 праймера; 0,5 мкл 100%-го формаїд; 0,16 мкл білка T4 гена 32 (білок, що сприяє більш стабільному протіканню реакції); 0,5 мкл AmpliTaq DNA Polymerase, Stoffelfragment (10 од/мкл); 1 мкл ампліфікованої ДНК. Загальний обсяг суміші становить в даному

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

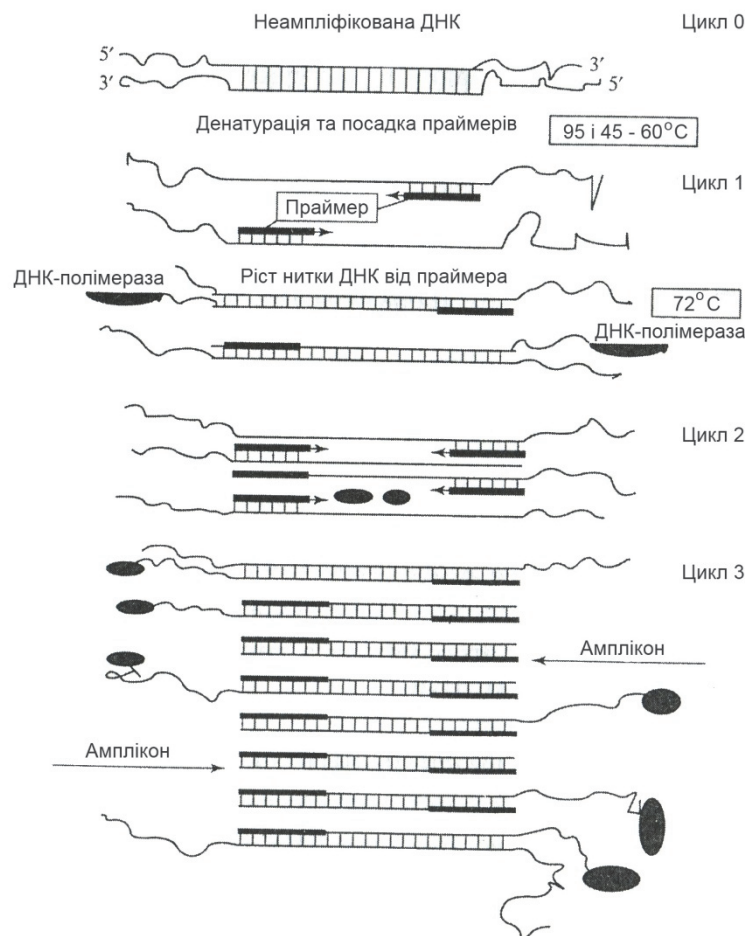


Рис. 29. Схема полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)
(за О.С. Конічевим та Г.А. Севастьяновою, 2003)

випадку 50 мкл (van Dicpeningen et al., 2003). Готову суміш до внесення зразка ампліфікуємої ДНК піддають УФ-опроміненню протягом 3 хв. для стерилізації розчину.

Синхронність в роботі ДНК-полімерази і праймерів досягається за рахунок циклічної зміни температури суміші. Циклічну зміну температури забезпечує прилад ампліфікатор, що працює відповідно до введеної в нього програми. Після кожного циклу в реакцію включається і продукт (амплікон) попередньої реакції в якості ДНК-матриці. У результаті має місце геометрична прогресія збільшення кількості амплікон і після 30 - 40 циклів їх концентрація досягає мільйонів копій (амплікон). Точність відтворення амплікону забезпечується в істотному ступені якістю праймерів.

Надійним ампліфікатором, рекомендованим для роботи, є прилад PTC-200 (DNA Engine (Gradient cyler) BiOzym. The Netherlands) і відповідна програма. Послідовність циклів нагрівання-охолодження та їх тривалість може бути наступна. Початкову денатуруючу стадію проводять при температурі 94°C протягом 3 хв.; далі в кожному циклі денатурація

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

здійснюється при 94°C протягом 1 хв. Початковий відпал праймерів відбувається при температурі 60°C протягом 1 хв. і потім температура знижується на 1°C в кожному другому циклі до 55°C (у перших 11 циклах). У наступних 19 циклах відпал проводять при 55°C і також протягом 1 хв. Час «розтягування» (extension) праймерів дорівнює 2 хв. при 72°C. Заключна стадія «розтягування» здійснюється при 72°C протягом 10 хв. і потім суміш охолоджують до +4°C.

Якість продуктів ПЛР (амплікон), розмір яких при описаних вище умовах буде дорівнює 474 парам нуклеотидів (п.н.), перевіряють електрофоретично в стандартному (1%-м) агарозному гелі з подальшим фарбуванням етідіум бромідом. Продукти ПЛР можна зберігати деякий час при -20°C.

5.1.3. Денатуруючий градієнтний гель-електрофорез (ДГГЕ)

Цим методом проводять поділ фрагментів ДНК однакової довжини, але різних за складом комплементарних пар нуклеотидів (п.н.). Теоретично метод дозволяє розділити амплікон величиною до 500 п. н., що відрізняється всього лише однією парою нуклеотидів (Myers et al., 1998). Отже, цей метод особливо корисний як при порівнянні, наприклад, мікробних спільнот будь-яких зразків, так і при порівнянні вихідних варіантів і мутантів чистих культур. В останньому випадку ПЛР повинна бути проведена із використанням специфічного для даної мутації праймера (функціональним праймером). Разом з тим аналіз ДГГЕ методом ПЛР ампліфікованих екстрактів ДНК з універсальними праймерами, екстрактів, виділених з природних зразків з високою чисельністю та різноманітністю мікроорганізмів (багаті ґрунти, компости та ін.), дозволяє виявити не всю різноманітність, а чисельно домінуючі види.

Поділ в ДГГЕ ґрунтується на зниженні електрофоретичної рухливості частково розплавленої дволанцюжкової молекули ДНК (амплікона) в поліакриламідному гелі, що містить лінійно збільшуваний градієнт денатурантів ДНК, якими є суміш сечовини і формамід. Плавлення фрагментів ДНК забезпечується в дискретних місцях - доменах плавлення, смугах пар основ з ідентичною температурою плавлення. Коли домен, схильний до плавлення, досягає «свого» місця в денатурую чому градієнті гелю, спіральна структура ДНК переходить в частково розплавлений (розщеплений) стан, і рух молекули практично зупиняється. Описаний підхід дозволяє розділити до 50% всіх варіантів досліджуваних послідовностей в фрагментах ДНК довжиною до 500 п.н. Відсоток розділення (чутливість) може бути збільшений практично до 100%, якщо прикріпити до поділених шляхом ДГГЕ ДНК-фрагментів «фіксатори» - нуклеотидні послідовності з високим вмістом ГЦ-основ, які потім будуть діяти як високотемпературні домени плавлення. Прикріплення таких

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

послідовностей здійснюється або в процесі клонування, або при проведенні ПЛР, коли до синтезованих ампліконів прикріплюються додаткові нуклеотидні послідовності розміром від 40 до 50 п.н., які в свою чергу були прикріплені до 5'-кінця праймера при його синтезі.

Таким чином, в методі ДГГЕ задіяні наступні фактори: 1) однаковий розмір (довжина) фрагментів ДНК (однакова кількість пар нуклеотидів), наприклад 474 пари, з відповідними «фіксаторами» на кінцях, отриманими в процесі ПЛР; 2) склад нуклеотидів амплікону; 3) підвищена, але стабільна температура, яка ініціює плавлення фрагментів ДНК, але через різний склад нуклеотидів плавлення цих фрагментів ДНК відбувається сильніше чи слабше; 4) електричне поле забезпечує рух заряджених фрагментів ДНК в гелі з певною швидкістю; 5) наявність в гелі хімічних денатурантів, причому ці денатуранти повинні утворювати в гелі градієнт - від дуже низької концентрації в верхній частині гелю до максимально високої в нижній частині. Найбільш широко використовуваний варіант ДГГЕ - це «паралельний» денатуруючий градієнт, паралельний внаслідок того, що денатуруючий градієнт збільшується в тому ж напрямку, що й напрямок електричного поля.

Робота № 19. Аналіз ДГГЕ методом ПЛР ампліфікованих екстрактів ДНК мікроорганізмів

екстрактів ДНК мікроорганізмів (за Van Diepeningen et al., 2003), можна буде приготувати денатуруючий градієнт в межах від 45 до 60%, де 100%-й денатуруючий ефект створюють 7 М сечовиною і 40%-й формамідом, а 8%-й акриламід без сечовини і формамід забезпечує нульовий денатуруючий ефект.

Матеріали. Кількість посуду і реактивів визначається кількістю досліджуваних зразків: рукавички гумові для роботи в лабораторії; пробірки типу Еппен-Дорф об'ємом від 0,2 до 1,0 мл; автоматичні піпетки з наконечниками і робочими об'ємами від 1 мкл до 5 мл; 4 скляні пластинки, дві розміром 22,3x20 см і дві – 20x20 см; пластикові термостійкі смужки, що визначають товщину гелю (Spacers), товщиною 1 мм; целофанова плівка розміром не менше великих скляних пластин (Amersham Pharmacia Biotech AG, Uppsala, Sweden); «гребінки»; пластмасові прозорі (пружні) пластинки (Gelbond ®), (Amersham Pharmacia Biotech, AG, Uppsala, Sweden, 80-1129-37); шприци різного об'єму з голками.

Устаткування: Магнітні мішалки різних розмірів і потужності; качалка нахилена, що обертається із змінною швидкістю обертання; рН-метр; холодильник; морозильна камера на -20°C; ДГГЕ-машина [The Dcode system, BIORad Laboratories, США] для проведення електрофорезу; блок живлення для ДГГЕ-машини; спеціальний двохкамерний стакан для приготування і створення градієнта; шланги різного діаметру, зокрема 1,7

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

мм (внутрішній діаметр); перистальтичний насос з точно програмованою швидкістю подачі рідини (Heidolph PD 5201, The Netherlands).

Реактиви і їх підготовка для приготування гелю з денатуруючим градієнтом: Іонообмінна смола AG 501-X8 (Bio-Rad, США) і деіонізований формамід (Sigma, США). Останній готують додаванням 12,5 г іонообмінної смоли до 250 мл (100% - го) формамід. Перемішують суміш при кімнатній температурі протягом години. Пропускають розчин через фільтрувальний папір, уникаючи попадання смоли. Зберігають у темряві при температурі 4-6°C. Розчин КОН в метанолі (5%-й) для очищення стекел, використовуваних для приготування гелю. Сечовина-формамід (СФ), 45%-й розчин в 6%-м розчині акриламиду-бісакриламиду. Готують змішуванням 47,3 г сечовини (Bio-Rad, США); 37,5 мл 40%-го акриламиду-бісакриламід (37,5:1, Bio-Rad, США); 45 мл деіонізований формамід; 2,5 мл 50xTAE (трис-Е ЦА) буфера (Bio-Rad, США); 250 стерильної деіонізованої води (ДІВ). Розчин можна зберігати в темному скляному посуді до 6 міс. при 4°C. Сечовина-формамід, 60%-й розчин в 6%-м розчині акриламиду-бісакриламиду. Готують додаванням 63,0 г сечовини, 37,5 мл 40%-го акриламиду-бісакриламід (37,5: 1), 60 мл деіонізований формамід, 2,5 мл 50 x TAE буфера, 250 стерильної ДІВ. Розчин можна зберігати в темному скляному посуді до 6 міс при 4°C. Персульфат амонію (АПС, Bio-Rad, США) готують у вигляді 10%-го розчину (вага/ об'єм) у стерильній ДІВ. Розливають по 400 мкл в 1,0 - 0,5 мл пробірки (Еппендорф) і зберігають при -20°C, кожен раз використовуючи нову пробірку.

Реактиви і їх підготовка для фарбування нуклеїнових кислот в гелі азотнокислим сріблом після форецу: Набір (kit) включає реактиви: азотнокисле срібло (Bio-Rad, США), окислювач та проявник. Наведеної нижче кількості достатньо для обробки двох пластин гелю. Зберігати набір потрібно в холодильнику. Розчин для фіксування гелю готують змішуванням (обсяг/ обсяг) 10%-го етанолу і 5%-ї оцтової кислоти. Для фіксування одного гелю потрібно 400 мл. Для приготування розчину використовують ДІВ. Окислювач готують розчиненням 15 мл (10-кратно концентрованого) реагенту зі згаданого вище набору (Bio-Rad, США) в 150 мл деіонізованої води. Кожного разу необхідно готувати свіжий растеорл срібний барвник (на основі азотнокислого срібла) готують розчиненням 15 мл (10-кратно концентрованого) реагенту зі згаданого вище набору (Bio-Rad, США) в 150 мл ДІВ. Кожний раз готується свіжий растеорл проявник готують розчиненням 16 г проявника, взятого з набору (Bio-Rad, США), в 500 мл ДІВ. Зберігають при 4°C, зупиняється реакція прояву розчину, що складається з 5%-го розчину оцтової кислоти в ДІВ. Консервуючий розчин для гелю складається з суміші 25% етанолу (обсяг/обсяг) і 10% (обсяг/обсяг) гліцеролу. Розчин може бути використаний багаторазово.

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

Завантажувальний буфер (ЗБ) складається з 1,5 мл гліцерину і 12,5 мг бромфенол блакитного (БФГ) в 5 мл ДІВ.

Хід роботи:

1. Ретельно вимити великі скляні пластинки з миючим засобом і м'якою (не дряпає скло) губкою. Промити водопровідною і ДІВ. Висушити скельця. Промити чистим (96%) етанолом, протерти чистою бавовняною серветкою. Скляні пластинки меншого розміру починають мити спочатку сумішшю КОН/метанол, а далі так само, як і великі.

2. Вирізати пластинки (Gelbond ®) за розміром великих скелець, не видаляючи папір, що їх покриває. Близько 0,5 мл налити на одну з поверхонь великого скла і накрити скло вирізаною платівкою гідрофобною стороною до скла. Виявлення гідрофобного боку пластинки здійснюється нанесенням на неї краплі води: на гідрофобній стороні вода не розтікається.

3. Ретельно розгладити пластинку на поверхні скла (не допускати утворення повітряних бульбашок) і після цього видалити папір. Висушити пластинку за допомогою етанолу і чистої бавовняної серветки. Обдути поверхню підсушеної пластинки струменем чистого повітря. Обдути поверхню другого (меншого) скла.

4. Відмити 96%-м етанолом пластикові термостійкі смужки, що визначають товщину гелю (Spacers). Нанести пальцем (в рукавичці) вазелін на край скла покритого платівкою Gelbond ®. Ширина вазелінової смужки ~ 1 см. Покласти на вазеліновий шар спейсера, покрити їх зверху вазеліном і покласти меншою стороною, промитою в КОН в етанолі, всередину.

5. Помістити «сандвіч» із скла в спеціальний утримувач, компонент ДГГЕ-приладу. Закрутити рівномірно затискачі тримачів. Всі краї повинні бути ідеально рівними і платівка ніде не повинна виступати. Замазати вазеліном отвір між стеклами і нижньою частиною «сандвіча». Промазати акуратно вазеліном бічні сторони «сандвіча» (там, де вставлені спейсери).

6. Промазати вазеліном нижню пластикову смужку, що лежить в спеціальному штативі, на яку встановлюють «сандвіч» із скла, і встановити скло, затиснувши його в тримачі, в цей штатив. Дещо послабити затискачі утримувача і за допомогою спеціальної пластинки (вона додається до приладу), вставляючи її між стеклами, перевірити простір. При цьому не можна торкатися вазеліну, який може виступати збоку, а особливо на дні «сандвіча» із скла. Затиснути затискувач. Якщо «сандвіч» із стекол виявиться не герметичним, то, при заливанні в нього гелю, останній буде просто витікати.

7. Штатив з «сандвічем» із скла повинен бути встановлений на суворо горизонтальній поверхні. При необхідності приготувати два таких «сандвіча» із скла.

Приготування пластинок гелю з денатуруючим градієнтом.

8. Розморозити одну пробірку з АПС.
 9. Вставити в шланг для подачі гелю з двокамерного стакана нову голку. Відкрити отвір, що з'єднує камери склянки, відкрутивши затискувач. Промити обидві камери ДІВ, відкачуючи ДІВ за допомогою перистальтичного насоса при швидкості 110 мл/хв. Висушити систему, продуваючи стиснутим повітрям. Закрити отвір, що з'єднує камери склянки.
 10. Приготувати розчини, які містять 45%-й розчин сечовини-формаміду (низька концентрація, НК), 60%-й розчин сечовина-формамід (висока концентрація, ВК) і «закріплювач» гелю в 50 мл пластикових пробірках (підписаних!).
 11. Додати АПС і ТЕМЕД (тетраетил метилен діамін) до низької і до високої концентрацій сумішей сечовина-формамід (СФ) і негайно приступити до виконання операцій (5-8).
 12. Перелити розчин СФ високої концентрації в праву частину двокамерного стакана, низької концентрації - в ліву. Включити магнітну мішалку. Голку, з'єднану зі шлангом, що відходить від двокамерного стакана і проходить через перистальтичний насос, опустити між стеклами «сандвіча».
 13. Відкрити отвір, що з'єднує камери стакана, відкрутивши затискувач, і негайно включити перистальтичний насос зі швидкістю 4,0 мл/хв. Уважно контролювати процес заповнення простору між склом та сумішшю розчинів. Перевірити, чи немає витoku розчинів!
 14. Перекачування гелю займає 10 хв. Як тільки розчини будуть повністю перекачані між склом, відразу ж ретельно промити двокамерний стакан і трубку ДІВ, перекачуючи воду тим же насосом, але зі швидкістю 10 мл/хв., і висушити стисненим повітрям. Після цього голку замінити новою.
 15. Ретельно вимити, в тому числі 96%-метанолом, і потім висушену «гребінку», що створює 16 кишень (в які вноситимуться продукти ПЛР), вставити в простір між стеклами, які до цього часу мають бути майже повністю заповнені гелем.
 16. Внести 10%-й АПС і ТЕМЕД в закріплювач. Швидко набрати цей розчин у шприц об'ємом 10 мл, насадивши при цьому нову голку, і нанести його на поверхню ще не застиглому гелю між склом під «гребінку», так щоб гель ледь виступав над низьким склом. Не допускати утворення повітряних бульбашок як на попередньому, так і на даному етапі. Ретельно промити шприц дистильованою водою.
 17. Залишити гель на 1 год. для полімеризації.
- Електрофорез ДНК в денатуруючому градієнті гелю.**
18. Залити свіжоприготовлений 0,5 x ТАЄ буфер в «ванну» ДГГЕ-машини до позначки «Fill» (7 л).

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

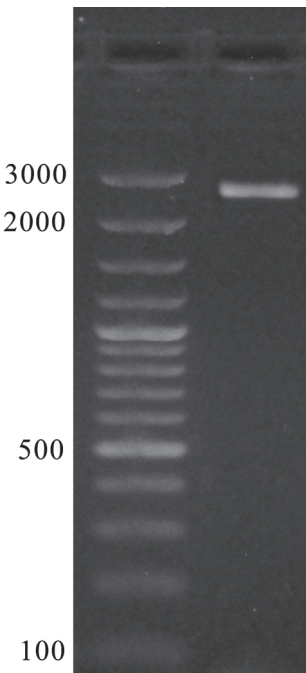
19. Встановити верхню частину ДГГЕ-машини, що містить блок підключення до електроживлення та ін., на «ванну» з буфером і включити прилад (DCode™, США) принаймні за 60 хвилин до початку електрофорезу, з тим щоб буфер встиг нагрітися до 60°C. Мішалку під «ванною» і перемішувальний насос поки не включати.

20. Після години полімеризації гелю обережно видалити «гребінку». Вийняти з штатива тримач з затверділим гелем між склом. Відмити гарячою водою залишки вазеліну з поверхонь. Промити «кишені» в гелі 0,5xTAE буфером за допомогою шприца.

21. Відключити ДГГЕ-машину, почекати 1 хв., зняти верхню частину приладу. Помістити «сандвіч» із стекл з гелем в утримувач, який знаходиться у «ванні» ДГГЕ-машини з гарячим буфером. Обидва утримувача в «ванні» приладу повинні бути заповнені «сандвічами» з гелем або без (холостий варіант). Встановити верхню частину приладу, що містить блок підключення до електроживлення, на «ванну» і під'єднати до блоку управління електроживлення.

22. Включити ДГГЕ-машину, включити верхню мішалку і мішалку, що знаходиться під «ванною» машини (300 об/хв.). Залишити в такому стані на період підготовки зразків.

23. Підготувати досліджувані зразки ДНК. Виключити прилад. Почекати 1 хв. Зняти верхню частину. Внести досліджувані зразки в «кишені» гелевих пластинок. Якщо зразків багато і їх вносять у всі «кишені» обох «сандвічів», то послідовність заповнення кишень другого гелю здійснюють в дзеркальному порядку щодо першого гелю. Не використовувати «кишені» 1, 2 і 15, 16. Для внесення зразків ДНК в «кишені» використовують не традиційні, а спеціальні наконечники з видовженими носиками. Повернути верхню частину приладу на місце.



24. Провести настроювання (при необхідності) програми блоку живлення (16 год., напруга 100 В) і самого ДГГЕ-приладу і включити його. Система надійно працює протягом заданого часу і автоматично відключиться після його закінчення.

Інтерпретація результатів ДГГЕ. Після електрофорезу продуктів ПЛР отримують фореграму ампліконів у вигляді горизонтальних смуг, по ширині відповідних ширині зубців використаної «гребінки», що мають «товщину», залежну від концентрації кожного амплікону (рис. 30).

**Рис. 30. Гель-електрофорез
плазмідної ДНК.**

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

З урахуванням деяких особливостей і обмежень, перерахованих у вступі, результати ДГГЕ-аналізу можуть бути інтерпретовані таким чином. Формально кожна смуга (амплікон) належить відповідному виду. Відповідно, підрахунок кількості смуг в кожній доріжці є однією з характеристик мікроорганізмів аналізованого зразка. Має значення і відстань кожної смуги від початку фореграми. Ця відстань залежить від нуклеотидного складу амплікону. Відстань краще розраховувати у відносних одиницях, тобто щодо відповідних контролів, маркерів, які зазвичай розташовують по краях фореграми, а іноді ще й в середині. В якості маркерів використовують синтетичну суміш ампліфікованих 16S рДНК бактеріальних клонів з відомими відмінностями в денатуруючих

характеристиках. У реальних дослідженнях добре зарекомендували себе маркери, які є фрагментами 16S рДНК клонів бактерій: *Eubacterium halii* A07, *Fusobacterium pmusnitzii* A10, *Butyrivibrio fibrisolvens* A11, *Eubacterium plautii-like* A27, *Clostridium celerecrescens*-Wkz A54, *Ruminococcus obeumke* A57, *Eubacterium formicigenerans-like* All і *Bifidobacterium* XII. Істотне значення має і оптична щільність смуг. Останній показник відображає концентрацію ідентичних амплікон і фактично кількість ДНК (кількість клітин) відповідної бактерії в початковому зразку. Щільність смуг на ДГГЕ-фореграмі аналізують після сканування кожної фореграми і перенесення інформації в комп'ютер. Для аналізу щільності смуг використовують спеціальну програму Phoretix ID (NonLinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, UK).

В даний час для аналізу складних фореграм, одержуваних в результаті аналізу природних зразків, використовують комплекс спеціальних комп'ютерних програм, суміщених зі статистичним аналізом результатів. Як приклад такого комплексного підходу можна рекомендувати кластерний аналіз, дискримінантний аналіз (SAS Institute, Inc., Cary, USA), індекс Шенона та ін.

5.1.4. Виявлення і визначення мікроорганізмів FISH – методом

Для виявлення та визначення мікроорганізмів у природних зразках і після вирощування їх на середовищах розроблений метод гібридизації флуоресцентних олігомерних нуклеотидних послідовностей з нуклеїновими кислотами цілих клітин - fluorescent in situ hybridization (FISH).

Традиційно для виявлення присутності мікроорганізмів в тому чи іншому природному середовищі або в накопичувальній культурі потрібно було виділити ці мікроорганізми в чисту культуру і провести їх ідентифікацію. Пізніше були розроблені імунофлуоресцентні методи (ІФМ), що дозволяють виявити цікавлячий дослідника організм без виділення в чисту культуру. В основі будь-яких модифікацій ІФМ

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

використовується взаємодія антиген-антитіло, яке з'єднане з флуоресцентним фарбником. Специфічність реакції антиген-антитіло висока, тому й вірогідність виявлення мікроорганізмів в природних зразках або накопичувальних культурах теж висока. Недоліком є відносно довга процедура приготування сироваток з флуоресцентними барвниками, існування перехресних реакцій, а найголовніше - «віддаленість» реакції антиген-антитіло від генетичного коду досліджуваного організму. І хоча ІФМ використовуються широко, в даний час отримують перевагу методи, засновані на ідентифікації специфічних для конкретного організму нуклеотидних послідовностей ДНК (рРНК). До таких методів відносяться вже згаданий ДГГЕ, клонування і сіквенс специфічних послідовностей ДНК. Однак і ці методи теж мають свої недоліки, і головний з них - використання ПЛР, результати якої поки ще не можуть бути точно «конвертовані» у чисельність конкретного мікроорганізму. Недоліків ІФМ і деяких молекулярно-біологічних методів позбавлений метод, заснований на взаємодії забарвлених флуоресцентно олігонуклеотидних проб з відповідними ділянками 16S рРНК цілих клітин (FISH). Більш того, за допомогою цього методу можна враховувати навіть не культивуємі на середовищах мікроорганізми. З назви методу ясно, що цей метод заснований на використанні флуоресцентної мікроскопії, тому можливе його застосування для кількісного обліку клітин мікроорганізмів і методу проточної флуороцитометрії (ПФЦМ). Природно, як і будь-який інший метод, FISH має свої особливості. Наприклад, його чутливість залежить від типу використовуваного для досліджень зразка, застосованої молекулярної проби, виду барвника, ефективності фарбування (зв'язування) проби з барвником, умов проведення гібридизації та ін.

Для використання FISH-методу необхідно мати олігонуклеотидні проби, які можуть бути синтезовані, якщо дослідник знає послідовності нуклеотидів в 16S рРНК. Корисна інформація для створення відповідних проб може бути отримана в базі даних «Ribosomal Database Project». Нижче наводиться достатньо докладна методика виявлення та обліку бактерій в зразках, зокрема для виявлення *Ruminococcus obeum*-подібних бактерій за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Як зазначалося, умови гібридизації для різних мікроорганізмів повинні підбиратися індивідуально.

Досліджувані зразки повинні бути підготовлені, як і у випадку традиційного обліку мікроорганізмів з використанням флуоресцентного мікроскопа, тобто повинна бути проведена десорбція клітин, якщо, наприклад, зразок містить яку-небудь тверду фракцію, підібрано оптимальне розведення і т.д. На поверхню предметних стекол, попередньо покритих тонким шаром желатини, наноситься певний обсяг досліджуваного зразка. Скло зі зразком висушують 20 хв. при 45°C. Підсушені препарати піддають дегідратації, занурюючи препарат на 2-3 хв.

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

в ряд із збільшенням концентрацій (градієнту) розчинів етанолу від 50 до 75% і далі до 96%. Після цього на препарат наносять 10 мкл «гібридизаційних» буферів (0,9 М NaCl; 20 мМ трис-HCl; рН 7,5; 0,1%-й додецилсульфату натрію, ДСН). Використовуваний обсяг гібридизаційного буфера повинен містити (для даної конкретної методики і з урахуванням використовуваного обсягу), наприклад, 3 нг СУЗ-міченої Urobe63 проби на кожен мікролітр або 5 нг флуоресцеїнізотіоціонату (ФІТЦ)-міченої Eгес482 проби на кожен мікролітр. Потім препарат поміщають в термостат (відвертаючи його висихання) і інкубують при 50°C протягом 3 год. у темряві. Після процесу гібридизації препарати промивають при струшуванні, поміщаючи на 10 - 20 хв. в 50 мл гібридизаційного буфера, але без SDS.

Для того щоб крім виявлення та обліку певного організму провести облік тотальної кількості клітин у досліджуваному природному зразку, в промивний буфер можна додати флуоресцентний барвник DAPI в концентрації 100 нг/мл. Після промиваючого буфера препарати слід промити у воді і негайно висушити на повітрі. Облік клітин за допомогою флуоресцентного мікроскопа проводять візуально або за допомогою цифрової камери і комп'ютера здійснюють імідж-аналіз отриманих знімків. Розрахунок кількості клітин виробляють, як і при традиційному обліку клітин, під мікроскопом. Приготовлені препарати деякий час можна зберігати при -20°C.

5.1.5. Застосування мікрочіпів в мікробіологічних дослідженнях

Високоєфективне і швидке виявлення мікроорганізмів і їх ідентифікація в природних зразках - одне з основних завдань практичної мікробіології. Інший найважливіший напрям - виявлення мутацій в геномах організмів і тестування експресії генів. При вирішенні цих завдань все частіше застосовуються методи молекулярної біології. Найбільше значення такі методи набувають у випадках, коли потрібно в найкоротші терміни проаналізувати зразок на присутність хвороботворного агента, наприклад для обмеження поширення високо контагіозних захворювань, або якщо діагностика класичними культуральними методами трудомістка і займає дуже багато часу.

Імунно-флуоресцентний аналіз (ІФА) та FISH-метод дозволяють специфічно виявляти і враховувати клітини, що містяться в досліджуваному зразку. Однак обмеження обох підходів полягає в можливості виявлення мікроорганізмів тільки того виду, до яких були приготовлені імунні або ДНК-проби (зонди). Для виявлення клітин, що належать до різних таксономічних одиниць в одному і тому ж зразку, молекулярні зони (крім специфічності до різних мікроорганізмів) повинні нести різні мітки, в іншому випадку їх не можна буде розрізнити. Таким

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

чином, першим лімітуючим фактором широкого використання FISH є число доступних барвників, другим - проникнення молекулярної проби в клітину і процес зв'язування проби з комплементарною ділянкою нуклеїнової кислоти всередині клітини, третім, не менш важливим, - макроскопічні розміри використовованого скла, а отже, великі затрати праці та дорогих реагентів та ін.

Одного з перших двох недоліків позбавлений метод точкової гібридизації (dot-blot), коли на спеціальній підкладці (наприклад, фільтрі) закріплюють молекулярну пробу (олігонуклеотидних послідовностей, часто радіоактивно мічену), що належить виду мікроорганізму, який вивчається дослідником. Після цього на фільтр наносять ізольований із зразка розчин тотальної нуклеїнової кислоти (НК). Після гібридизації і видалення незв'язаних НК визначають, чи була в дослідженій пробі НК, що належить мікроорганізму, чи ні. Однак цей метод, так само як і FISH, має недолік, пов'язаний з його макроскопічністю і, отже, високою трудомісткістю.

Багатьох недоліків методів dot-blot і FISH для аналізу зразків на наявність мікроорганізмів і вірусів вдалося уникнути при використанні технології біологічних мікрочіпів (слово «чіп» з англійської мови перекладається як «кристал» або «мікро-схема»). Метод біологічних мікрочіпів заснований, як і безліч інших методів, на здатності комплементарних одноланцюгових молекул нуклеїнових кислот до гібридизації. Гібридизація - це процес, в результаті якого дві комплементарні одноланцюгові нитки нуклеїнової кислоти утворюють стабільну дволанцюгову спіраль. Реакція гібридизації може відбуватися між двома комплементарними ланцюжками (молекулами) в розчині або між молекулами в розчині і комплементарними молекулами, іммобілізованими на твердій підкладці.

Застосування гібридизаційного аналізу на олігонуклеотидних мікрочіпах не тільки спрощує процедуру дослідження, але і надає принципово нові можливості для одночасної ідентифікації і вивчення цілого ряду генетичних локусів мікроорганізмів і вірусів. Технологія біологічних мікрочіпів дозволяє автоматизувати процес ідентифікації біологічних об'єктів.

Біологічний мікрочіп - це певна впорядкована множина мікроскопічних осередків, кожна з яких містить індивідуальний зонд і є, таким чином, самостійною реакційною одиницею. Відомо декілька принципово різних підходів до виготовлення мікрочіпів (DNA Microarrays, 1999). В Інституті молекулярної біології РАН традиційно розробляються так звані трьохмірні біочіпи, кожна клітинка яких являє собою мікроскопічну краплю поліакриламідного гелю (близько 200 мкм завтовшки), у якій рівномірно іммобілізовані ДНК-проби. Тривимірна пориста структура гелю дозволяє іммобілізувати проби в набагато більшій

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

кількості в порівнянні з плоскою поверхнею, а значить, підвищити чутливість аналізу. В якості носія для осередків використовуються звичайні предметні скла, тобто тверді, непористі підкладки.

ДНК-проби - штучно синтезовані олігонуклеотиди, що складаються зазвичай з 15 - 20 основ. Кожна з таких проб повністю відповідає (комплементарна) ділянці гена одного певного мікроорганізму чи вірусу, що і дозволяє проводити їх ідентифікацію. Чим більше таких проб на біочіпі, тим більший спектр мікроорганізмів або функцій можна проаналізувати на їх наявність або відсутність у зразку.

Для здійснення аналізу на мікрочіпі НК, що міститься в досліджуваному зразку, повинна бути відповідним чином підготовлена. У разі аналізу геномної ДНК застосовують підхід ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) для того, щоб збільшити вміст в зразку даного дослідника фрагмента ДНК. Якщо ж для аналізу вибирається РНК, зазвичай застосовують зворотну транскрипцію з наступною ампліфікацією (ЗТ-ПЛР). При цьому праймери, використовувані в ПЛР, «несуть мітку (частіше флуоресцентну), що дозволяє повністю позначити всі утворювані ДНК-мішені. Альтернативним підходом є фарбування ДНК після ПЛР спеціальними барвниками. В даний час є можливість готувати чіпи з різнокольоровими флуоресцентними барвниками.

Після підготовки досліджуваного матеріалу необхідно провести гібридизацію ДНК-мішеней з пробами, іммобілізованими на мікрочіпі. Процес гібридизації проводять у гібридизаційній камері. Час інкубації, температуру і вологість в камерах підбирають експериментально, здійснюючи процес при кімнатній або при підвищеній температурі, наприклад при 62 °С, з формамідом або без і т.д. Причому реакція йде лише з тими пробами, які відповідають присутній у зразку НК. Після закінчення цього часу препарат промивають і далі спостерігають світіння. Оскільки НК, що містяться у зразку, «перекладені» в форму порівняно коротких ДНК-мішеней, несучих флуоресцентну мітку, осередки, де пройшла реакція, починають світитися. Досліднику залишається лише врахувати, які клітинки засвітилися, і зробити висновок про наявність у зразку тих або інших мікроорганізмів або вірусів. При аналізі (візуальному під флуоресцентним мікроскопом або після мікросканування і використання відповідної програми - імідж-аналізу) будуть виявлятися ті свічені мікроплями, де відбулося зв'язування мішені з пробою. Сигнали розглядають як значущі, якщо їх світіння перевищує певний пороговий рівень, який встановлюється в попередніх експериментах.

Для виготовлення біологічних мікрочіпів повинна бути проведена велика підготовча робота. Спочатку формулюється завдання дослідження, окреслюється спектр об'єктів, ідентифікація яких представляє інтерес. Після цього проводиться вибір генетичних мішеней - ділянок всередині геномів мікроорганізмів, послідовності яких характерні лише для

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

представників того чи іншого виду або роду. Можна обрати найбільш консервативні послідовності в генах, відповідальних за синтез, наприклад 16S - 18S або 23S-28S рДНК і, отже, відповідно в майбутньому виготовлений чіп буде розпізнавати певну філогенетичну групу мікроорганізмів, тому його можна назвати «філочіпом». Можна обрати послідовності, які характеризують певний організм за його деякими, цікавлячими дослідника функціями, наприклад по гену, відповідальному за синтез верококсіна у бактерії *E. coli* 0157: H7. Тоді виготовлений чіп слід називати «функціональним».

Вибрані нуклеотидні послідовності в подальшому використовуються для конструювання праймерів. Основна вимога до праймерів, - їх специфічність тільки до представників одного таксона (виду або роду). Для перевірки такої специфічності проводять так званий BLAST-аналіз, тобто порівняння певних послідовностей з послідовностями інших мікроорганізмів і вірусів. Якщо виявляється гомологія обраного праймера з ділянками геномів інших організмів, такий праймер бракується і процес вибору повторюється.

Після цього здійснюють синтез праймерів, введення в них флуоресцентної мітки, а також синтез проб для іммобілізації.

Олігонуклеотидні проби зазвичай мають такі характеристики, як назва (умовна, дається розробником), специфічність, наприклад універсальна (тобто для всіх бактерій), або групоспецифічна (наприклад, для α -підгрупи протеобактерій), або функціонально-специфічна і т.д., сіквенс проби в напрямку від 5'-до 3'-кінця, 16S рРНК зв'язує сайт (зазвичай місцеположення вказується по місцезнаходженню в гені 16S РНК *E. coli*), процентний склад ГЦ-проби, а також номер невідповідності з мішенню, в тому випадку якщо така невідповідність є.

Подальший етап підготовки мікрочіпа - іммобілізація синтезованих ДНК-проб, по завершенні якої чіп формально можна вважати готовим. Однак з цього моменту дослідник приступає до його тестування, після чого можуть бути змінені послідовності проб, схема підготовки матеріалу, умови проведення гібридизації, тобто формується остаточний варіант методу аналізу.

За допомогою технології мікрочіпів, за наявності готових чіпів і відповідного обладнання, кваліфікований фахівець може провести аналіз досить великої кількості зразків всього лише протягом декількох годин.

**5.2. Визначення чутливості мікроорганізмів
до антибіотичних речовин**

Метод агарових блоків

1. Після застигання агару продуцент антибіотичних речовин висівають суцільним газоном. Для цього спори актиноміцетів переносять петлею на агарову пластинку, розподіляють по всій поверхні шпателем і витримують у термостаті при 28 - 30°C протягом 8-10 діб.

2. Потім стерильним пробочним свердлом (діаметр 6-8 мм) вирізують агарові блоки з газоном актиноміцетів і переносять їх на поверхню агаризованого середовища, наприклад МПА, засіяного тест-організмом. Агарові блоки розкладають за шаблоном на рівній відстані один від іншого і на відстані 1,5 - 2,0 см від краю чашки міцелієм вгору і щільно притискають до агарової пластинки. Для кращої дифузії антибіотичних речовин в товщу поживного середовища, засіяного тест-організмом, блоки можна розкласти безпосередньо в лунки, попередньо вирізані тим же свердлом. На одній чашці Петрі з тест-організмом можна розмістити 4-5 агарових блоків з різними продуцентами антибіотиків.

3. Чашки витримують 1 год. при кімнатній температурі для дифузії антибіотичних речовин в товщу агару, потім поміщають в термостат при температурі, сприятливій для розвитку тест-організму на добу і більше в залежності від швидкості його росту.

4. Якщо тест-організм чутливий до антибіотичних речовин продуцента, то після інкубації навколо агарових блоків утворюються зони відсутності його росту. Чим більше виділяється антибіотика і чим він активніший, тим більше буде діаметр зони відсутності росту тест-організму. Тест-організм, не чутливий до антибіотичних речовин даного продуцента, росте по всій поверхні середовища, біля блоку продуцента.

Метод паперових дисків

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків зручно визначати за допомогою готових паперових дисків, просочених певними антибіотиками. Концентрація антибіотиків у дисках підібрана з таким розрахунком, щоб діаметри зон затримки росту стандартних тест-організмів становили 28 - 32 мм.

1. Досліджувані мікроорганізми вирощують на відповідному щільному живильному середовищі.

2. Готують однорідну суспензію клітин у стерильній водопровідній воді. В 1 мл суспензії повинно міститися близько 2 млрд. клітин (визначають за стандартом мутності).

3. Вносять 1 мл суспензії в пробірку з 20 мл стерильного розплавленого і остиглого до 50°C агаризованого середовища,

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

наприклад МПА. Якщо мікроорганізми вирощували в рідкому живильному середовищі, то в агар вносять відповідний обсяг культури.

4. Вміст пробірки швидко і ретельно перемішують і виливають у стерильну чашку Петрі. Коли середовище застигне, на його поверхню поміщають паперові диски на рівній відстані один від одного і на 1,5 - 2,0 см від краю чашки.

5. Чашки витримують 2 год. при кімнатній температурі для кращої дифузії антибіотиків у товщу агаризованого середовища, а потім 24 год. при 28 – 30°C.

6. Якщо досліджувані мікроорганізми чутливі до даних антибіотиків, то навколо дисків утворюються зони відсутності росту. Діаметр зони вимірюють міліметровою лінійкою. Зона більше 30 мм свідчить про високу чутливість мікроорганізму до антибіотика, а менше 12 мм - про слабку чутливість.

При наявності розчинів антибіотичних речовин або культуральних рідин, що містять антибіотик, використовують **метод із застосуванням лунок в товщі агару**. У цьому випадку в застиглому агаризованому середовищі, засіяному випробуваним мікроорганізмом, стерильним пробочним свердлом (діаметр 6 - 8 мм) роблять лунки на відстані 1,5 - 2,0 см від краю чашки. В лунки вносять розчини антибіотиків або культуральну рідину. Цей метод дозволяє також виявити здатність до утворення антибіотичних речовин мікроорганізмами, вирощеними в рідкому середовищі.

Робота № 20. Визначення антагоністичної активності штамів

Для виявлення мікробів-антагоністів і вивчення їх антибіотичної активності існують різні методи. Багато з них засновані на здатності антибіотиків дифундувати в щільних середовищах. Метод агарових блоків полягає в наступному: поверхня живильного середовища, придатного для розвитку випробуваного організму і утворення антибіотичної речовини, засівається суцільним «газоном» антагоніста (рис.31).

Після того, як мікроорганізми утворюють колонії, у кінці експоненціальної фази почне утворюватись антибіотична речовина, яка дифундує в товщу агару (для бактерій - 4-5 діб, для грибів - 6-8 діб, для актиноміцетів - 8-10 діб). Після цього стерильним пробочним свердлом вирізають агарові блочки і переносять їх на поверхню іншої агарової пластинки в чашці Петрі, попередньо засіяної тест-організмом. Після інкубації в термостаті (час інкубації залежить від швидкості росту тест-культури) навколо агарових блоків утворюються зони відсутності росту

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

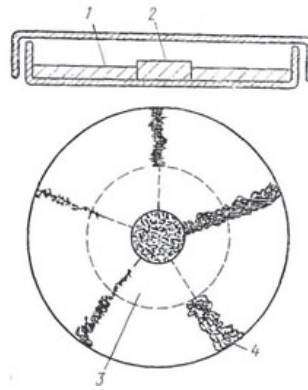


Рис. 31. Визначення антагоністичної активності мікроорганізмів - антагоністів:

1 – середовище для розвитку тест-організму; 2 – агаровий блок з антагоністом; 3 – зона дифузії антибіотику; 4 – штрих тест-організму.

тест-організму, якщо антибіотичну речовину, що виділяється досліджуваним організмом, пригнічує ріст тест-мікроорганізма. За діаметром зон встановлюють антибіотичну активність досліджуваного мікроорганізму.

Мета роботи: дослідити антагоністичні відношення між різними групами мікроорганізмів, виділених з ґрунту. Дослідити антагоністичні властивості тест-культур.

Обладнання та матеріали: чисті культури мікроорганізмів-антагоністів – *Bacillus subtilis* та ін. Чисті культури бактерій в пробірках або чашках Петрі з МПА, бактеріологічні петлі, спиртівки, стерильні пробірки, предметні скла, чашки Петрі з МПА, термостат.

Хід виконання роботи

1. З агаризованого середовища з культурою актиноміцетів вирізати пробковим свердлом блок і перенести його (культурою догори) у центр іншої чашки Петрі з агаризованим середовищем;
2. Радіальними штрихами до агарового блоку (колонії-антагоніста) підсіяти суспензії тест-культур. Штрих починати від центру до периферії чашки.
3. Інкубувати посіви при температурі 37°C протягом 24 год. Через 24 год. виміряйте діаметр зони затримки росту культури навколо кожного диска з антибіотиком і визначте ступінь чутливості культури за наступними критеріями:
 - а) діаметр зони затримки росту більше 25 мм - культура високочутлива;
 - б) від 15 до 25 - чутлива;
 - в) від 10 до 14 - малочутлива;
 - г) менше 10 мм і повна відсутність - стійка.
4. Результати оформіть у вигляді табл. 15.

**РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ
ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ**

Таблиця 15

Визначення антагоністичної активності мікроорганізмів

Культура мікроорганізмів- антагоністів	Найменування або номер дослідної культури			
	1		2	
	Діаметр зони затримки росту, мм	Ступінь чутливості	Діаметр зони затримки росту, мм	Ступінь чутливості

Контрольні питання:

1. Що таке антагонізм?
2. Назвіть мікроорганізми-продуценти антибіотиків.
3. Які методи застосовуються для визначення антагоністичної активності?
4. На які категорії поділяють взаємовідносини між мікроорганізмами?
5. Які групи взаємовідносин між мікроорганізмами відносять до сприятливих? Наведіть приклади.
6. Які групи співіснування мікроорганізмів виділяють у категорії “антагоністичні взаємовідносини”?
7. Де знайшло застосування явище мікробного антагонізму?

5.3. Індукція мутацій у клітинах штамів-продуцентів

Мутації, тобто успадковані зміни в генетичному матеріалі, є важливим біологічним явищем, оскільки обумовлюють, поряд з механізмами переносу генів, генетичну мінливість живих організмів. Вивчення мутантних штамів бактерій значно полегшує дослідження процесів, що протікають в клітині на молекулярному рівні. Сучасні методи картування мутацій дозволяють локалізувати гени або навіть групу генів, що відповідають за певний фенотип. Крім того, наявність достатнього набору мутацій полегшує визначення ферментативних стадій в біохімічних перетвореннях, дає можливість виявити і охарактеризувати нові біосинтетичні і регуляторні системи. Вивчення білків, змінених в результаті мутацій, дозволяє передбачати їх просторову структуру, визначати ділянки на білковій молекулі, відповідальні, наприклад, за зв'язування субстрату або ефекторної молекули (невелика молекула, зв'язується з репресором або ферментом, що призводить до їх пригнічення або активації). Мутації є основою селекції мікроорганізмів з корисними властивостями, штамів-продуцентів антибіотиків, амінокислот або вітамінів.

У популяції мікроорганізмів мутанти можуть виникати спонтанно за рахунок нормальних клітинних процесів (рекомбінації, реплікації і репарації), а також у результаті впливу факторів зовнішнього середовища.

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

Однак частота виникнення мутантів в результаті спонтанних мутацій досить низька, наприклад у *E.coli* частота такого процесу зазвичай не перевищує 10^{-9} на ген клітин за покоління. У тих випадках, коли певна мутація призводить до визначеного фенотипу, що дозволяє відбирати мутантні клітини і популяції, виявити такі рідкісні події не являється складним. На жаль, не завжди існує можливість для проведення подібного відбору. Рішенням цього завдання є збільшення мутантів в популяції мікроорганізмів за допомогою індукованих мутацій, що досягається обробкою клітин спеціальними хімічними, фізичними або біологічними агентами.

Прикладами **хімічних мутагенів** є нітрозогуанідін (НГ), етанметилсульфонат (ЕМС, викликає алкілування гуанідину), гідроксиламін (призводить до дезамінування цитозину), 5-бромурацил і 2-амінопурин, (аналоги основ, викликають помилки при реплікації ДНК), акридинові барвники (можуть вбудовуватись між сусідніми парами основ), **фізичних** - опромінення бактерій іонізуючим випромінюванням (викликає розриви основ) або ультрафіолетом (димеризує піримідинові основи) приводить відповідно до делецій і інверсій (поворот фрагмента ДНК на 180°) або до делецій, транзицій і трансверсій (заміні в одному з кодонів пуринових основ на піримідинові або навпаки).

Мутагенний ефект хімічних сполук пов'язаний в основному з виникненням точкових мутацій. Велике значення мають умови обробки клітинної суспензії хімічним мутагеном, його концентрація, тривалість експозиції, рН середовища та ін.

При роботі з хімічними мутагенами, багато з яких володіють канцерогенною і токсичною дією, необхідно дотримуватися правил безпеки - треба працювати у витяжній шафі в гумових рукавичках і утилізувати розчини мутагенів як небезпечні відходи.

В якості **біологічних мутагенів** виступають транспозуючі фаги, такі, як бактеріофаги, які вбудовуються в ДНК, і гени-мутагени (порушують процеси реплікації і репарації ДНК).

Оскільки різні мутагени володіють різними механізмами дії і ефективністю, їх вибір визначається типом мутації, яку необхідно отримати. Різні види і навіть штами мікроорганізмів вимагають певних концентрацій мутагенів і умов для здійснення ефективного індукованого мутагенезу. Тому перед експериментом необхідно побудувати криві виживання клітин залежно від концентрації (дозы) мутагенного фактора і часу експозиції.

Прояв мутацій необхідний, щоб відбулися реплікації і мутаційна зміна закріпилося в новосинтезованій молекулі ДНК. Фенотипово мутація проявляється через певний визначений час (сегрегаційний лаг-період), за який відбуваються процеси транскрипції і трансляції. Для появи нової ознаки має статися кілька поділів клітин в популяції (так званий

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

фенотиповий лаг-період), для цього суспензію клітин, оброблених мутагеном, культивують протягом певного періоду.

Щодо відбору мутантів, для вивчення екології мікроорганізмів застосовують декілька класичних методів. Широко використовується прямий відбір за фенотипом висівом на селективні середовища, метод з використанням індикаторних середовищ (з індикатором та хромогенним субстратом, наприклад) і метод непрямой селекції з відбитком колоній, що виростили на повноцінному агаризованому середовищі, на чашки з селективними середовищами. Для підвищення в популяції частки ауксотрофних мутантних штамів часто використовують пеніциліновий метод обробки мутантів, який елімінує значну кількість прототрофних клітин дикого типу, оброблених мутагеном культур на мінімальному середовищі з додаванням пеніциліну, що пригнічує синтез пептидоглікану клітинної стінки бактерій.

Розвиток методів генетичної інженерії дозволив використати її інструментарій для спрямованої зміни генетичного матеріалу в строго певних сайтах нуклеотидної послідовності і відповідно отримувати білки, які містять потрібні амінокислоти в заданих позиціях. Даний підхід отримав назву **сайт-спрямованого мутагенезу**. Наприклад, досліджуваний ген вбудовують в двохланцюгову форму вектора на ос-not бактеріофага M13 і копіюють одноланцюгову форму фага з ДНК з використанням спеціального праймера, за допомогою якого в ген-мішень вносять точкову мутацію. Після трансформації клітин *E. coli* дволанцюговими ДНК фага M13 ідентифікують фагові частинки, що несуть ген з потрібною мутацією, вбудовують мутантний ген в експресуючий вектор, синтезують білок, вимірюють його активність. Також можна вносити зміни в ген за допомогою плазмід. Можливість внесення заздалегідь запланованих змін до нуклеотидної послідовності дозволяє детально вивчати принципи функціонування клонуваних ферментів, створюючи і досліджуючи їх мутантні форми. Сайт-спрямований мутагенез також незамінний при вивченні складної системи регуляції експресії генів, він допомагає встановити роль тієї чи іншої ділянки хромосоми в цьому процесі.

Робота №21. Індукція мутацій у клітинах бактерій нітрозогуанідом

N-метил-*N'*-нітро-*N*-нітрозогуанід (НГ) є ефективним хімічним мутагеном, широко застосовуваним у генетиці бактерій, він з високою частотою індукує мутації при таких дозах, що не призводять до загибелі клітин. При обробці культури клітин НГ можна отримати до 20% ауксотрофних мутантів (тобто таких, що втратили здатність до синтезу необхідних для росту сполук). Розчини нітрозогуанідину в 50-100 мМ

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

цитратному буфері (рН 5,5) необхідно готувати безпосередньо перед експериментом. Як правило, клітини з експоненційною фазою росту обробляють НГ в кінцевій концентрації 20-100 мкг / мл протягом 30 хв.

Мутаген викликає в основному заміни основ за рахунок їх змін у вилиці реплікації, хоча є дані, що він також сприяє утворенню невеликих делецій. Дослідження розподілу мутацій, викликаних НГ, показали, що область мутації ДНК значно більш чутлива до дії цього мутагену, ніж інша хромосома. Ця особливість НГ часто призводить до утворення подвійних замінів, що є істотним недоліком даного методу. Проте в кожному експерименті можна варіювати рівень виникнення таких мутацій. Дію НГ зазвичай зупиняють внесенням 50-100 мМ фосфатного буферного розчину з рН 7,0.

Матеріали, реактиви та розчини:

Стерильне середовище LB; цитратний буферний розчин наступного складу (на 0,5 л): 0,5 г лимонної кислоти; 4,4 г NaOH; довести до рН 5,5 за допомогою 2 М NaOH;

Фосфатний буферний розчин наступного складу (на 0,5 л): 8 г KH_2PO_4 ; 1,16 г NaOH; довести 2 М NaOH до рН 7,0; НГ (концентрація нітрозогуанідина - 1 мг/мл у нітратних буферному розчині). Увага! НГ є небезпечною канцерогенною речовиною, працювати з ним необхідно у рукавичках; стерильний 0,4%-ий розчин NaCl.

Хід роботи:

А. Підбір оптимальних умов при дії НГ, побудова кривих виживання.

1. Засіяти одну колонію бактеріального штаму, що буде використана для мутагенезу, в мікробіологічну скляну пробірку з 5 середовища LB. Помістити пробірку на качалку і культивувати і 37°C і 240 об/хв. протягом ночі (12-14 год.).

2. Додати 4 мл нічної культури в колбу Ерленмейера з 4 мл рідкого середовища LB. Вирощувати культуру до середини логарифмічної фази росту при 37°C і 240 об / хв.

3. Осадити клітини центрифугуванням при 5000 g протягом 5 хв. при кімнатній температурі (стерильно!). Злити надосадкову рідину.

4. Промити клітини стерильним цитратним буферним розчином. Для цього ресуспендувати осад клітин в 40 мл цитрату буферного розчину. Центрифугувати при 5000 g протягом 5 хв. при кімнатній температурі. Злити супернатант.

5. Ресуспендувати клітини в 40 мл цитратного буферного розчину. Перенести по 5 мл суспензії у 8 стерильних мікробіологічних пробірок. Помістити їх у водяну баню при 37°C.

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

6. Внести в кожен з пробірок по 200 мкл розчину НГ. Виміряти час.
7. Через певний проміжок часу дістати одну пробірку з водяної бані. Осадити клітини на центрифугу при 12 000 g протягом 1-2 хв., промити одним об'ємом фосфатного буферного розчину і ресуспендувати в 5 мл фосфатного буферного розчину. Проби відбирати через 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 хв.
8. Висіяти розведення суспензії клітин з кожної пробірки на чашки Петрі з агаризованим середовищем LB. Проби відібрати протягом перших 30 хв., висіяти по 100 мкл з розведень 10^{-3} , 10^{-4} і 10^{-5} . Решта проби висівається по 100 мкл щоденно з 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} і 10^{-4} .
9. Помістити чашки в термостат і інкубувати при 37°C протягом ночі.
10. Перерахувати число бактеріальних колоній, що виростили в чашках. Виходячи з використаного розведення, визначити кількість життєздатних клітин для кожного періоду часу при обробці НГ.
11. Побудувати криву виживання культури залежно від часу обробки НГ. Визначити часовий інтервал, при якому виживання складає 50%.

Б.Індукція мутацій під дією НГ

1. Засіяти одну колонію бактеріального штаму, що піддається мутагенезу, в мікробіологічну скляну пробірку з 5 мл LB. Помістити пробірку на качалку і культивувати при 240 об/хв. протягом ночі (12-14 год.).
2. Додати 1 мл нічної культури в мікробіологічну пробірку з 10 мл рідкого середовища LB. Помістити пробірку на качалку та інкубувати при 37°C і 240 об/хв. до досягнення культурою логарифмічної фази росту ($\sim 2 \times 10^9$ клітин/мл). Осадити клітини центрифугуванням при 5000 g при кімнатній температурі (стерильно!). Злити надосадову рідину.
3. Промити клітини цитратним буферним розчином. Для цього додати до осаду клітин 10 мл цитратного буферного розчину. Осадити клітини центрифугуванням при 5000 g при кімнатній температурі. Злити надосадову рідину.
4. Ресуспендувати клітини в 10 мл цитратного буферного розчину. Перенести по 5 мл клітинної суспензії у дві стерильні мікробіологічні пробірки. В одну пробірку додати 200 мкл розчину НГ, в другу НГ додавати не потрібно. Помістити пробірки у водяну баню (37°C) і інкубувати протягом певного часу, визначеного на попередньому етапі.
5. Перенести вміст кожної пробірки в стерильну склянку для центрифугування. Осадити клітини центрифугуванням протягом 5 хв. Злити супернатант.

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

6. Відмити клітини від НГ. Для цього двічі промити їх рівною кількістю фосфатного буферного розчину, зібрати осад клітин центрифугуванням.
7. Ресуспендувати клітини з кожного варіанту в 10 мл рідкої LB і інкубувати протягом ночі при 37°C і 240 об/хв. Осадити клітини центрифугуванням при 5000 g. Промити клітини рівним об'ємом фізіологічного розчину. Ресуспендувати клітини в 500 мкл фізіологічного розчину, висіяти суспензії на чашки Петрі з селективним агаризованим середовищем.
8. Інкубувати чашки в термостаті при 37°C до появи колоній (через 12-24 год.) у варіанті з культурою клітин, оброблених НГ. Чашки з культурою, що не піддавалися дії мутагену, повинні бути чистими.

Додатки до методики

Нітрозогуанідін дуже небезпечний, оскільки є потужною канцерогенною речовиною. При роботі з розчином НГ обов'язково потрібно використовувати рукавички.

Підбір оптимальної дози НГ визначає ефективність мутагенезу. Високі дози НГ викликають утворення безлічі мутацій, різко знижуючи виживання клітин (ауксотрофності, летальні мутації). Навпаки, при недостатній обробці НГ складно відібрати бактерії з певним фенотипом за рахунок малого числа мутацій. Експериментально встановлено, що доза НГ, яка приводить до загибелі приблизно 50% клітин бактеріальних популяцій, в більшості випадків є оптимальною. Оскільки відомо, що різні штами в різному ступені чутливі до токсичної дії нітрозогуанідіна, то для визначення такої дози для кожного нового штаму доцільно мати криву виживання.

Для побудови кривих виживання клітин використовується одна й та ж доза НГ, але при різній тривалості впливу, або різні концентрації НГ протягом одного і того ж часового інтервалу. Якщо індукція мутагенезу пройшла недостатньо сильно, то треба провести обробку культури більш високими концентраціями мутагену (100 мкг/мл) або ж збільшити тривалість його впливу.

Для збільшення числа мутантів з бажаним фенотипом клітини можна перенести в рідке середовище LB і культивувати протягом ночі. Потім вирості культури висіваються на селективні чашки.

5.4. Способи відділення кінцевих продуктів і оцінка концентрації клітин

Біотехнологічний процес отримання первинних та вторинних метаболітів можна схематично представити у вигляді наступних етапів:

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

1. Збереження інокуляту. Головною умовою для практичної ферментації є збереження інокуляту протягом тривалого періоду (бажано без його ділення, щоб запобігти спонтанних мутацій). Важливо не просто зберегти клітини життєздатними, але й зберегти їх здатність до утворення продукту.
2. Підготовка інокуляту:
 - а) 1-2 шейкерні колби;
 - б) отримання спор на твердому середовищі (рис.32).
3. Попередня ферментація культури, яку проводять для отримання великої кількості інокуляту для промислового ферментеру.
4. Ферментація у промислових біореакторах (рис.33).
5. Відділення та очищення кінцевого продукту.

Метою будь-якого біотехнологічного процесу в промисловості є отримання певного продукту. Кінцевими продуктами біотехнологічних процесів може бути, наприклад, клітинна біомаса (виробництво кормових дріжджів), білок (виробництво дріжджового і бактеріального білка), продукти життєдіяльності мікроорганізмів (органічні кислоти, антибіотики, біогаз) і т. д.

Залежно від того, що є кінцевою метою біотехнологічного процесу, для відділення кінцевого продукту використовують різні методи. Для концентрування кінцевого продукту використовують різні фізичні та хімічні властивості частинок і молекул (вага, поверхнєве натягнення, розчинність, заряд, температура кипіння, здатність до дифузії, розміри).

Так, для відділення клітин використовують осадження, фільтрацію (у тому числі мембранну), центрифугування, флотацію. Такі методи використовують, наприклад, при поділі водно-мулової суміші, очистки стічних вод (аеробної та анаеробної), отриманні клітинної біомаси (дріжджі) і т. п.

Крім самих клітин кінцевими продуктами можуть бути внутрішньоклітинні метаболіти або виділилися в зовнішнє середовище позаклітинні метаболіти. У будь-якому випадку першим етапом має бути відділення клітин від середовища.

Далі може слідувати **руйнування відокремлених клітин** (якщо потрібно відділення внутрішньоклітинних продуктів). Клітини можуть бути зруйновані такими методами:

- фізичними (ультразвуком, заморожуванням - відтаюванням, пресуванням, розмеленням у кульових млинах);
- хімічними (ліофілізацією, екстракцією, обробкою детергентами, кислотами);
- біологічними (ферментами, фагами, інгібіторами).

Після руйнування клітин або при виділенні продукту з культуральної середовища для максимального вилучення продуктів використовуються методи:

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

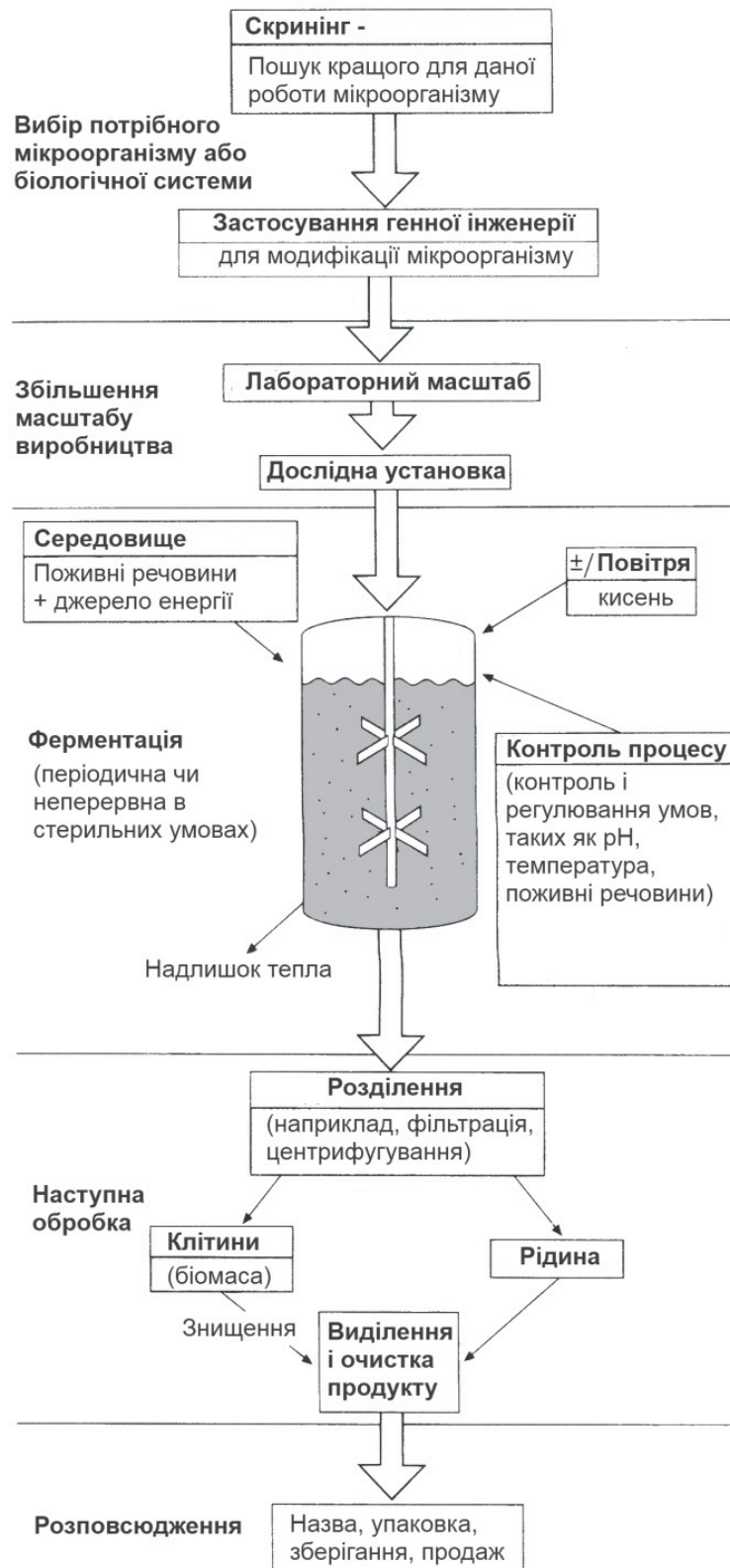


Рис. 32. Схема біотехнологічного процесу (за Тейлор та ін., 2005).

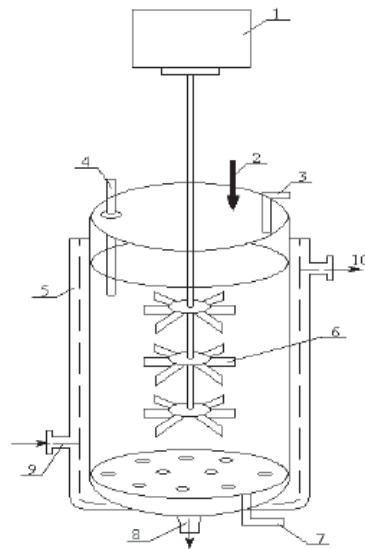


Рис.33. Принципова схема біореактору:

1 – мотор; 2 – подача живильного середовища; 3 – деаератор (прилад для очищення від присутніх небажаних газових домішок); 4 – система контролю параметрів живильного середовища; 5 – охолоджуюча або обігрівуюча рубашка; 6 – мішалка; 7 – аератор; 8 – отвір для виведення біомаси; 9,10 – подача та вихід холодної або теплої води відповідно.

- екстрагування (використовуючи властивості гідрофільності і гідрофобності);
- хроматографії (адсорбційна, іонообмінна, гель-хроматографія - речовини поділяються за молекулярною вагою);
- мембранних процесів (ультрафільтрація, зворотний осмос, діаліз);
- кристалізації і осадження;
- висушування (конвективне - в потоці повітря, контактна - з адсорбентом, сушка після заморожування - ліофілізація).

Фільтрація. Для отримання бактеріальних клітин з культуральної середовища часто використовують два типи фільтрації: осадова і мембранна. Часто для поліпшення відділення клітинної маси від рідини використовують додавання речовин, що збільшують розміри бактеріальних агрегатів - флокулянтів (наприклад, поліакриламід).

Для осадової фільтрації використовують високопористі матеріали з глибокими і звивистими порами. Фільтрувальна система складається з підкладки фільтра (фільтрувальна папір або тканину, великопористі) і товстого шару фільтруючого матеріалу (целюлози, діатомової землі тощо). При фільтруванні бактерії, по мірі їх накопичення, зіскоблюють з поверхні фільтра. Такий спосіб дозволяє добре очистити фільтрат, але для стерилізації середовищ непридатний, а біомаса часто виявляється забруднена фільтратом.

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

Мембранна фільтрація заснована на затримці бактерій на поверхні фільтра з порами, діаметр яких змінюється у вузьких межах. Вибір мембрани залежить від характеристик культури і бажаного продукту – клітини або фільтрату.

Так, при стерилізації фільтруванням, потрібна мембрана з діаметром пор менше 0,5 мкм (розміри клітин 1,5-0,5 мкм).

Центрифугування. Цей спосіб дає менш повне розділення, ніж фільтрація. Але такий спосіб дає можливість отримати середовище і клітини, незабруднені фільтратом. Швидкість осадження в процесі центрифугування залежить від таких факторів, як в'язкість середовища, розмір часток і різниця в щільності між частинками і середовищем. Всі типи центрифугування працюють за принципом регульованого додавання до відцентрової сили у роторі, що обертається.

Оцінка концентрації клітинної біомаси. Відділення клітин від середовища є також складовою частиною при оцінці концентрації клітин в середовищі. Для підрахунку кількості мікроорганізмів у досліджуваному зразку існує велика кількість методів. Найбільш поширеними методами кількісного обліку мікроорганізмів є наступні.

1. Методи прямого підрахунку мікроорганізмів (у певному обсязі проби або в наважці). Методи зводяться до підрахунку кількості клітин мікроорганізмів у певному обсязі мікробної суспензії безпосередньо під мікроскопом, перераховуючи далі чисельність мікроорганізмів на одиницю ваги або об'єму (вага - для твердих тіл, об'єм - для рідин і газів). Підрахунок клітин ведуть на фіксованих забарвлених мазках (грунт, мули, рослини і рослинні залишки), з використанням мембранних фільтрів, використовуючи світлову або електронну мікроскопію.

2. Кількість мікроорганізмів можна розрахувати за кількістю органічного азоту або вуглецю. Використовується в біотехнології, при культивуванні чистих культур мікроорганізмів.

3. Кількість бактерій можна розрахувати за оптичною щільністю мікробної суспензії. Використовується в біотехнології, при культивуванні мікроорганізмів, в медицині.

4. Метод висіву на щільні поживні середовища (в чашки Петрі). Цим методом визначається не загальна кількість мікроорганізмів у досліджуваному зразку, а чисельність різноманітних фізіологічних груп мікроорганізмів або організмів. Залежно від використаного живильного середовища це можуть бути сапрофіти, сульфатредуктори, амоніфікатори, нітрифікатори, денітрифікатори, залізобактерії і т. д. Метод зводиться до приготування розведень проб і посіву розділених зразків на поживні середовища різного складу з подальшою інкубацією посівів і підрахунком колоній, що виростили. Умовно приймається, що з однієї клітини виростає одна колонія.

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

5. Метод граничних розведень, метод титру. Сутність цього методу полягає в наступному. У пробірки або колби з середовищем вносять певний обсяг, взятий з різних розведень досліджуваної проби. Після інкубації реєструють наявність або відсутність росту в посівах, результати обробляють статистично за допомогою спеціальних таблиць і розраховують число мікроорганізмів, що містяться в одиниці ваги або обсягу зразка.

Способи оцінки чисельності організмів у середовищі, що використовують в промисловості дозволяють швидко отримати результат. Зазвичай оцінюють концентрацію клітин в середовищі або оптичними методами (легко автоматизувати), або прямим підрахунком під мікроскопом, або ваговим - аналогічно визначенню концентрації зважених речовин в об'ємі (за різницею у вазі між фільтром з осадом і без). Вага може бути сирою або сухою (після висушування зразка) і т. д.

Робота № 22. Відділення продукту (клітинної маси) методом осадової фільтрації, методом мембранної фільтрації, методом центрифугування

Мета роботи: знайомство з методами, що застосовують для відділення готового продукту: відділення продукту (клітинної маси) методом осадової фільтрації, методом мембранної фільтрації, методом центрифугування.

Завдання роботи:

1. Визначити кількість продукту (клітинної маси) методом осадової фільтрації.
2. Визначити кількість продукту (клітинної маси) методом центрифугування.
3. Визначити кількість продукту (клітинної маси) методом центрифугування.
4. Порівняти отримані результати оцінки концентрації клітин в середовищі. Вказати причини розходження результатів оцінки концентрації.
5. Порівняти методи, зробити висновок про ефективність кожного з них.

Обладнання та матеріали: мембранні фільтри; установка для фільтрації; паперові фільтри; целюлозне волокно; колба Бунзена; воронка Бюхнера; центрифуга з центрифужними пробірками; мірні циліндри на 100 см³; стакани об'ємом 250 см³; флокулянти (наприклад, розчин поліакриламід); ваги; зважені бюкси; зразки сумішей (культура дріжджів, змішана культура мікроорганізмів аеробного активного мулу).

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

Хід роботи:

1. Осадова фільтрація.

Приєднати воронку до колби Бунзена, з'єднати колбу з водострумним насосом. На воронку покласти великопористий фільтрувальний папір, на неї налити суспензію целюлозного волокна у воді. На фільтрі повинен вийти рівний шар целюлози товщиною 0,5-1 см. Якщо немає можливості використовувати целюлозне волокно - фільтрація через паперовий фільтр. Профільтрувати 250 мл суміші, що розділяється. Оцінити (візуально) ступінь прозорості відфільтрованої рідини. Зняти шар обложений клітин, зважити, розмістити у бюкс.

Розрахувати сиру клітинну масу (г/л) = (Вага бюкса з клітинами, г, - Вага порожнього бюкса, г): Об'єм рідини, мл, $\times 1000$ (1000 - перерахунок в г/л).

Оцінити ступінь забрудненості клітин фільтруючим матеріалом (візуально).

2. Зважити мембранний фільтр. Профільтрувати через мембранний фільтр 50-100 мл суміші. Оцінити ступінь прозорості фільтрату. Зважити фільтр з осадом. Розрахувати сиру клітинну масу (г/л) = (Вага фільтра з клітинами, г, - Вага порожнього фільтра, г): об'єм рідини $\times 1000$ мл.

3. Провести поділ осадовим фільтруванням, додавши попередньо до поділу - неушкоджену суміш поліакриламід (1 мг розчину на 100 мл суміші). Концентрацію сирової біомаси розраховувати не потрібно. Порівняти прозорість фільтрату, швидкість фільтрації з аналогічними без використання поліакриламід.

4. Зважити дві центрифужні пробірки. Виміряти обсяг рідини, що поміщається в пробірку. Налити в пробірку досліджувану суміш. Поставити пробірки в центрифугу. Пробірки повинні бути однаково наповненими і попарно врівноваженими. Одягти кришку, загвинтити. Закрити кожух. Виставити час центрифугування. Включити центрифугу. До повної зупинки центрифуги відкривати кришку не можна!

Поділ центрифугуванням виконується протягом 5 хв. у двох варіантах - при швидкості 1000 і 8000 об/хв. Про закінчення процесу візуально оцінити прозорість рідини, злити надосадову рідину. Зважити пробірку з осадом, розрахувати концентрації біомаси (г / л).

Розрахувати сиру клітинну масу (г/л) = (Вага пробірки з клітинами, г, - Вага порожньої пробірки, г): об'єм рідини, мл, $\times 1000$ (1000 - перерахунок в г/л).

Контрольні питання:

1. Що може виступати в ролі кінцевих продуктів у біотехнологічних процесах?
2. Які основні етапи в отриманні біотехнологічних продуктів ви можете назвати?
3. Які властивості використовують для відділення кінцевих продуктів?

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

4. Які методи відділення кінцевих продуктів використовують в біотехнології?
5. Як можна відділити клітинну біомасу від середовища?
6. Що використовують для виділення кінцевих продуктів, що знаходяться в клітинах?
7. Які методи застосовують для виділення продуктів, що накопичуються в культуральному середовищі?
8. Які методи оцінки концентрації клітин в середовищі ви знаєте?

5.5. 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 індивідуальних 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 диасоціація, 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 досліджувачого обладнання.

5.5.1. 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.

5.5.2. 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 на протязі 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 в

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

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 запаюють 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 устаткування. Ампули з ліофілізованими клітинами рекомендується зберігати в темряві при температурі $4 - 6^\circ\text{C}$. Зберігання при більш високій температурі, особливо перевищує $25 - 30^\circ\text{C}$, 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 грамнопозитивні, 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*, *Kluveromyces*, *Rhodotorula*.

5.5.3. Зберігання при низьких і наднизьких температурах

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

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

Клітини заморожують в широкому діапазоні температур (від -10 до -196°C) і при 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. Відтавання 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).

5.5.4. 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 гліцеролу 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 гліцеролу, перемішують і ставлять в морозильник. Зберігати суспензії зручно в стерильних пробірках Еппендорф, а для їх приготування використовувати автоматичні піпетки зі стерильними наконечниками і готувати суміші в ламінарному шафі. З клітин, що зберігаються, періодично (2 - 6 раз 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 гліцеролу.

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

Цей метод не вимагає спеціального устаткування 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.

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ
МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

6.1. Особливості молочнокислого бродіння

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. Бактерії роду *Bifidobacterium* переважають у кишечнику грудних дітей, особливо тих яких вигодовують грудьми, оскільки ці бактерії потребують вуглеводів, що містять N-ацетилглюкозамін, який знайдений тільки в жіночому молоці. Виявлені вони і в кишковій флорі дорослих людей, а також в гниючому мулі.

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 з полдо родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*.

Молочнокислі бактерії за характером продуктів зброджування гексоз (глюкоза, фруктоза, маноза, галактоза), дисахаридів (лактоза, мальтоза, сахароза) і полісахаридів (декстрин, крохмаль) відносять до гомоферментативних і гетероферментативних.

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, визначених 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

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

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.

Отримання молочних продуктів у харчовій промисловості побудовано на процесах ферментації (рис.34). 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. У сквашуванні молока зазвичай беруть участь молочнокислі бактерії. Шляхом використання реакцій, які супроводжують головний процес зброджування лактози отримують і інші 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. Наприклад, 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

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ



Рис. 34. Схема виготовлення йогурту.

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,

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

глюкоза перетворюється на молочну кислоту, кислотність молока підвищується, і при рН 4-6 казеїн коагулює.

Молочнокисле бродіння буває 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. 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 крупинчастої 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. Біотехнології на основі молока включають, як правило, всі основні стадії біотехнологічного виробництва, які можна розглянути на прикладі сироваріння.

Виробництво сиру, або сироваріння – один з найдавніших процесів, заснованих на ферментації. Сири бувають найрізноманітніші - від м'яких до твердих. М'які сири містять багато води, 50-60%, а тверді - мало, 13-34%.

На першому етапі йде підготовка молока (первинна обробка).

На другому - готується культура молочнокислих бактерій. Мікроорганізми підбираються в певній пропорції, що забезпечує найкращу

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

якість. Склад культур бактерій також залежить від температури термообробки.

Третя стадія - стадія ферментації, - у сироварінні в деяких випадках відбувається в 2 етапи, до і після стадії виділення. Спочатку молоко інокують певними штамми мікроорганізмів, що приводять до утворення молочної кислоти, а також додають сичужний фермент ренін. Ренін прискорює перетворення рідкого молока в згусток (зтворожування) у кілька разів. Ця реакція активується молочною кислотою, що виробляється бактеріями. Функції реніну можуть виконувати й інші протеїнази, але ренін також бере участь у процесах протеолізу, що відбуваються в сирі при дозріванні. Після утворення згустку сироватку відділяють, а отриману сирну масу піддають термообробці і пресують у формах. Далі згусток солять і ставлять на дозрівання. Іноді отримана маса піддається додатковій обробці, яка полягає в наступному: зараження спорами блакитних цвілевих грибів при виробництві рокфору; нанесення на поверхню спор білих цвілевих грибів при виробництві камамберу і брі; нанесення бактерій, необхідних для дозрівання деяких сирів.

Деякі сири після виділення повинні піддатися подальшій ферментації (стадія дозрівання). Мікроорганізми і ферменти в ході цього процесу гідролізують жири, білки і деякі інші речовини молодого сиру. В результаті їх розпаду утворюються речовини, що надають сирам характерний смак.

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 олії. 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.

Молочнокисле бродіння викликає група молочнокислих бактерій, дуже різноманітна й широко розповсюджена в природі (табл.16).

. Вони мають ряд загальних ознак. Найбільш важливі з них наступні: утворення молочної кислоти; грам-позитивна реакція при фарбуванні за Грамом; відсутність спор; нерухомість; різноманітна форма - коки або палички; вимогливість до джерел азоту (багато з них не розмножуються на простих синтетичних середовищах); відсутність деяких ферментів (каталази, яка розщеплює пероксид водню на воду та кисень).

**РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ
МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ**

Таблиця 16

Орієнтовний склад мікрофлори молочнокислих продуктів

Найменування продуктів	Орієнтовний склад мікрофлори
Кисломолочний сир, сметана, кисляк	Молочнокислі стрептококи
Йогурт	Молочнокислі стрептококи та палички
Кефір	Молочнокислі стрептококи та палички, одиничні дріжджі

Остання властивість виявляється, коли на колонію молочнокислих бактерій нанести краплю 3%-ного розчину пероксиду водню і виділення кисню при цьому не спостерігається

**Робота № 23. Дослідження морфологічних особливостей
молочнокислих бактерій.**

Мета заняття: Ознайомитися з корисною мікрофлорою заквасок і класифікацією кисломолочних продуктів залежно від складу мікрофлори заквасок. Ознайомлення з морфологічними особливостями молочнокислих бактерій. Закріплення практичних навичок відбору культури для дослідження.

Обладнання та матеріали: Мікроскоп; спиртівка; предметні скла; бактеріологічного петлі; імерсійне масло; фарба Муромцева; фільтрувальна папір; лоток з рейками; промивалка. Кисломолочні продукти (кефір, сметана, сир, ряжанка, йогурт, кисломолочні біфідопродукти, кисломолочний продукт з ацидофільної паличкою); рідкі закваски на стерильному молоці.

Хід роботи:

1. Для приготування препарату на чисте предметне скельце наносять петлею невелику краплю досліджуваного матеріалу та рівномірно розподіляють на площині близько 1 см². В якості досліджуваного матеріалу використовують сквашене молоко або інший молочнокислий продукт.

При дослідженні сиру та сирних виробів на скло наносять краплю води, вводять в неї петлею продукт, ретельно перемішують та розтирають на площині 1 см². Препарат висушують при кімнатній температурі, фіксують на полум'ї пальника та фарбують метиленовим синім. Метиленовий синій - кращий барвник для молочнокислих бактерій в молоці, тому що він слабо зафарбовує основний фон (казеїн) та добре - клітини. Під час досліджень, в зразку добре видно дрібні округлі клітини *Streptococcus lactis* у вигляді коротких ланцюжків. Вони накопичують до

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

1% молочної кислоти. Оптимальна температура для розвитку мікроорганізмів – 30°C, вони кислотостійкі, накопичують до 3,5% молочної кислоти. В полі зору можуть бути молочнокислі стрептококи (*Streptococcus lactis*, *S. cremoris*) – шароподібні клітини, розташовані вигляді коротких чи довгих ланцюжків. Палички довжиною 4-5 мкм (*Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*). Часто у прокислих молочних продуктах можна спостерігати величезні клітини молочної цвілі (*Oidium lactis*), цвільові гриби (*Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*), дріжджі (*Torula amara*, *T. lactis*), спороутворюючі бактерії родів *Bacillus* та *Clostridium* (рис.35).

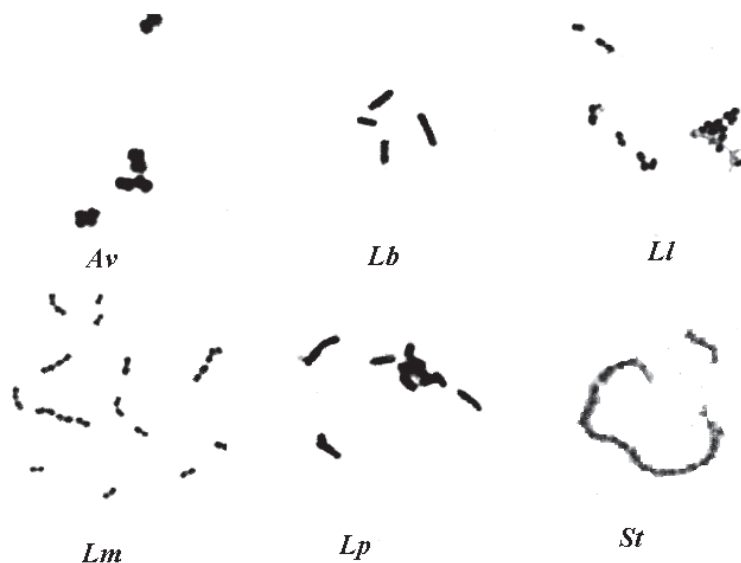


Рис.35. Молочнокислі бактерії, зафарбовані метиленовим синім:

Av – *Aerococcus viridians*; *Lb* – *Lactobacillus bulgaricus*; *Ll* – *Lactococcus lactis*; *Lm* – *Leuconostoc mesenteroides*; *Lp* – *Lactobacillus plantarum*; *St* – *Streptococcus thermophilus*

2. Після інкубації накопичувальної культури молочнокислих бактерій відзначають згортання молока, характер росту мікроорганізмів (утворення згустку – щільного, рихлого, слизового) і газоутворення.

Приготувати препарат фіксованих клітин, мікроскопію вати, замалювати. Враховуючи особливість субстрату (молоко), препарат фіксованих клітин готують так. На предметне скельце з пробірки нанести краплю культуральної рідини, яку рівномірно розмазати покривним склом. Мазок висушити і одночасно знежирити сумішшю спирту та ефіру (1:1) упродовж 10 хв., яку безпосередньо наносити на мазок. Після випаровування суміш налити повторно. Висушений мазок фарбувати розчином метиленового синього за Лаффлером.

При мікроскопіюванні звертають увагу на співвідношення кокових та паличковидних бактерій в різних мазках, виявляють клітини дріжджів в мазках з кефіру. Після ретельного мікроскопіювання замальовують мікрофлору молочнокислих продуктів.

Робота № 24 . Підготовка молочнокислих бактерій до ферментаційного процесу. Контроль якості заквасок

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.

До мезофільних молочнокислих бактерій, що використовують як заквашувальні культури, належать такі види та підвиди, як: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc.lactis* subsp. *cremoris*, *Lc.lactis* subsp. *lactis bivovardiacetilactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus casei*. Їх можна застосовувати як самостійно, так і комбінувати. Як мезофільну одновидову заквашувальну культуру можна використати *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. 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.

Мікробіологічний контроль якості заквасок передбачає визначення кількості життєздатних бактерій та сторонніх мікроорганізмів, перелік яких наведено нижче. Слід зазначити, що у заквасках не повинно бути сторонньої мікрофлори.

Мета: засвоїти основні методи визначення кількості життєздатних молочнокислих бактерій. Виконати мікробіологічний аналіз закваски

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

мікроскопуванням. Визначити мікробіологічні показники якості заквасок. Зробити висновки про якість заквасок.

Реактиви і матеріали: різні види заквасок, технічні ваги, стерильний посуд для приготування наважок, колби зі стерильною водопровідною водою, стерильні чашки Петрі, стерильні піпетки, стерильна вода в пробірках, стерильні живильні середовища.

Хід роботи:

1. *Відбирання проб заквасок сухих та рідких, бактеріальних концентратів, бактеріальних препаратів прямого внесення.* Пробу рідких заквасок відбирають стерильною піпеткою об'ємом не менше ніж 10 см^3 з кожного пакування та переносять у одну ємність.

Маса проби для контролювання заквасок сухих, бактеріальних концентратів, бактеріальних препаратів прямого внесення повинна бути (30 ± 2) г.

Відібрані проби перед дослідженням перемішують та нейтралізують. Для цього у стерильну пробірку або колбу, відбирають стерильною піпеткою 10 см^3 закваски, що аналізують, додають 1 см^3 стерильного розчину двовуглекислого натрію з масовою концентрацією 100 г/дм^3 , вміст ємності перемішують.

2. *Мікроскопування препарату.* Для приготування мікроскопічного препарату на чисте знежирене предметне скло петлею наносять невелику краплю досліджуваного матеріалу і розподіляють на ділянці площею $(1 \pm 0,2) \text{ см}^2$. Препарат сушать при температурі $(20 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$, фіксують над полум'ям спиртівки і фарбують метиленовим синім. Мікроскопічні препарати заквасок розглядають у 10 полях зору. Відмічають морфологію клітин.

Визначення кількості життєздатних клітин проводять висівом на селективні середовища. Для визначення кількості молочнокислих бактерій у заквашувальних культурах змішують відповідне їх розведення з розплавленим і охолодженим до температури $(47 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ середовищем МРС або ГА. Після затвердіння чашки Петрі перевертають догори дном і інкубують при температурі $(30 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 72 год. в аеробних умовах для лактококів та при температурі $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 48 год. також в аеробних умовах для *S. thermophilus*.

У багатоштамових заквасках, що містять, *Lb.delbrueckii* subsp.*bulgaricus* і *Lb.acidophilus* під час інкубування в анаеробних умовах при температурі $(45 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 72 год. визначають *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, а при температурі $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 72 год. — *Lb.acidophilus*. Після інкубування підраховують усі утворені колонії.

Після інкубування підраховують загальну кількість колоній і колоній із прозорими зонами. Для того щоб розрізнити бактерій роду *Lactococcus*

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

від *Leuconostoc*, у кожную чашку Петрі додають 0,5 см³ X-galI-розчину, який розтирають по поверхні чашки стерильним шпателем Дригальського. Чашки Петрі інкубують 4 год. при температурі (25 ± 1) °С.

Блакитні колонії з прозорою зоною або без неї — це *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc.lactis* subsp. *cremoris*, *Lc.lactis* subsp. *lactis*, *bivovar diacetilactis*— білі з прозорою зоною.

Зробити висновок про якість заквасок.

Лабораторна робота № 25. Технологія заквашування живильної основи. Приготування заквасок методом накопичувальних культур

Молочні продукти одержують, як правило, з нормалізованого молока з використанням молочнокислих бактерій, що за морфологією клітин поділяють на коки і палички. Усі вони нерухомі, не утворюють спор, грампозитивні, факультативні анаероби. Відносно температури їх поділяють на дві групи: мезофільні і термофільні бактерії. Типові молочнокислі бактерії за кінцевими продуктами бродіння молока бувають гомоферментативні і гетероферментативні. При гомоферментативному бродінні молочний цукор зброджується майже цілком у молочну кислоту. При гетероферментативному бродінні крім молочної кислоти утворюються леткі кислоти (оцтова, пропіонова), СО₂ і ароматоутворювальні речовини: ацетоїн і діацетил, ефіри. Для молочнокислих бактерій молоко є природною еконішею, розвиваючись в якій вони спричинюють його сквашування, що є одним із найдавніших способів його консервування. При цьому не тільки подовжується термін зберігання цієї важливої сировини, а й отримуються нові корисні продукти.

Для отримання молочних продуктів використовують закваски, до складу яких входять, як правило, молочнокислі бактерії та інші мікроорганізми.

Заквасками називають чисті культури чи суміш культур мікроорганізмів, що використовують для виготовлення кисломолочних продуктів, таких, як ферментоване молоко, сметана, кисловершкове масло і сир.

Як заквашувальні культури використовують мезофільні і (або) термофільні молочнокислі бактерії, пропіоновокислі бактерії, інколи плісняві гриби. До складу закваски кефіру, крім молочнокислих бактерій, також входять дріжджі і оцтовокислі бактерії.

Елективні методи культивування (накопичувальні та чисті культури). Велику кількість мікроорганізмів дуже легко виділити з навколишнього середовища. Для них без особливих ускладнень можна підібрати умови, які б забезпечували їх ріст. Проте існує дуже багато мікроорганізмів, про які стало відомо лише після того, як була розроблена техніка накопичувальних культур. Честь цього відкриття належить нашому

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

співвітчизнику С.М.Виноградському та Голландському вченому М.В.Бейєрінку.

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 інокулюють (засівають) середовище змішаною популяцією, яка, наприклад, є в ґрунті, мулі, воді тощо. 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. Найкращим матеріалом для інокуляції є проби з тих місць, де вже є "природне збагачення". Наприклад, якщо потрібно виділити мікроорганізми, які ростуть на вуглеводнях, найкраще відбирати пробу з фунту на нафтопромислах або з нафтових відстійників.

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 °С на кілька діб.

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 °С або у рідкому азоті) чи бути ліофільно висушеними. Для виготовлення кожної серії продукту потрібно використовувати нову ампулу.

Бажано, 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

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

вимог Держсанепідемнагляду. Доцільно використовувати в технологічному процесі сировину і матеріали, піддані високотемпературній стерилізації (140 °С 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 глютамату. За використання стабілізаторів молоко повільно нагрівається до 50—70 °С 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 °С. 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°С, розфасовують. При такій температурі утворюється продукт з найкращою в'язкістю та стійкістю згустку.

IV етап — асептичний (стерильний) розлив. Продукт охолоджують з 20–25°С до 6°С упродовж 8–10 год., щоб не порушити структуру кисломолочного продукту.

V етап — контроль готової продукції за органолептичними, мікробіологічними та іншими показниками.

Мета роботи: вивчити технологію отримання молочно кислих продуктів. У лабораторних умовах з закваски молочнокислих бактерій отримати кисломолочний напій.

Матеріали та обладнання: стерильне молоко, закваска молочнокислих бактерій (йогурт Активія), термостат, мірні циліндри, термометр, термос.

Хід роботи:

1. Вилити молоко у посуд і довести до кипіння, на мінімальному вогні прокип'ятити 5хв.
2. Охолодити молоко до температури 37-43С°, зняти пінку.
3. Якщо використовуєте готовий йогурт (Активія) - влити вміст упаковки в молоко і ретельно перемішати. Якщо використовуєте

- суху закваску - розвести її столовою ложкою молока в флаконі і влити розведену закваску в молоко.
4. Перелити молоко з закваскою в термос, закрити кришкою і поставити на 5-6 годин. Важливо не рухати термос протягом цього часу.
 5. Перелити йогурт в чисту посудину, закрити кришкою і поставити в холодильник на кілька годин, де він ще трішки загусне.

6.2. Кислотна коагуляція

Основними складовими у колоїдно-дисперсній білковій системі молока, яка зазнає найбільш істотних змін у процесі виробництва сиру, є казеїнові міцели.

Міцели казеїну є колоїдною фазою змішаного складу з властивостями гідрофільного та гідрофобного золь, який за певних умов (наприклад, під дією температури) безповоротно переходить у гель.

Понад 95% казеїну в молоці знаходиться в міцелярній формі. Міцели казеїну - близькі до сферичної форми частки розміром від 30 до 300 нм і молекулярною масою від $2,6 \times 10^7$ до 5×10^9 (частіше від 6×10^8 до 6×10^9). Кожна міцела містить від декількох тисяч до сотень тисяч молекул всіх чотирьох типів казеїнів. Куляста форма міцел відіграє важливу роль у забезпеченні їх високої стійкості, так як при однаковій масі питома поверхня мінімальна у частинок кулястої форми. У той же час, чим нижче питома поверхня колоїдних частинок, тим нижче у них запас вільної енергії, тим вище стабільність при інших рівних умовах. Діаметр міцел зменшується при зниженні в середовищі вмісту неорганічних компонентів, особливо кальцію і фосфору.

α_{s1} -казеїн є основною фракцією білків молока. Він становить майже 50% усіх білків і 60% — білків казеїнового комплексу. Вони відносяться до фосфопротейнів і легко осаджуються за низьких концентрацій іонів кальцію. Це гідрофобний білок, для якого характерні високий вміст залишків проліну та відсутність цистину і цистеїну. У його молекулі знаходяться 8 фосфатних залишків, із яких 7 розташовані у сегменті Асп(43) — Гіс(80), що несуть майже всю частку від'ємного заряду молекули.

β -казеїн — друга основна фракція, яка належить до фосфопротейнів і становить 25—35% загального білкового складу молока. Його молекула складається з одного поліпептидного ланцюга, містить 209 амінокислотних залишків і включає 5 залишків фосфосерину. Більшість частки молекули є гідрофобною. На β -казеїн припадає близько 8—15% білка молока. Первинна структура β -казеїну містить 169 амінокислотних залишків. β - казеїн — глікопротеїд, який є єдиним вуглеводвмісним казеїном. Наявність вуглеводів підвищує розчинність β -казеїнів у сольових розчинах і,

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

зокрема, у розчинах кальцію хлориду. У поліпептидному ланцюгу β - казеїну є дуже чутливий до протеолізу ферментами зв'язок, розщеплення якого призводить до дестабілізації міцели казеїну та утворення параказеїнового згустку за наявності іонів кальцію.

Фізичні та хімічні властивості казеїну залежать від його первинної структури, оскільки розташування амінокислотних залишків визначає просторову структуру молекул. Чітке уявлення про амінокислотну послідовність поліпептидних ланцюгів молекул, основних компонентів казеїну, має вирішальне значення для розуміння механізмів утворення міцел, їх структурної організації, дії на них окремих факторів, які є важливими для біотехнологічних процесів, зокрема в питаннях, що стосуються впливу температури або ферментативної взаємодії в процесі виробництва сирів.

Структура міцели казеїну остаточно не встановлена, незважаючи на інтенсивне її вивчення (рис.36).

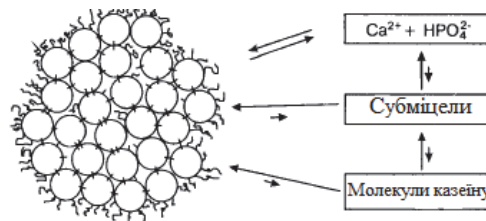


Рис.36. Модель казеїнової міцели, що складається з сферичних субміцел, пов'язаних одна з одною колоїдним фосфатом кальцію, що показує ланцюжки макропептиду казеїну, що виступають назовні.

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.

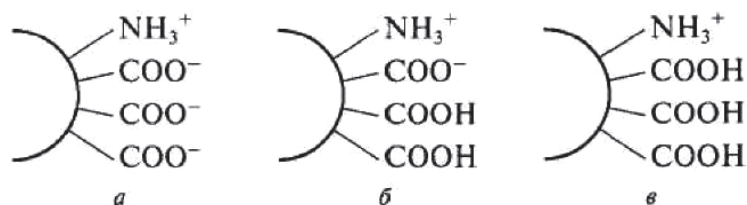
При гомоферментативному молочнокислому бродінні з 1 моля лактози утворюється 4 моля молочної кислоти (342 г молочного цукру зброджується до 360 г молочної кислоти). Межа накопичення молочної кислоти залежить від виду застосовуваної закваски, температури сквашування та інших технологічних факторів. Молочнокислі палички мають більш високу межу накопичення молочної кислоти (до 140-250°Т), а лактококи – нижчий (90-130°Т).

В основі отримання казеїну лежить кислотна коагуляція білків молока в ізоелектричній точці ($pH = 4,6-4,7$). Механізм кислотної коагуляції полягає в тому, що при підкисленні молока відбувається поступова нейтралізація негативних груп (карбоксильних і фосфатних) казеїну і видалення зі складу казеїнових міцел колоїдного фосфату кальцію. При $pH 4,9$ частинки втрачають весь колоїдний фосфат кальцію і відбувається повне руйнування міцелярної структури. Подальше зниження

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

pH розчину до ізоелектричної точки (ІТ) призводить до нейтралізації казеїнових частинок і зниження ступеня їх гідратації. Ізоелектричний стан супроводжується конформаційними змінами ланцюгів макромолекул казеїну всередині субміцел, а це призводить до часткової гідрофобізації їх поверхні і утворення нерозчинних у водному середовищі агрегатів. Подальше об'єднання субміцел за рахунок гідрофобних, водневих і, меншою мірою, іонних зв'язків призводить до утворення гелю.

Примітка. Слід пам'ятати, що казеїн осідає тільки в ізоелектричній точці (ІТ). Так, при нестачі кислоти міцели мають негативний заряд і, отже, гідратовані, що перешкоджає їх осадженню. Надлишок кислоти призводить до перезарядження частинок казеїну, їх гідратації і повторному розчиненню. Характер поверхні казеїнових частинок при pH вище (а), нижче (в) і в ІТ (б) представлений на малюнку:



Робота № 26. Виділення та дослідження властивостей казеїну

Мета роботи: Вивчити механізм процесу кислотної коагуляції казеїну в ізоелектричній точці і визначити масу утвореного білка.

Матеріали та обладнання: колби конічні місткістю 100 і 200 см³; циліндр мірний місткістю 100 см³; бюретка місткістю 25 см³; мірна піпетка місткістю 50 см; воронка; паперовий фільтр; 40%-й водний розчин CaCl_2 ; сичужний фермент; закваска; молоко; віскозиметр; прилад для визначення коефіцієнта розтікання; міліметровка; скло.

Хід роботи:

Казеїн молока володіє кислими властивостями, тому здатний взаємодіяти з лугом. У зв'язку з чим, масову частку казеїну можна визначити з різниці обсягів лугу, що пішла на нейтралізацію молока і безказеїнової сироватки.

1 етап. У конічну колбу вносять 20 мл молока і 80 мл дистильованої води (20°C). Вміст колби перемішують і титрують розчином сірчаної кислоти 0,05 моль/дм при постійному помішуванні до випадання казеїну в осад великими пластівцями, використовуючи при цьому індикаторний папір до настання значення pH = 4,6-4,7. Об'єм розчину сірчаної кислоти (V_K), що пішла на осадження казеїну, записують.

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

Через 3-5 хв. після утворення осаду казеїну рідину фільтрують через сухий складчастий фільтр в конічну колбу місткістю 200 см³. Далі 50 мл фільтрату піпеткою переносять у конічну колбу місткістю 100 мл, додають 3-5 крапель 1%-ного розчину фенолфталеїну і титрують розчином гідроксиду натрію 0,1 моль/дм до слабо-рожевого забарвлення, не зникаючого протягом 30 с. Об'єм лугу (V) що пішов на титрування, записують.

2 етап. У конічну колбу вносять 20 мл молока, 80 мл дистильованої води і стільки ж сірчаної кислоти (0,05 моль/дм), скільки було потрібно на осадження казеїну на першому етапі, додають 3-5 крапель 1%-ного розчину фенолфталеїну, перемішують і титрують розчином гідроксиду натрію так само, як вище. Об'єм розчину лугу (V₂), що пішов на титрування, записують.

Спочатку за наведеною нижче формулою розраховують обсяг лугу (X), який пішов на титрування всього розчину (молоко + вода + кислота):

Потім розраховують масову частку казеїну K (в %) за формулою:

$$X = \frac{(100 + V_k) \cdot V_1}{50} \text{ (см}^3\text{)},$$

де V_k - об'єм розчину сірчаної кислоти, що було витрачено на осадження казеїну, мл; V₁ - об'єм розчину гідроксиду натрію, що було витрачено на титрування 50 мл фільтрату, мл; 50 – вихідний об'єм розчину.

Потім розраховують масову долю казеїну K (у %) за формулою:

$$K = \frac{(V_2 - X) \cdot 0,1131 \cdot 100}{m} = (V_2 - X) \cdot 0,5655,$$

де V₂ - об'єм розчину гідроксиду натрію, що було витрачено на титрування на другому етапі роботи, см³; X - розрахований об'єм розчину гідроксиду натрію, витрачений на титрування на першому етапі, см³; 0,1131 - маса казеїну, відповідна 1 мл розчину гідроксиду натрію з еквівалентною концентрацією 0,1 моль/дм³, г; m - об'єм молока, що було взято на дослідження, мл (20 мл).

6.3. Сичужне згортання молока

Отримання сичужного згустку є одним з найскладніших процесів в біотехнології сироваріння, в основі якого лежить ензиматичне перетворення казеїну в параказеїн, з якого формується просторова структура згустку. Параказеїн утворюється внаслідок втрати казеїном колоїдної стійкості, викликаной гідролітичною дією реніну або інших молокозгортаючим 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

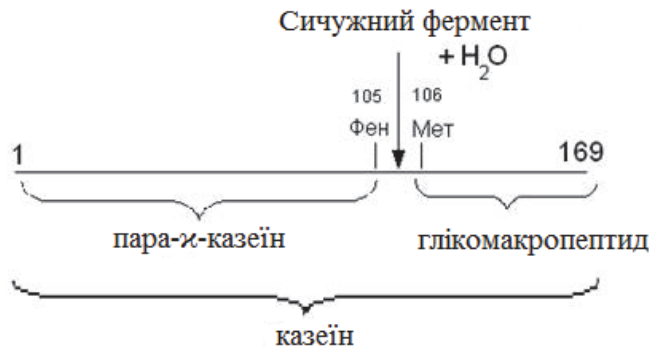
РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

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 κ -казеїну на гідрофільний макропептид (МП) і гідрофобний пара- κ -казеїн, в результаті якого дезактивуються системи, що забезпечують стійкість міцели;
- флокуляції (агрегації) дестабілізованих параказеїнових 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. Це реакція першого порядку, оскільки здатність до дифузії міцел казеїну занадто мала в порівнянні з рухливістю молекул молокозгортаючих ензимів. Автори гідролітичної теорії вважають, що під дією молокозгортаючого ферменту відбувається розрив пептидного ланцюга κ -казеїну між фенілаланіном і метіоном (Phe₁₀₅ – Met₁₀₆) (рис.37). Від міцели κ -казеїну відщеплюється глікомакропептид.



Внаслідок цього κ -казеїн перетворюється на пара- κ -казеїн і втрачає свою здатність забезпечити колоїдну стійкість казеїнових міцел.

Глікомакропептиди κ -казеїну мають високий негативний заряд і володіють сильними гідрофільними властивостями. При їх відщепленні від κ -казеїну знижується електричний заряд

Рис. 37. Первинна, або ензиматична фаза

на поверхні казеїнових міцел (з поступовим наближенням до ізоелектричного стану), частково втрачається гідратна оболонка, в результаті чого знижується стійкість казеїнових міцел і вони коагулюють, настає друга стадія коагуляції.

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 κ -казеїну хімозином, наприклад, з припинення збільшення вмісту небілкового азоту.

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

Другий процес йде без участі молокозгортаючих ензимів, в присутності іонів Са, і називається вторинною (неензиматичною) фазою. На думку деяких вчених, процес сичужного згортання молока можна розділити на чотири стадії: індукційний період (лаг-фаза), який закінчується з початком утворення пластівців, візуально видимого; стадія флокуляції, що закінчується утворенням згустку; стадія метастабільної рівноваги, припиняється з початком синерезису, і синерезис (виділення рідкої фази з дисперсної структури (напр., гелю), що супроводжується зменшенням об'єму структури) (рис.38). Крива зміни в'язкості,

отримана ротаційним віскозиметром, має s-подібний вигляд. Вона показує, що після завершення індукційного періоду продовжується



формування структури з наростаючою швидкістю. На початку відбувається агрегація окремих параказеїнових частинок, тобто так звана флокуляція - стадія II. Далі слідує стадія формування тривимірної просторової структури. Наприкінці згортання (точка Г) утворився згусток, що являє собою вищий рівень організації структури.

Рис.38. Реограма (а) та еластограма (б) процесу сичужного згортання молока: (I – індукційний період, II – стадія флокуляції, III – метастабільна рівновага, IV – синеретична стадія; O – внесення сичужного ферменту, K – початок явної коагуляції, Г – гель-точка, С – початок синерезиса

Модуль еластичності у нього менше модуля пружності. Тому сичужний згусток слід вважати еластичною системою. Протягом стадії III в'язкість залишається постійною, після чого починається руйнування структури з падінням в'язкості після крапки С (синерезис).

Друга і третя стадія поділяються так званою гель-точкою, положення якої визначається утворенням мінімальної кількості міжміцеллярних зв'язків, яке достатньо для утворення просторової структури - згустку. До гель-точки система зберігає властивості золю, після гель-точки утворюється гель - єдина просторова система, що володіє пружними властивостями. Ділянка реограми ОК відповідає першій частині фази (до розщеплення 85% и -казеїну); ділянка К-Г-С - друга фаза сичужного згортання молока. Ділянка Г-С характеризується зміцненням міжміцеллярних зв'язків і посиленням пружних властивостей просторової системи. У точці С починається розшарування системи на тверду і рідку (сироватка) фази. Час досягнення гель-точки називають часом сичужного

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

згортання (ЧСЗ). Тривалість згортання і реологічні показники згустку залежать від концентрації казеїну і солей кальцію в молоці, його кислотності і температури згортання. При низькому вмісті білка виходить неміцний згусток, і при його обробці збільшуються втрати білка і жиру з сироватки. Додавання солей кальцію і підвищення кислотності в межах, що допускаються, підвищують міцність і еластичність згустку. Це позитивно впливає на синерезис, вихід продукту і його консистенцію.

Робота № 27. Механізм процесу сичужної коагуляції казеїну

Мета роботи: Вивчити механізм процесу сичужної коагуляції казеїну.

Матеріали та обладнання: колби конічні місткістю 100 і 200 см³; циліндр мірний місткістю 100 см³; бюретка місткістю 25 см³; мірна піпетка місткістю 50 см; воронка; паперовий фільтр; 40%-й водний розчин CaCl₂; сичужний фермент; закваска; молоко; віскозиметр; прилад для визначення коефіцієнта розтікання; міліметровка; скло.

Хід роботи:

1. Молоко (масою близько 600 г) пастеризують при температурі 70-72°C і витримують 20-25 с.
2. Потім вносять CaCl₂ у вигляді 40%-ного водного розчину (прозорого, безбарвного) у кількості 10-40, іноді 60 г безводної солі на кожні 100 кг молока.
3. Після чого вносять закваску, кількість якої залежить від виду вироблюваного сиру, ступеня зрілості молока, активності закваски і становить 0,5-2,5% маси нормалізованого молока. На швидкість згортання молока сичужним ферментом впливають рН середовища і концентрація солей кальцію. Оптимальне значення рН 6,0-6,4. При додаванні солей кальцію прискорюється коагуляція, але до певної межі; при надлишку солі процес гальмується.
4. Сичужний фермент (доза - 1 г ферменту стандартної активності на кожні 100 кг молока) вносять у молоко у вигляді 2,5%-ного водного розчину при ретельному перемішуванні, яке триває ще 3-5 хв.
5. Потім підготовлене молоко розливають рівними порціями 6-8 колб або стаканчики, які поміщають у термостат з температурою, зазначеною викладачем, і залишають у спокої. З інтервалом у 5 хв. виймають по одній колбі (склянці) і визначають зміну реологічних характеристик молока в динаміці аж до утворення сичужного згустку.
6. За формуванням згустку можна спостерігати по зміні в'язкості молока (за допомогою різних віскозиметрів), а також побічно.

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

7. На підставі отриманих даних будують реограму процесу сичужного згортання молока, тобто графік зміни в'язкості залежно від тривалості згортання молока. Проводять порівняльний аналіз отриманих даних з відомими літературними.

Контрольні питання:

1. Сутність кислотної коагуляції казеїну.
2. Що відбувається з неденатурованими сироватковими білками в процесі кислотного згортання молока?
3. Зміна казеїну під час сичужного згортання.
4. Фактори, що впливають на тривалість сичужного згортання молока та реологічні показники згустку.

Робота № 28. Визначення кількості молочної кислоти методом титрування

Виробництво молочної кислоти на Україні здійснюється вже більше 50 років. Її виготовляють згідно з вимогами ГОСТу 490-79 “Кислота молочна харчова. Технічні умови”. Діючий стандарт поширюється на кислоту, одержану зброджуванням цукровмісної (цукор-сирець, цукор-пісок, патока рафінадна, меляса бурякова) і лактовмісної сировини (сироватка молочна) молочнокислими бактеріями *Lactobacillus delbrukii*, *L. plantarum* та ін.

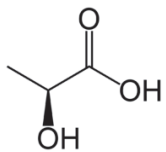


Рис.38. Структурна формула молекули молочної кислоти (C₃H₆O₃)

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.

Мета заняття: Визначити кількість молочної кислоти методом титрування в кисломолочних продуктах.

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

Мікробіологічне виробництво молочної кислоти проводять за наступною схемою:

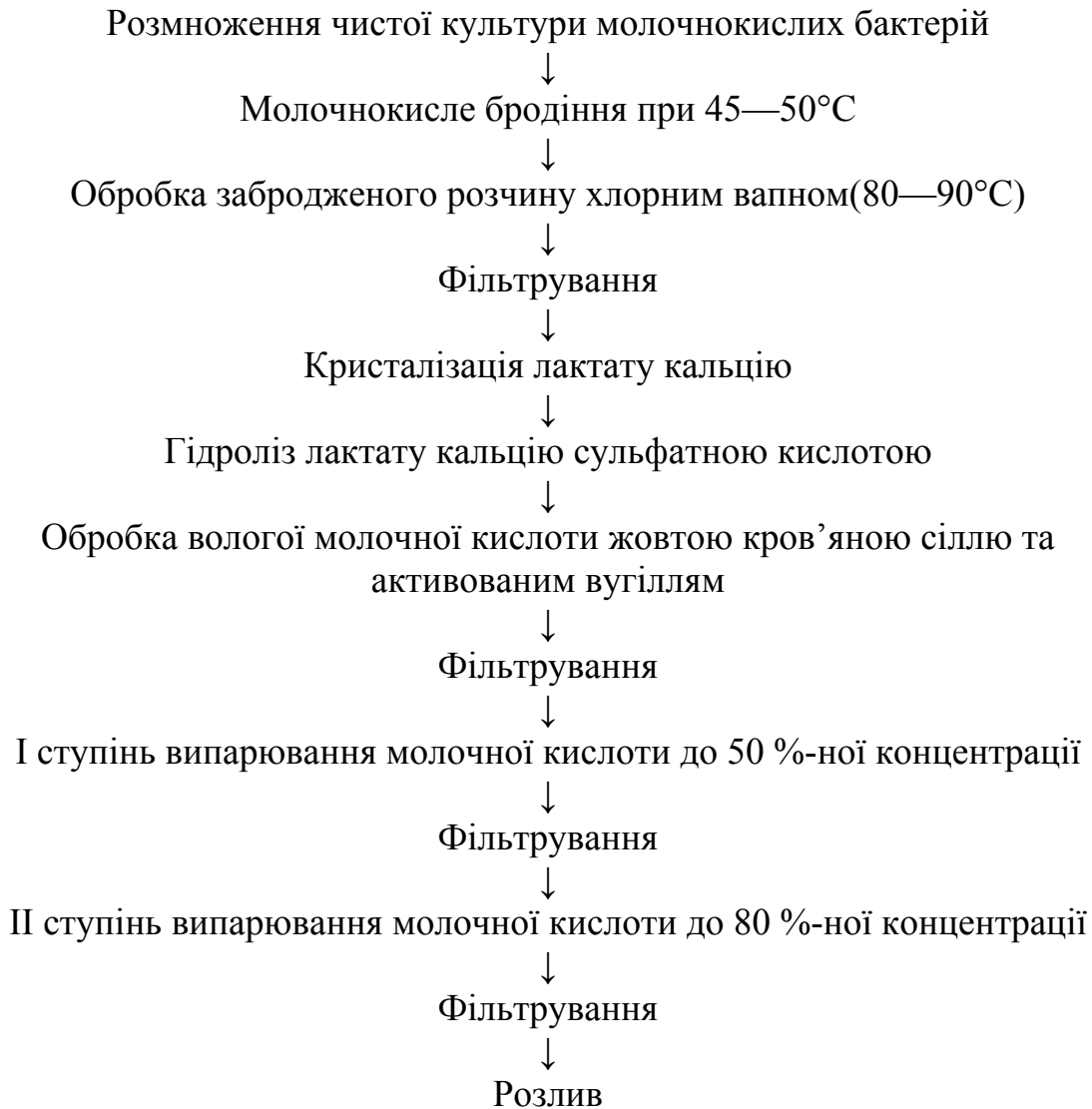


Схема мікробіологічного виробництва молочної кислоти

Хід роботи:

Кількість молочної кислоти визначають методом титрування і за різницею між обсягами 0,1н. розчину NaOH, який було використано на титрування середовища культивування до і після росту бактерій.

1. Для титрування беруть 10 мл культуральної рідини розміщують в колбу Ерленмейера, додають 20 мл дистильованої води, 1 - 2 краплі фенолфталеїну і титрують 0,1 н. розчином NaOH при постійному збовтуванні до появи стійкого слаборожевого забарвлення.

2. Кислотність молока або культуральної рідини виражають у градусах Тернера ($^{\circ}$ T) або відсотках молочної кислоти. Так, 1° T відповідає 1 мл 0,1 н. розчину NaOH, який пішов на титрування 100 мл середовища. Загальний вміст молочної кислоти виражається у відсотках. Оскільки

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

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 відповідає 1°Т.

$$k = x \text{ лугів} \times V \text{ м.к.}$$

де k - кислотність молока, °Т; x лугів – об'єм гідроксиду натрію (лугів), який пішов на титрування, мл; V м.к.- об'єм дослідженої проби, мл.

6. Досліджуваний зразок (молоко, кефір, сметана, вершки, культура молочнокислих бактерій і т. д.) змішують з дистильованою водою у співвідношенні 1: 3, центрифугують 5 хв. при 12 000 об/хв., супернатант зливають в чисту пробірку;

7. 10 мл досліджуваного супернатанта поміщають в колбу Ерленмейера;

8. До проби додають 1-2 краплі фенолфталеїну і титрують 0,1 н. розчином NaOH при постійному збовтуванні до появи стійкого слабо-рожевого забарвлення;

9. Визначають обсяг витраченого на титрування 0,1 н. розчину NaOH, визначають кількість молочної кислоти в °Т.

10. На підставі отриманих даних роблять висновок про якість досліджуваного продукту.

Допустимі норми кислотності в °Т продуктів молочної промисловості наведено в табл.17.

Таблиця 17

Допустимі норми кислотності в °Т продуктів молочної промисловості

Продукт	Кислотність (в °Т)
Молоко	16-18
Ацидофілін	75-130
Ряжанка	85-150
Варенець	75-120
Йогурт	85-150
Мацони	75-120
Кефір	70-120
Творог	240
Сметана	60-100
Вершки	17-18
Кумис	60-120

Контрольні питання:

1. Якими морфологічними ознаками характеризуються молочнокислі бактерії ?
2. Що таке закваски? З чого готуються виробничі закваски на молочних підприємствах?

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

3. Перелічіть групи кисломолочних продуктів залежно від складу мікрофлори заквасок.
4. Охарактеризуйте мікрофлору продуктів, що готуються з використанням багатокомпонентних заквасок. Які це продукти?
5. Які кисломолочні продукти отримують з використанням мезофільних молочнокислих стрептококів? При якій температурі проводять сквашування таких продуктів?
6. Які продукти готують з використанням ацидофільних паличок і біфідобактерій? У чому цінність цих продуктів?
7. Які мікроорганізми входять до складу мікрофлори йогурту, ряжанки?
8. Дайте характеристику основних компонентів живильних середовищ із крохмалевмісної сировини для біосинтезу молочної кислоти.
9. Назвіть основні стадії біотехнології виробництва молочної кислоти або її солей на харчовій сировині.
10. Для чого у технології виробництва молочної кислоти застосовується жовта кров'яна сіль, хлорне вапно, активоване вугілля?

**РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА
ОТРИМАННІ БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ**

**7.1. Особливості використання культур дріжджів і
молочнокислих бактерій у хлібопеченні**

Виготовлення хлібобулочних виробів представляє собою складний цикл мікробіологічних і біохімічних процесів, що відбуваються в тісті з моменту змішування борошна з водою і закінчуючи його випічкою. До складу борошна, використовуюваного для випічки пшеничного і житнього хліба, входять компоненти, необхідні для розвитку багатьох мікроорганізмів. Крім крохмалю в борошні є до 2% зброджуваних цукрів – глюкози, фруктози, мальтози, сахарози, рафінози. Борошно якісних сортів пшениці містить до 14% білка. Його азотовмісні речовини представлені різноманітними групами білків – альбумінами, глобулінами та ін. Борошно містить до 2% жирів і жироподібних речовин і до 2% мінеральних речовин, у тому числі мікроелементи.

Вирішальну роль у приготуванні хліба поряд з ферментами борошна грає життєдіяльність мікроорганізмів. Борошно завжди містить значну кількість різних мікроорганізмів. Їх число залежить від ступеня забрудненості зерна і способів його очищення. Вносять мікроорганізми і з добавками до тіста в процесі приготування хліба. Однак з усього розмаїття мікроорганізмів тіста найбільш важливе значення мають дріжджі та молочнокислі бактерії, для розвитку яких у тісті є всі необхідні умови – вологість 40-50%, незначний вміст молекулярного кисню і наявність поживних речовин. Провідна роль у формуванні якості хліба належить дріжджам. Їх головна функція полягає в заквашуванні тіста, в результаті чого воно піднімається під дією виділяемого при бродінні вуглекислого газу. Мікробіологічні процеси та пов'язані з ними біохімічні зміни в тісті визначають пористість, забарвлення і збереження свіжості хліба, надають йому смак і аромат, дещо підвищують його поживну цінність.

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* різних рас є головними розпушувачами тіста. Для хлібопечення особливо важливі такі властивості дріжджів, як висока потенційна активність гліколітичних ферментів, стійкість їх зберігання, здатність переносити високі концентрації цукрів і NaCl в середовищі. У хлібопеченні найчастіше використовують швидкоростучі раси сахароміцетів верхового бродіння. У повноцінних рас дріжджів підйомна сила, тобто тривалість підйому тіста на стандартну висоту 70 мм в стандартній формі, повинна бути не більше 45 хв. Дріжджі повинні мати 100%-у стійкість до меляси та швидкість росту не менше 0,2 год⁻¹. На хлібо заводах застосовують пресовані і сухі дріжджі.

**РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ
БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ**

Схема приготування рідких дріжджів з пресованих і сухих включає в залежності від сорту хліба заквашування оцукреної та охолодженої до 50°C борошняної закваски молочнокислими бактеріями, наприклад *Lactobacillus delbrueckii*. Вони прискорюють процес бродіння в тісті і мають високу протеолітичну активністю, яка дозволяє накопичувати в тісті значну кількість амінного азоту, позитивно впливає на швидкість росту і підйомну силу дріжджів. Поряд з *Saccharomyces cerevisiae* в тісто можуть спонтанно потрапляти дріжджі родів *Candida* і *Pichia* - *C. krusei*, *C. utilis*, *C. guilliermondii*, *P. xylosa*, *P. vini*. У пшеничних і житніх заквасках переважають молочнокислі бактерії, а не дріжджі.

Виробництво спиртних напоїв також базується на зброджуванні цукрів дріжджами *Saccharomyces cerevisiae*, проте у цьому разі основною вимогою є одержання спирту, а не двоокису вуглецю. Спиртні напої поділяються на три категорії:

— вино й пиво, одержувані зброджуванням фруктового соку або оцукреного екстракту зерна;

—міцні вина, у які додається спирт;

—спирт, одержуваний перегонкою вина або пива.

Морфологія дріжджів. Термін "дріжджі" не має таксономічного значення. До цієї групи мікроорганізмів належать мікроскопічні одноклітинні вищі гриби, які розмножуються переважно брунькуванням або поділом. Таке визначення є недостатньо точним, оскільки окремі види дріжджів здатні в певній фазі розвитку утворювати міцелій, а деякі мікроскопічні міцеліальні гриби в певних умовах культивування ростуть у дріжджеподібній формі. Проте переважне їх існування у вигляді одноклітинних форм дає можливість розглядати дріжджі як окрему групу еукаріотичних мікроорганізмів. Клітини дріжджів мають різноманітну форму: круглу, овальну (*Trixosporon*), яйцеподібну (*Candida*), циліндричну (*Endomyces*), трикутну (*Trigonopsis*), лимоноподібну (*Nadsonia*), грушоподібну (*Schizoblastosporium*), стрілоподібну (*Brettanomyces*), серпоподібну (*Selenotila*) (рис.39).

Для деяких дріжджів форма клітин настільки характерна, що може бути використана для встановлення їх родової належності (наприклад, у *Trigonopsis* клітини трикутні). У представників роду *Candida*, навпаки, морфологія клітин не постійна, вона змінюється залежно від складу середовища та умов культивування, тому не може використовуватись як таксономічна ознака. Розміри дріжджових клітин



**Рис.39. Клітини дріжджів
*Saccharomyces cerevisiae***

РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ

також варіюють у широких межах, мкм: діаметр найдрібніших клітин становить 1,5-2,0, довжина 35, діаметр великих клітин – 8-40, їх довжина – 11-18, довжина витягнутих клітин може досягати 20-25.

При виробництві житнього хліба тісто готують на закваски, які як і деякі пшеничні закваски, є змішаними культурами дріжджів і молочнокислих бактерій, що забезпечує розпушення тіста і нагромадження кислот. Співвідношення молочнокислих бактерій і дріжджів в густих житніх заквасках становить 80:1, а в житніх заквасках без заварки — 40:1, тобто в дозріванні житнього тіста провідна роль належить молочнокислим бактеріям. З гомоферментативних молочнокислих бактерій застосовують *L. plantarum*, з гетероферментативних — *Lactobacillus brevis* і *L. fermentum*. Ці бактерії, крім молочної кислоти і вуглекислого газу, продукують речовини (альдегіди, леткі кислоти, оцтовий і етиловий ефіри), що входять до складу ароматичного комплексу хліба. Висока кислотність житнього тіста (рН 4,2—4,3) сприяє зменшенню активності амілази, впливає на білки житнього борошна, поліпшує його хлібопекарські властивості і перешкоджає розвитку в тісті та хлібі і бактерій — збудників псування.

Про активність молочнокислих бактерій у заквасках і тісті роблять висновок звичайно за кислотонакопиченням, визначаючи кількість молочної кислоти, що утворилася, і летких кислот.

Кислотність напівфабрикатів визначають методом титрування, добре відомим працівникам промисловості. Проте цей метод є суб'єктивним, тому що зміну кольорів індикатора наприкінці титрування встановлюють візуально. При роботі з житніми напівфабрикатами, що мають темне забарвлення, визначити кінцеву крапку титрування досить важко. Крім того, метод титрування погано піддається автоматизації.

Більш об'єктивним методом вважається визначення активної кислотності (рН) напівфабрикатів.

Визначення активної кислотності (рН). Активну кислотність середовища можна визначити, користуючись універсальним індикаторним папірцем. Для цього смужку паперу опускають у випробувану суспензію й, вийнявши, порівнюють отриманий колір індикаторної смужки з кольорами центральної смужки на шкалі. Більш точно можна виміряти рН середовища за допомогою рН-метрів.

Для деяких напівфабрикатів встановлені діапазони рН, які показують готовність напівфабрикатів для подальшої переробки (табл.18). Застосування промислових рН-метрів зі стандартними електродами дозволяє вимірювати кислотність напівфабрикатів періодично, тому що тісто налипає на датчики й доводиться їх щоразу очищати й промивати в дистильованій воді.

Використання автоматичного контролю активної кислотності підвищує точність аналізу, дозволяє одержувати безперервну інформацію

**РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ
БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ**

про хід кислотонакопичення й цим сприяє поліпшенню культури виробництва.

Таблиця 18

Значення рН для деяких напівфабрикатів

Сорт виробу	Досліджуваний напівфабрикат	Діапазон значень рН
Хліб житній з обдирного борошна	Рідка закваска	3,52-3,47
	Опара	4,32-4,26
	Тісто	4,26-4,22
	Хліб	4,18-4,15
Хліб житньо-пшеничний	Рідка закваска	3,80-3,75
	Тісто	4,62-4,57
	Хліб	4,52-4,42

Визначення активності молочнокислих бактерій за зміною забарвлення індикатора. Поширеним методом непрямого визначення активності молочнокислих бактерій у заквасці й тісті є застосування індикаторів, відновлені форми яких під дією ферментів мікроорганізмів змінюють забарвлення.

Між ферментативною активністю молочнокислих бактерій і величиною окислювально-відновного потенціалу є певна залежність. В умовах молочнокислого бродіння окислення вуглеводів відбувається за рахунок відновлення інших речовин. Такі барвники, як метиленова синь і янус-грюн, є акцепторами водню. Відновлюючись, метиленова синь переходить у безбарвну лейкосполуку. Колір янус-грюн під дією молочнокислих бактерій переходить із синьо-зеленого через червоний у рожеві кольори, потім у безбарвний.

Лабораторна робота № 29. Вивчення морфологічних і культуральних ознак дріжджів

Мета: закріпити знання про морфологію дріжджової клітини. Закріплення практичних навичок з приготування препаратів «роздавлена крапля»

Матеріали та обладнання: спиртівки, бактеріологічні петлі, препарувальні голки, предметні та накривні скельця, промивалки з дистильованою водою, мікроскопи, культури дріжджів.

Хід роботи:

1. Приготувати препарати «роздавлена крапля» дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (глянути під мікроскопом, виявити клітини, які діляться, описати способи поділу, замалювати.

РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ

Препарат «роздавлена крапля» готується на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю водопровідної води з дотриманням правил асептики бактеріологічною петлею у воду вносять невелику кількість культури дріжджів, розмішують і накривають накривним скельцем. Не слід вносити велику кількість культури, оскільки препарат буде густим і малоприсадним для спостереження. Не можна допускати утворення бульбашок повітря під накривним склом; за надлишку води її видаляють фільтрувальним папером. Мікроскопування здійснюють з сухою системою.

2. Приготувати препарати "роздавлена крапля" дріжджів *Candida scottii*, *Rodotorula glutinis* розглянути під мікроскопом, замалювати клітини, що брунькуються, псевдоміцелій, бластоспори.

Лабораторна робота № 30. Визначення якості хлібопекарських дріжджів. Особливості підйомної сили дріжджів

Сировина, що використовується в хлібопекарському виробництві, поділяється на основну та додаткову. До основної сировини належить пшеничне та житнє борошно, дріжджі хлібопекарські, сіль, вола; до додаткової — сировина, що застосовується згідно з рецептурою для надання виробам відповідних органолептичних та фізико-хімічних властивостей: цукор, жир, молоко тощо.

Всі види сировини повинні відповідати вимогам стандартів і забезпечувати високу якість готових виробів. Якість сировини контролюють за органолептичними (колір, запах, смак, консистенція) та фізико-хімічними (вологість, зольність, кислотність, тощо) показниками.

В окремих випадках визначають показники якості специфічні для даного виду сировини. Визначення фізико-хімічних показників дріжджів хлібопекарських проводиться за ГОСТ 171—81.

Мета: освоїти методику визначення якості хлібопекарських дріжджів. Отримати дріжджове тісто шляхом змішування дріжджів і борошна. Визначити підйомну силу дріжджів.

Хід роботи:

1. Визначення вологості. Зважують 1,5 г пресованих або 2 г сушених дріжджів із точністю до 0,0002 г і висушують в бюксах у сушильній шафі при температурі 105 °С до постійної маси. Перше зважування здійснюють після 4 год. висушування, наступні — через кожну годину. Різниця між двома наступними зважуваннями не повинна бути більше 0,001 г. Вологість дріжджів, %, визначають за формулою:

$$W_d = (m_d - m'_d) \cdot 100 / m_d$$

**РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ
БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ**

де m_d, m_d' — маса наважки дріжджів до і після сушіння, г.

Розбіжність між двома паралельними визначеннями не повинна перевищувати 0,5 %.

При визначенні вологості дріжджів експрес-методом 5 г пресованих або сушених дріжджів, попередньо подрібнених на лабораторному млині, висушують на приладі ВНДХП марок ВЧ або ВЧМ 7 хв. при температурі 160-162 °С у паперовому пакеті.

2. Визначення підйомної сили. При визначенні підйомної сили зважують 5 г пресованих дріжджів або таку кількість дріжджового молока, в якому міститься 5 г дріжджів, додають 280 г борошна другого сорту, 4 г солі і 160 см³ води (при використанні дріжджового молока враховують воду, внесену з ним) і замішують тісто. Температура його повинна бути 35°С. Тісто, сформоване у вигляді батона, розміщують в нагріту до температури 35 °С металеву формочку (розміри знизу 12,6 x 8,5 см, зверху 14,3 x 9,2 см, висота 8,5 см) з перетинкою, що занурена в неї на 1,5 см. Форму витримують в термостаті при температурі 35 °С. Підйомну силу визначають проміжком часу, за який тісто піднялося і торкнулося перетинки, тобто по підйому тіста на 70 мм.

3. Отримання дріжджового тіста проводять за такою методикою:

- в мірний стакан на 100 мл вносять 3,2 г пресованих дріжджів і трохи води;
- склянкою паличкою дріжджі добре розтирають до зникнення грудок, потім доливають до мітки воду (температура 30°С) і знову добре розмішують;
- у фарфорову чашку переносять 5 мл отриманої дріжджової суспензії;
- додають 8 г пшеничного борошна другого сорту і замішують тісто, надавши йому форму кульки. Приготування тіста і кульки слід робити швидко, не більше 4 хв.;
- кульку опускають у склянку на 200 мл, наповнену водою (температура 30°С);
- відзначають час, що минув з моменту занурення кульки на дно склянки, до моменту її спливання на поверхню води.

Дріжджі дуже гарної якості мають підйомну силу 10-15 хв., гарної - 15-20 хв.

4. Зробити висновок.

Робота № 31. Дослідження вікових особливостей дріжджів

Морфологічні ознаки дріжджової клітини та її внутрішній вміст змінюються з віком (рис.40).

Молоді дріжджі (12—16 год. культивування) інтенсивно розмножуються (70—80 % клітин, що брунькуються). У них тонка

**РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ
БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ**

оболонка, гомогенна (однорідна) цитоплазма, вакуолі відсутні або лише намічаються. Запасні речовини відсутні.

У зрілих дріжджів (24—48 год. культивування) в цитоплазмі з'являється зернистість, вакуолі збільшуються, процес розмноження уповільнюється (не більш як 5—10 % клітин, що брунькуються), з'являються мертві клітини (рис.40). Зрілі дріжджі під час перероблення крохмалистої сировини мають містити не більш як 1% мертвих клітин, меляси — не більше 5 %. У засівних дріжджах пивоварного виробництва допускається до 5 % мертвих клітин.

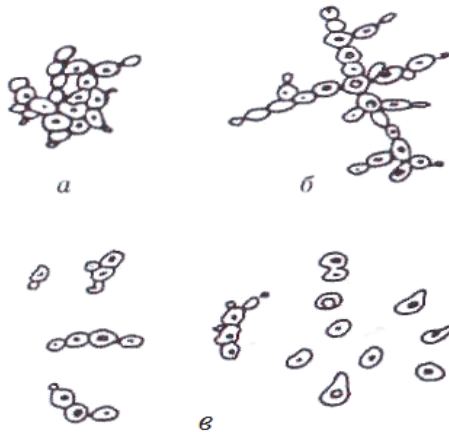


Рис.40. Дріжджі різного віку:
а – молоді; б – зрілі; в – старі

Ознака зрілості дріжджів — наявність глікогену і метахроматину, які відкладаються в клітині як резервний матеріал і витрачаються у міру її старіння. Дріжджі з високою бродильною активністю містять не менш як 60—70 % клітин з глікогеном.

Старі дріжджі (72 год. і більше) мають потовщену оболонку, яку добре видно під час мікроскопування. Цитоплазма гетерогенна (зерниста), вакуолі великі, іноді в клітині їх декілька. Глікоген і метахроматин відсутні. Культура містить значну кількість клітин із жировими включеннями, клітини не розмножуються. Характерна ознака — наявність великої кількості мертвих клітин.

При відмиранні дріжджів цитоплазма скупчується в грудочку, в центрі клітина поступово деформується, оболонка розпадається, і клітина гине.

Мета: навчитись визначати вік дріжджових клітин.

Матеріали та обладнання: спиртівки, бактеріологічні петлі, препарувальні голки, предметні та накривні скельця, промивалки з дистильованою водою, мікроскопи, судан III, формалін, метиленовий синій, культури дріжджів.

**РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ
БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ**

Хід роботи:

1. Приготувати препарати «роздавлена крапля» дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (дослідити під мікроскопом, визначити вік клітин).

2. Виявлення в дріжджових клітинах ліпідних включень, глікогену, мертвих клітин.

Глікоген виявляють за допомогою методу прижиттєвого фарбування дріжджових клітин розчином йоду, від чого вони забарвлюються в червоно-бурий колір. У разі відсутності глікогену дріжджові клітини забарвлюються в солом'яно-жовтий колір.

Жирові включення забарвлюють Суданом III або 1 %-м розчином осмієвої кислоти. На предметне скло наносять невелику краплю 40 %-го розчину формаліну, в яку петлею вносять культуру дріжджів. Формалін вбиває клітини і робить оболонку більш проникною. Через 5 хв. додають краплю метиленового синього, це через 10 хв. — краплю судану III. Препарат накривають покривним склом, надлишок рідини видаляють фільтрувальним папером. Мікроскопують з імерсією. Цитоплазма забарвлюється в синій колір, гранули й краплини жиру — в рожево-жовтогарячий.

Мертві клітини виявляють фарбуванням метиленовим синім. До краплі дріжджової суспензії на предметному склі додають краплю розчину метиленового синього, через 1—2 хв. мікроскопують при збільшенні в 400—600 разів. Метиленовий синій дифундує через оболонку мертвої клітини всередину і забарвлює цитоплазму в синьо-блакитний колір. Живі клітини при цьому залишаються безбарвними. Підраховують загальну кількість синіх (мертвих) клітин не менш як у п'яти полях зору, визначають середній відсоток мертвих клітин.

Контрольні питання:

1. Опишіть властивості дріжджів, важливі для хлібопечення.
2. Наведіть приклади мікроорганізмів, що викликають «хвороби» хліба.

Робота № 32. Визначення активності молочнокислих бактерій

Мета: засвоїти методику визначення активності молочнокислих бактерій.

Матеріали і обладнання: Закваски житні, чисті культури молочнокислих бактерій, рідкі дріжджі, опара, тісто, 0,05%-й водний розчин метиленової сині, пробірки, стерильна вода, мірний циліндр місткістю 25 см³.

**РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ
БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ**

Хід роботи:

1. Наважку проби 10 г ретельно розтирають у ступці із дворазовою кількістю води, попередньо нагрітої до 40 °С, доливаючи воду поступово невеликими порціями (чисті культури молочнокислих бактерій і житні закваски досліджують без розбавлення водою, відбираючи по 20 г зразка). Приготовлену пробу (по 10 г) за допомогою мірного циліндра на 10 см³ переносять у дві пробірки. У дослідну пробірку додають 1 см³ 0,05 %-го водного розчину янус-грюн або 1 см³ 0,05 %-го водного розчину метиленової сині. Вміст пробірки ретельно перемішують до рівномірного розподілу барвника. Друга пробірка слугує контролем. Обидві пробірки поміщають у водяну баню при температурі 40 °С.

2. Активність молочнокислих бактерій у напівфабрикатах визначається за швидкістю переходу блакитного забарвлення метиленової сині (або синьо-зеленого забарвлення янус-грюн) у безбарвне, аналогічне з кольорами середньої частини проби в контрольній пробірці. При цьому необхідно уникати дії прямих сонячних променів під час аналізу, що може змінити результати визначення.

3. За експериментальними даними відновлення забарвлення янус-грюн відбувається при аналізі опари приблизно за 35- 50 хв., тіста — за 40-50 хв. і на кінець вистоювання тіста — за 35 -45 хв. У житньому тісті тривалість аналізу становить 50- 75 хв. Зробити висновки.

**7.2. Біотехнологічні аспекти пивоваріння
та виготовлення квасу**

Більша частина пива виготовляється з ячменю, хоча іноді для цього використовують і інші зернові культури.

Основні технологічні стадії виготовлення пива:

—зерна ячменю спочатку осолоджують, тобто пророщують упродовж короткого проміжку часу. Основна мета осолоджування — утворення комплексу амілазних ферментів, здатних розщеплювати крохмаль;

—осолоджений ячмінь подрібнюють і змішують з водою при температурі не вище як 67°С. За кілька годин ферменти розщеплюють довгі ланцюги крохмалю на дрібніші вуглеводні фрагменти, крім того, частково гідролізуються білки і утворені продукти здатні асимілюватися дріжджами;

—отриманий водний екстракт (солодове сусло) звільняють від уламків зерна і варять, додаючи хміль для надання пиву характерного смаку. У процесі варіння сусла з хмелю екстрагуються різні речовини, при цьому відбувається інактивація ферментів і осадження білків;

—до сусла вносять дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, які здійснюють спиртове бродіння. Під час бродіння відбувається п'ятикратне збільшення

РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ

біомаси дріжджів;

—інші продукти метаболізму дріжджів значною мірою визначають смак пива. До них належать спирти (аміловий, ізоаміловий та фенілетиловий, які містяться у пиві в концентрації кількох міліграмів на 1 л), коротколанцюгові кислоти (оцтова й масляна), а також їхні ефіри;

— наприкінці ферментації дріжджі видаляють із пива й залишають його для дозрівання на певний період часу.

Після фільтрації і пастеризації готове пиво розливають у тару.

Зазвичай у пивоварінні використовують два типи дріжджів. Для приготування лагерного пива традиційно застосовують дріжджі, які осаджуються під час бродіння на дно ферментери. Ці «низові» дріжджі були вперше виділені у чисту культуру близько 100 років тому датським ботаніком Е.К. Хасеном, який працював у Карлберзькому інституті у Копенгагені. Вони отримали назву *Saccharomyces carlsbergensis*. Інші дріжджі, використововувані у пивоварінні класифікують як *Saccharomyces cerevisiae*. Систематики нині не поділяють ці дріжджі на два види, проте у пивоварінні користуються двома різними назвами. Упродовж багатовікової практики пивоваріння штами пивних дріжджів підбирали емпірично, проте у наш час намагаються змінити генетичну структуру пивних дріжджів відповідно до потреб кожного процесу.

Безалкогольні напої та пиво мають бути епідеміологічно безпечними. Для цього проводять визначення наявності БГКП, патогенних мікроорганізмів, у тому числі сальмонел, пліснявих грибів і дріжджів.

Для рідких смакових товарів (напої, пиво й ін.) відбираються проби (в см³). На кожний конкретний вид продукту встановлюється нормативна документація на відбір проби. Якщо нормативної документації немає, то від кожної пакувальної одиниці, що потрапила у вибірку, відбирають: не менше 1 шт. під продукції в споживчій тарі; до 1000 г (см³) — від продукції транспортній тарі (рідкої, пастоподібної, сипучої, змішаної консистенції).

Рідкі напої, насичені вуглекислим газом (CO₂), переносять у стерильний посуд, закритий ватною пробкою (конічну колбу), і підігрівають при частому перемішуванні круговими рухами у водяній бані при температурі від 30 до 37°C доти, поки не перестануть виділятися пухирці газу.

Робота №33. Дослідження культур дріжджів, що використовуються в пивоварінні. Вивчення класичних технологій пивоваріння

Пивні дріжджі відносяться до двох видів: *Saccharomyces cerevisiae* та *Saccharomyces carlsbergensis*. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* є дріжджами верхового бродіння і в пивоварінні використовуються рідко, в

РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ

основному для темних і спеціальних сортів пива. Ці дріжджі у виробничих умовах зброджують сушло при 12-15°C.

Дріжджі *Saccharomyces carlsbergensis* відносяться до дріжджів низового бродіння та у виробництві здійснюють головне бродіння при 5-10°C. Вони знайшли широке застосування в пивоварному виробництві і використовуються для приготування стандартного і сортового пива.

Вимоги, що пред'являються до **пивних дріжджів**. Основні вимоги, що пред'являються до рас дріжджів при виробництві спирту є:

- Повинні мати високу бродильну активність. Бродильна активність визначається ступенем зброджування сусла, тобто відношенням маси забродженого екстракту до маси сухих речовин (СР) в початковому суслі;
- Повинні володіти флокуляційною здатністю, тобто здатністю повільно та повно осідати на дно бродильних апаратів в кінці головного бродіння;
- Повинні мати помірну здатність до розмноження. Дуже активне розмноження дріжджів небажано, тому при цьому витрачаються екстрактивні речовини сусла і утворюється велика кількість побічних продуктів. У середньому в процесі бродіння біомаса дріжджів збільшується в 3 ... 4 рази;
- Повинні бути стійкими до несприятливих умов і інфікуванню;
- Повинні володіти стійкістю морфологічних і фізіологічних властивостей;
- Повинні надавати пиву характерний смак і аромат.

Спиртові дріжджі. У спиртовому виробництві застосовують дріжджі виду *Saccharomyces cerevisiae*, які повинні мати наступні властивості:

- Висока бродильна активність. Спиртові дріжджі повинні утворювати максимум спирту;
- Здатність зброджувати як моноцукри, так і дисахариди і деякі декстрини;
- Здатність зброджувати розчини, що містять досить великі концентрації цукру;
- Висока кислотостійкість;
- Здатність здійснювати спиртове бродіння при високому вмісті спирту в розчині.

Виробництво пива складається з наступних етапів:

1. Підготовка солоду - солод провіюють і подрібнюють.
2. Затирання сусла - подрібнений солод змішується з водою. При затиранні крохмаль у зернах розщеплюється до цукру, мальтози і розчинних речовин декстринів. Сушло при цьому набуває солодкуватий смак. Затор - суміш подрібнених зернопродуктів, призначених для затирання, з водою.

**РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ
БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ**

3. Фільтрація затору - затор перекачується у фільтр - чан, де відбувається його поділ на неохмелене сусло і дробину. Дробина - нерозчинні залишки ячменю, одержувані в процесі фільтрації затору.

4. Кип'ятіння сусла - сусло з додаванням хмелю а також інших інгредієнтів вариться 1-2 години. Під час кип'ятіння хміль розчиняється, білкові речовини коагулюють і випадають в осад. Крім того, випаровується різні ароматичні компоненти, що несприятливо впливають на смак пива.

5. Освітлення сусла - сусло перекачують у гідроциклон (Вірпул) для відділення нерозчинних залишків ячменю і хмелю. Ці частинки, під дією відцентрової сили, збираються по радіусу гідроциклону. Після 20-30 хвилин відстоювання сусло відділяють від нерозчинного залишку.

6. Охолодження і аерація сусла - сусло перекачується в бродильний танк. Протягом перекачування воно охолоджується і насичується киснем, необхідним для харчування дріжджів.

7. Бродіння - в отриманий розчин додаються пивні дріжджі, і він зброджується при низьких температурах кілька тижнів. Пиво стає насиченим пивними дріжджами (мікроорганізмами), корисними мікро-та макроелементами, в ній дуже високий вміст вітаміну РР. Через це живе пиво завжди має осад на дні.

8. Дозрівання пива.

9. Фільтрація - пиво фільтрується від залишків дріжджів. Фільтроване пиво відрізняється тим, що воно більш стабільне, і може зберігатися до 2-х тижнів.

10. Пастеризація - деякі сорти пива піддаються пастеризації – нагрівання до температури 68-72 °С, для збільшення терміну зберігання. Таке пиво зберігається до 6-ти місяців.

Мета: ознайомитись з технологічними етапами виготовлення пива. Оцінити якість пива за мікробіологічними показниками. Ознайомлення з біотехнологічними стадіями та процесами у пивоварінні. Приготування пива в лабораторних умовах у міні-пивоварні.

Реактиви і матеріали: Екстракт солоду та хмелю для приготування пива, стерильний посуд для посіву й селективні середовища, культура дріжджів, міні-пивоварня.

Хід роботи:

1. Відібрати середню пробу пива.
2. Зробити посіви на всі мікробіологічні показники.
3. На наступному занятті підрахувати число колоній, що вирости, перерахувати на 1 см³ продукту.
4. Результати занести в таблицю 19. Порівняти отримані результати з нормативними показниками, зробити висновок про якість безалкогольних напоїв.

**РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ
БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ**

Таблиця 19

Мікробіологічні показники пива

Найменування продукту	КМАФАМ, КУО/см ³ , не більше		Об'єм продукту, см ³ , в якому не допускається				Висновки
			БГКП		патогенні мікроорганізми, у тому числі сальмонели		
	нор- матив	результат	нор- матив	результат	нор- матив	результат	
Пиво пастеризоване в пляшках, металевих банках та інших видах споживчої тари	5·10 ²		10		25		
Пиво пастеризоване в пляшках з масовою часткою сухих речовин:							
8 - 11,5 %	—		3		25		
12 - 20 %	—		10		25		
Пиво розливне фільтроване та нефільтроване	—		1		25		

5. Підписати основні апарати в класичній технології пивоваріння (рис.41).

6. Використовуючи готові компоненти, приготуйте пиво у міні-пивоварні:

6.1. Налийте воду трохи більше половини пивоварні.

6.2. Налийте у пивоварню воду до відмітки «лінія завантаження».

Додайте дріжджі та герметично закрийте ємність.

6.3. Дочекайтесь, доки продукти бродіння осядуть (3-4 дні), а потім поставте Міні Пивоварню в холодильник для охолодження та дозрівання пива (5-6 днів).

6.4. Через 7-10 днів від початку приготування пиво готове до вживання. Додайте CO₂ за необхідністю.

Контрольні питання:

1. Охарактеризуйте сировину для виробництва спирту та його показники якості.
2. Назвіть основні показники якості спирту.
3. Назвіть основні етапи виробництва спирту.
4. Проаналізуйте процеси вирощування дріжджів.
5. Назвіть основне устаткування спиртзаводів та їх призначення.

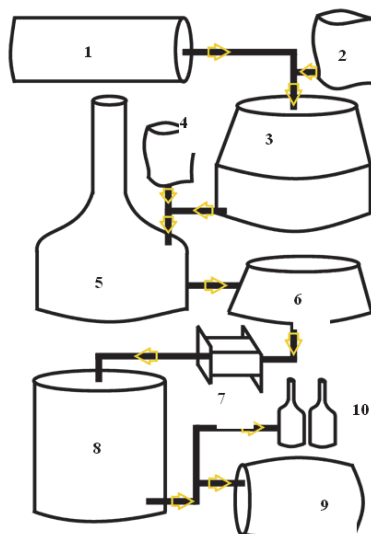


Рис.41. Основні апарати в класичній технології пивоваріння

Робота № 34. Приготування хлібного квасу з концентрату квасного сусла

Хлібний квас - напій, який одержують внаслідок незавершеного молочнокислого і спиртового бродіння, виготовлений з використання зернової сировини.

Квас виготовляють тинктурним (настоюванням) і раціональним способом, а також з концентрату квасового сусла. Суть тинктурного способу полягає у вилученні з подрібнених спеціально випечених квасних хлібців (або сухого хлібного квасу) екстрактивних речовин шляхом дво- чи триразового настоювання їх у гарячій воді (температура 70-73°C).

Квасні хлібці є напівфабрикатом для приготування квасу. Тісто для квасних хлібців одержують з ячмінного і житнього солоду з додаванням житнього борошна, його випікають за температури 170°C впродовж 6-8 год.

Раціональний спосіб одержання квасного сусла характеризується попереднім запарюванням подрібненого житнього ферментованого солоду і житнього борошна під тиском впродовж 2 год., після чого запечену масу оцукрюють ячмінним солодом.

В останні роки для приготування квасового сусла використовують концентрат сусла, що виготовляється на спеціалізованих заводах з ферментованого житнього або кукурудзяного борошна.

Формування якості квасу у процесі виробництва

Схему виробництва квасу наведено на рис. 42. Підприємства «Оболонь» і «Росинка», «Світоч» і «АВК», «Ензим» і «Просто добрий хліб», «Марс» і «Київхліб» та багато інших відомих торгових марок були

**РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ
БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ**

клієнтами Київського заводу солодових екстрактів. Це єдине спеціалізоване підприємство в Україні з випуску солодових екстрактів. Упродовж останніх 40 років завод, що має понад столітню історію, випускає більше 20 видів високоякісних солодових екстрактів, призначених для молочної, пивоварної, безалкогольної, хлібопекарської, кондитерської та інших галузей промисловості.

Солодові екстракти – це натуральні продукти, виготовлені з пророслих зерен злакових культур (солоду): ячменю, жита, вівса, пшениці, кукурудзи й ін. Випускаються у вигляді сиропоподібної рідини від світло-до темно-коричневого кольору із вмістом сухих речовин не менш 70%–73%, а також у вигляді дрібнодисперсного порошку (не менш 95% сухих речовин), мають приємний кисло-солодкий смак і характерний солодовий аромат.

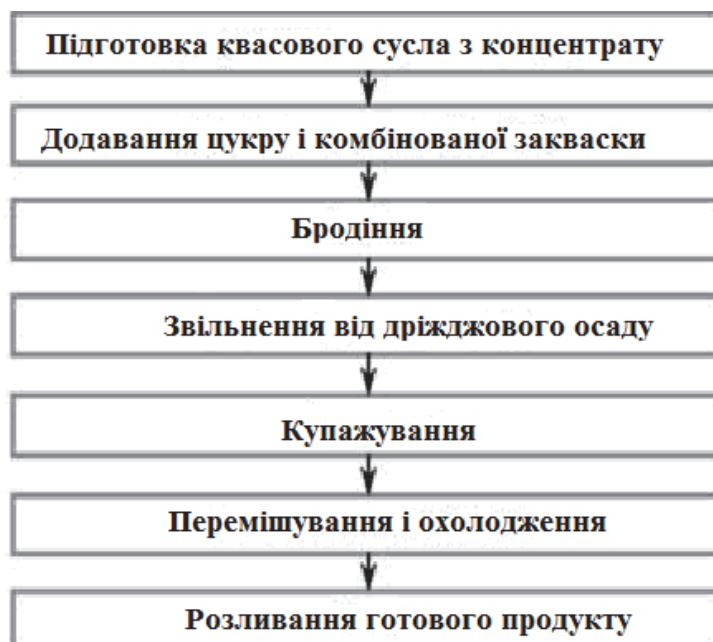


Рис. 42. Узагальнена схема виробництва квасу

Ячмінно-солодові екстракти (ЯСЕ-1, ЯСЕ-2, ЯСЕ-5) – продукти, приготовлені з ячмінного солоду, пшениці або ячменю згідно з ТУ У 18.193-94. Мають високу біологічну активність, високий вміст амінокислот, вуглеводів, мінеральних речовин. Як компонент начинки (фруктової, горіхової, макової) і наповнювача з дозуванням 2–10%, вони частково замінюють цукор і патоку, збагачують готові вироби вітамінами, вуглеводами, мінеральними речовинами і фітогормонами натурального походження.

У виробництві пшеничного хліба, виробів із дріжджового тіста дозування ЯСЕ складає, як правило, 1–5% від маси борошна. Дріжджове тісто для дрібної випічки завдяки ячмінно-солодовим екстрактам має ліпшу консистенцію, що визначає кінцевий об'ємний вихід виробу. Крім

РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ

того, смакові й ароматичні якості готового виробу зберігаються досить довго.

Ще однією перевагою цільового застосування ЯСЕ в кількості 1 до 5% від маси борошна є уникнення передчасного черствіння хлібобулочних виробів, виготовлених із замороженого тіста. Класичним використанням солодових екстрактів у кількості від 0,5 – 2.5% від маси борошна є борошняні кондитерські вироби тривалого збереження – пряники, печиво крекер, рулети тощо. ЯСЕ сприяє еластичності та м'якості тіста за рахунок вуглеводів натурального походження, що містяться в ньому. Це забезпечує продовження терміну придатності хлібобулочних і кондитерських виробів тривалого зберігання, а також поліпшує смакову гаму випічки.

Мета роботи: Ознайомлення з особливостями приготування хлібного квасу з концентрату квасного сусла

Матеріали та обладнання: ячмінно-солодовий екстракт для приготування квасу, культура дріжджів, міні –пивоварня.

Хід роботи:

1. З концентрату квасового сусла готують напівфабрикат шляхом розчинення його водою у 2-2,5 рази.

2. До готового квасового сусла додають 25 % цукру від кількості, передбаченої за рецептурою (у вигляді відфільтрованого цукрового сиропу) і комбіновану закваску з чистих культур дріжджів і молочнокислих бактерій.

3. Бродіння здійснюють за температури 25-30°C до зниження вмісту сухих речовин на 0,8-1,0 % і досягнення кислотності 2 см 1,0 моль/дм розчину КаОН на 10 дм квасу.

4. Звільнений від дріжджового осаду квас купажують, додаючи до нього решту (75 %) цукру і 30 % концентрату квасового сусла.

5. Готовий квас ретельно перемішують, перевіряють на відповідність до якісних показників вимог стандарту, охолоджують до температури 12°C і подають на розлив.

6. Фасування квасу здійснюють за ізобаричних умов.

**РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ
ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ**

8.1. Біотехнологія отримання мікробних ферментів

Як продуценти ферментів використовуються культури представників різних таксономічних груп - бактерій, актиноміцетов, мікроскопічних та вищих базидіальних грибів. Останні в лабораторній та промисловій культурі ведуть себе аналогічно мікроскопічним грибам.

До мікроорганізмів - продуцентів ферментів ставляться такі вимоги: наявність високої ферментативної активності; переважний синтез ферменту або групи ферментів, що перетворюють певний субстрат; генетична стабільність за ознакою синтезу ферменту або ферментів; достатньо висока швидкість росту; здатність рости на середовищах з доступними і недорогими джерелами живлення.

Серед мікроорганізмів, що володіють високою активністю певного ферменту, перевага віддається тим, які в оптимальних фізіологічних умовах здатні синтезувати переважно один фермент або групу споріднених ферментів (наприклад, тільки α -амілазу або тільки комплекс целюлаз). Це пов'язано з тим, що, по-перше, при направленому синтезі досягається найбільш висока ферментативна активність, по-друге, препарати з вираженою активністю певних ферментів і відсутністю або слідовими кількостями інших ферментів можуть застосовуватися для впливу на індивідуальні компоненти складних субстратів, по-третє, такі ферментні препарати зручні для складання мультиензимних композицій із заданою активністю декількох ферментів.

Здатність до активного синтезу одного або групи близьких ферментів властива тим мікроорганізмам, у яких біосинтез цих ферментів носить не конструктивний, а індукований характер, тобто різко посилюється в присутності індукторів, в якості яких найчастіше виступають субстрати ферментів або продукти їх неповного розщеплення.

Найважливішою якістю продуцента ферменту є його генетична стабільність, яка виражається в здатності зберігати протягом багатьох поколінь певний рівень біосинтезу ферменту у відповідних умовах.

Генетична стабільність властива природним штамам мікроорганізмів, які пройшли тривалий шлях природного відбору. Однак у практиці часто використовують штами, отримані штучною селекцією, із застосуванням мутагенів. Такі штами мають високу мінливість, нестабільність ознак.

Необхідна постійна селекційна робота з підтримання корисних ознак штамів на певному рівні. При цьому спираються на відому кореляцію зовнішніх (морфологічних) і фізіолого-біохімічних ознак мікроорганізмів. Контроль за появою небажаних форм ведуть як шляхом їх візуального

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

виявлення при розсівах штамів, так і за допомогою серологічних методів, виявляючи неактивні варіанти з їх реакції із специфічними сироватками.

Нестійкість генетичних ознак - причина частої зміни продуцентів ферментів в умовах промислового виробництва. Зміна штаму тягне за собою зміну ферментативного комплексу препаратів, фізико-хімічних і каталітичних властивостей окремих компонентів. Це може виражатися в зміні оптимальних умов дії ферментів (рН, температури), термо- і рН-стабільності, стійкості до дії інгібіторів і до протеолізу, здатності атакувати нативний або модифікований субстрат, співвідношення продуктів реакції, граничного ступеня перетворення субстрату.

Зміна таких характеристик, як гідрофобність ферменту, величина молекулярної маси, ізоелектрична точка, поверхневий заряд молекули при певному рН, відбивається на технологічних властивостях ферменту, його поведінці і процесах очищення і виділення, що впливає на склад і властивості ферментативного комплексу препарату. Зміна складу і властивостей ферментативних комплексів спостерігається не тільки при зміні штамів-продуцентів, але і при появі нехарактерних морфологічних варіантів, що утворюються в процесі природної мінливості культур мікроорганізмів. Враховуючи названі фактори, доцільно періодично уточнювати характеристики ферментних препаратів.

До суто технологічних характеристик продуцентів ферментів слід віднести їх швидкість росту, стійкість до інфекції, ставлення до джерел живлення та інших зовнішніх факторів. Культивування продуцентів ферментів проводять в умовах стерильності (глибинний процес) або максимально можливого наближення до них (поверхневий твердофазний процес). Збереження чистоти культури не менш важливо, ніж генетична стабільність продуцента. Забезпечення стерильності полегшується при нетривалому культивуванні продуцента і наявності у нього природних механізмів захисту від інфекції. Стабільність рівня біосинтезу ферментів вище у мікроорганізмів, здатних розвиватися в широкому діапазоні зміни зовнішніх факторів, таких як концентрація джерел живлення, реакція середовища, рівень аерації та ін. Виходячи з економічних міркувань, доцільно використовувати доступні і недорогі джерела живлення.

У промисловості випускається широкий асортимент препаратів мікробного походження, продуцентами яких є представники різних таксономічних груп. Більшу частину валової кількості ферментів, особливо гідролітичних, виробляють на основі культивування бацил (*Bacillus subtilis*), мікроскопічних грибів родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, а також актиноміцетів родів *Actinomyces*, *Streptomyces*. Найчастіше використовують мезофільні штами аеробних мікроорганізмів.

Переважає спосіб культивування мікроорганізмів є глибинний, заснований на вирощуванні продуцентів в стерильних рідких середовищах з примусовою аерацією (для аеробних форм) і перемішуванням середовища, при автоматичному регулюванні параметрів процесу, таких як

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

температура, рН середовища, її окислювально-відновний потенціал, концентрація розчиненого кисню.

Поряд з глибинним застосовується поверхневий спосіб культивування, коли культури продуцентів вирощують на поверхні рідких і сипучих (твердофазне культивування) поживних середовищ (висівки, буряковий жом, подрібнена целюлозовмісна сировина, солодові паростки та ін.). Останні звожують і стерилізують.

Пріоритет віддають твердофазному процесу, так як умови культивування продуцентів максимально наближені до природних, в яких більш повно реалізується біопотенціал мікроорганізмів. Клітини мікроорганізмів безпосередньо контактують з поживними субстратами і не піддаються несприятливим механічним впливам, неминучим при глибинному культивуванні. Твердофазна культура добре аерується. Наприкінці ферментації отримують культуру у формі, зручній для виділення ферментних препаратів.

Глибинне культивування використовується як для аеробних, так і для анаеробних продуцентів, твердофазне – тільки для аеробних, а саме для мікроскопічних та вищих базидіальних грибів.

Розрізняють ферментні препарати розчинні і іммобілізовані. У розчинних препаратів активна частина розчиняється у водному середовищі. По закінченні ферментативної обробки субстрату розчинний препарат залишається в реакційному середовищі і вдруге не використовується. Поряд з розчинними випускають також іммобілізовані ферменти. Іммобілізація - це включення об'єкта в ізольовану фазу, яка відокремлена від фази вільного розчину, але здатна з нею обмінюватися молекулами (субстратів, ефекторів).

Іммобілізовані ферменти отримують шляхом зв'язування з носіями розчинних ферментів або клітин мікроорганізмів, що володіють ферментативною активністю. Найбільш поширені способи зв'язування - це сорбція на носії, ковалентне зв'язування і включення в структуру гелів-носіїв. Іммобілізація наближає умови функціонування ферментів до природних. У природі більша частина ферментів асоційована зі структурами живих організмів або елементами навколишнього середовища, що важливо для прояву активності ферментів та їх стабільності.

Іммобілізовані ферменти мають ряд переваг перед розчинними при проведенні процесів промислового біокаталізу. Іммобілізовані ферменти можна вилучити з реакційного середовища, що дозволяє контролювати хід ферментативної реакції і багаторазово використовувати ферментні препарати. Каталітичний процес можна проводити безперервно, пропускаючи розчини субстратів через реактори з іммобілізованими ферментами. Продукти реакції не забруднюються домішками ферментних препаратів. Іммобілізовані ферменти мають високу операційну

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

стабільність, а їх каталітичні властивості можливо модифікувати, змінюючи спосіб зв'язування і вид носія.

Застосування іммобілізованих ферментів дозволило вирішити завдання створення великих промислових біокаталітичних виробництв, за допомогою яких виробляють амінокислоти, органічні кислоти, цукри, органічні розчинники, метан, антибіотики, гормональні препарати, здійснюють очищення стічних вод і водойм, біоконверсію органічних відходів (табл.20).

Велика кількість промислово важливих ферментів відносяться до класу деполімераз і є позаклітинними, діючи на полісахариди, білки і нуклеїнові кислоти. Переваги позаклітинних ферментів для їх промислового отримання полягають у наступному:

– доступність виявлення штамів-продуцентів за рахунок дифузії ферментів у агаризоване середовище, що містить субстрат для них і появи навколо колоній зон, що свідчать про дію ферменту;

– можливість підвищення кількісного виходу ферментів:

а) за рахунок правильного вибору штамів-продуцентів;

б) мутагенезу клітин продуцента;

в) селекції продуцента на надсинтез ферментів;

Таблиця 20

Найбільш важливі ферменти і області їх застосування

Фермент	Застосування
α -Амілаза	Пивоваріння, виробництво спирту
Аміноацілаза	Отримання L-амінокислот
Каталаза, глюкозооксидаза	Антиоксидант в готових до вживання харчових продуктах
Целюлаза	Отримання спирту і глюкози
Фіцін	Розм'якшення м'яса, освітлювання соків
Глюкоамілаза	Пивоваріння, виробництво спирту
Глюкозоізомераза	Виробництво сиропів з високим вмістом фруктози
Інвертаза	Інверсія сахарози
Лактаза	Утилізація сироватки, гідроліз лактози
Ліпаза	Сироваріння, отримання ароматизаторів
Пектиназа	Освітління соків, виробництво спирту
Протеаза	Детергент, виробництво спирту
Ренет	Сироваріння

г) клонування генів, відповідальних за продукцію ферментів;

д) регуляції синтезу продукції ферментів факторами зовнішнього середовища;

– можливість створення умов культивування, що забезпечують максимальну продукцію ферменту;

– відносна простота і легкість очищення ферментних препаратів.

Робота № 35. Отримання екзоферментів бактерій роду *Pectobacterium*

Позаклітинні ферменти, які продукують фітопатогенними бактеріями роду *Pectobacterium*, відносяться в основному до класів протеаз, целюлаз і пектиназ (зокрема, пектатліаз).

Мета роботи: Використовуючи різні штами бактерій роду *Pectobacterium*, виявити якісними методами продукцію позаклітинних ферментів целюлаз і протеаз. Визначити вплив катаболітної репресії (КР) глюкозою на продукцію позаклітинних ферментів пектатліаз у ptsI-мутанта і бактерій дикого типу *Pectobacterium chrysanthemi*.

Хід роботи:

1. Визначення продукції ферментів і впливу на неї катаболітної репресії

I. Для визначення протео-і целюлозолітичної активності використовують наступні штами бактерій, які вирости на поверхні повноцінного агаризованого середовища:

Pectobacterium carotovora subsp. *carotovora* J289 - дикий тип;
Pectobacterium chrysanthemi A350 - дикий тип; *Pectobacterium carotovora* subsp. *atroseptica* D3310 - гіперпродуцент екзоферментів.

1. Визначення целюлолітичної активності проводять на мінімальному глюкозо-сольовому середовищі, що містить 0,2% розчинної целюлози. Досліджувані штами засівають за допомогою петлі і чашки інкубують протягом 48 год. при 28°C. Після зазначеного періоду, чашки заливають 0,1% розчином барвника Конго червоного (3-4 мл) і витримують 15 хв. Барвник зливають, а чашки промивають кілька разів 8% розчином NaCl. Наявність світлих не зафарбованих плям в місці росту бактерій і навколо них свідчить про продукцію клітинами позаклітинних целюлолітичних ферментів.

2. Визначення протеолітичної активності проводять на мінімальному глюкозо-сольовому середовищі, що містить в якості субстрату 1% знежиреного молока. Досліджувані штами засівають з допомогою петлі «медальйонами» і чашки інкубують протягом 48 год. при 28°C. Відзначають наявність зон освітлення навколо нанесеної суспензії мікроорганізмів, які свідчать про продукування бактеріями протеолітичних ферментів.

II. Для визначення впливу катаболітної репресії (КР) глюкозою на продукцію пектатліаз використовують штами бактерій, які вирости на поверхні повноцінного агаризованого середовища:

Pectobacterium chrysanthemi ENA49 - дикий тип бактерій, чутливий до КР;

Pectobacterium chrysanthemi ENA49/50 - ptsI-мутант бактерій, стійкий до КР;

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

Pectobacterium chrysanthemi ENA49/50 (R'pts/) - ptsI-мутант, що має у складі плазміди pULB113 ptsf-ген *E. coli*.

3. Пектатліазна активність визначається на середовищі, яке містить поліпектатний гель. Він готується таким чином: 3 мл 1% розчину поліпектата натрію нашаровують на поверхню повноцінного агаризованого середовища, що містить іони Ca (3 мл 1М розчину CaCl₂ на 100 мл середовища). Досліджувані штами засівають за допомогою петлі «медальйонами» і чашки інкубують протягом 48 год. при 28°C. Штами бактерій, які продукують пектолітичні ферменти, утворюють лунки на поверхні поліпектатного гелю.

4. Для визначення впливу катаболітної репресії на продукування позаклітинних пектатліаз ті ж штами бактерій *Pectobacterium chrysanthemi* вирощують на середовищі для визначення пектолітичної активності з підвищеною кількістю (1%) глюкози.

5. Здатність штамів *Pectobacterium chrysanthemi* утилізувати глюкозу визначається на середовищі ЕМВ (що включає барвники еозин і метиленовий синій), до якого входить повноцінне агаризоване середовище, глюкоза і барвники. Досліджувані штами засівають за допомогою петлі «медальйонами» на поверхню середовища і чашки інкубують протягом 48 год. при 28°C. Штами бактерій, які утилізують глюкозу набувають темно-синього (металевого) кольору, що не утилізують глюкозу - рожевого кольору.

2. Облік результатів.

Для цього чашки переглядають і відзначають:

1. Наявність целюлолітичної активності у штамів бактерій роду *Pectobacterium* за появою зон освітління на середовищі з розчинною целюлозою після фарбування Конго червоним.

2. Наявність протеолітичної активності у штамів бактерій роду *Pectobacterium* за появою зон освітління навколо штамів після їх вирощування на середовищі зі знежиреним молоком.

Отримані результати заносять в табл.21.

Таблиця 21

Активність ферментів штамів бактерій роду *Pectobacterium*

Штам	Ферменти	
	Целюлази	Протеази
<i>Pectobacterium carotovora subsp. atroseptica</i> 3-2		
<i>Pectobacterium carotovora subsp. carotovora</i> J289		
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i> A350		
<i>Pectobacterium carotovora subsp. atroseptica</i> D3310		

Примітка. Ступінь вираженості ферментативної активності умовно визначають в балах (від «0» до «5»).

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

3. Наявність пектолітичної активності у штамів *Pectobacterium chrysanthemi* по появі лунок розрідження поліпектатного гелю навколо засіяних колоній.
 4. Вплив катаболітичної репресії глюкозою на продукцію пектатліаз у штамів *Pectobacterium chrysanthemi* з появою лунок розрідження поліпектатного гелю навколо засіяних колоній.
 5. Здатність утилізувати глюкозу у штамів *Pectobacterium chrysanthemi* з фарбування колоній.
- Отримані результати заносять в табл. 22.

Таблиця 22

Активність пектатліаз і характер росту у штамів бактерій *Pectobacterium chrysanthemi*

Властивості штамів	Пектолітична активність на середовищі		Здатність утилізувати глюкозу
	без глюкози	з глюкозою	
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i> ENA49			
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i> ENA49/50			
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i> ENA49/50 (Rpts/+)			

Контрольні питання:

1. Обґрунтуйте механізми регуляції роботи індукцибельних і репресибельних оперонів, негативного і позитивного контролю діяльності оперонів на прикладі лактозного і триптофанового оперонів *Escherichia coli*.
2. Опишіть явище катаболітної репресії, діаксії, роль білків у транскрипції індукцибельних оперонів.
3. Запропонуйте способи підвищення продукції амінокислот або ферментів на рівні операона.

Робота № 36. Визначення рівнів продукції β -каротину клітинами *Pantoea agglomerans*

Оскільки каротиноїди є ліпідами, вони розчиняються в органічних розчинниках і можуть бути екстраговані з природних об'єктів полярними розчинниками, такими як ацетон, хлороформ і спирти.

На підставі цього виділення β -каротину з досліджуваних клітин здійснюється наступним чином.

Хід роботи:

1. Штами *Pantoea agglomerans* засівають петлею в рідке повноцінне середовище (10 мл) і вирощують в умовах аерації протягом 24 год.

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

- при 28°C (у середовище для плазмідовмісного штаму додають $Ar_{50}Cm_{125}$);
2. 5 мл культури бактерій центрифугують 5 хв. при 7000 об/хв. і відмивають фізіологічним розчином (5 мл);
 3. Осад клітин ресуспендують в 2,5 мл діетилового спирту і залишають при мінус 20°C на 20 хв.;
 4. Центрифугують протягом 10 хв. при 12000 об/хв., супернатант переносять в чисту пробірку.
 5. Далі вимірюють оптичну щільність (ОЩ) супернатанта при 460 нм (пік поглинання β -каротину). Оскільки досліджувані бактеріальні культури можуть відрізнятися за швидкістю росту і, відповідно, за кількістю клітин, що продукують каротиноїди, вимірюють ОЩ вихідних бактеріальних культур при 600 нм.
 6. Розрахунок кількості (С) β -каротину (в умовних одиницях) проводять за формулою:

$$C = \frac{ОП_{460}}{ОП_{600}}$$

Порівнюють кількість β -каротину, продукованого бактеріями *Pantoea agglomerans*.

Контрольні питання:

1. Охарактеризуйте принципи підбору біотехнологічних об'єктів.
2. Охарактеризуйте способи поліпшення продуцентів.
3. Наведіть приклади мікробіологічного виробництва лікарських засобів.

Робота № 37. Імобілізація клітин *Pseudomonas fluorescence* у гелі альгінату кальцію. Визначення ефективності роботи каталази, оксидази і нітратредуктази у іммобілізованих клітин

Ефективність ферментативних процесів, які використовуються в самих різних областях людської діяльності, вдалося збільшити за допомогою іммобілізації ферментів. Іммобілізовані ферменти знаходять кілька переваг над своїми розчинними аналогами:

- 1) вони можуть бути відокремлені від продукту і використані повторно, що знижує вартість процесу;
- 2) іммобілізовані ферменти часто виявляють підвищену стабільність і тривало зберігають активність;
- 3) вони придатні для безперервних процесів, які, в свою чергу, полегшують контроль за якістю і знижують вартість праці;
- 4) час реакції може бути зменшено за рахунок створення більш високого співвідношення ферментів і субстратів;
- 5) можна створювати мультиферментні системи.

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

Однак застосування ферментів обмежено через їх низьку стабільність, здатність каталізувати тільки одну реакцію, високу вартість чистих препаратів. Крім того, для практичних цілей можуть використовуватися тільки ті ферменти, для яких не потрібна регенерація кофакторів. Тому в даний час поряд з іммобілізацією ферментів увагу дослідників все більше привертає іммобілізація клітин і органел. Клітини на відміну від ферментів представляють собою готовий біотехнологічний реактор, в якому реалізуються не тільки процеси, що призводять до утворення кінцевого продукту, але і багато інших, які сприяють підтримці каталітичної ефективності системи на високому рівні (наприклад, регенерація кофакторів). Оскільки ферменти функціонують у нативному оточенні, їх денатурація в процесі роботи зводиться до мінімуму. Це розширює число застосовуваних ферментів і дозволяє здійснювати як процеси синтезу, так і процеси деградації. Іммобілізовані клітини ідеально підходять для використання в реакторах з перемішуванням, через які пропускають субстрат. Перевагою таких реакторів є можливість їх багаторазового використання та отримання продукту, вільного від ферментів.

Звичайно, використання іммобілізованих клітин не позбавлено недоліків. Наприклад, клітинна стінка або плазматична мембрана можуть перешкоджати проникненню субстрату до ферменту або дифузії продукту з клітини. Крім того, виникає необхідність підтримки цілісності клітин і утримання їх у тій фазі росту, в якій синтезуються бажані ферменти. Нарешті, за великого числа присутніх у клітині ферментів (що в ряді випадків розглядається як перевага) можливий перебіг небажаних побічних реакцій.

Для іммобілізації клітин використовується безліч способів (сорбція інертними і іонообмінними носіями, ковалентне зв'язування з полімерним носієм, включення в гель) і носіїв різних типів (природні і синтетичні полімери й неорганічні речовини). Включення живих клітин вимагає м'яких умов іммобілізації, носій при цьому повинен являти собою систему відкритих пор з добрими умовами для газообміну. Слід брати до уваги і можливий шкідливий вплив на життєздатність клітин зшиваючих агентів. Найбільшого поширення набуло включення клітин в поліакріламідний гель і гель альгілату кальцію.

Альгінат - основний структурний полісахарид бурих морських водоростей. У присутності моновалентних катіонів полісахарид утворює в'язкий розчин, тоді як у присутності двовалентних катіонів, особливо кальцію, спостерігається утворення гелю. Оскільки гель утворюється в м'яких умовах, в ньому можна іммобілізувати живі клітини.

Мета роботи: Здійснити іммобілізацію клітин *Pseudomonas fluorescens* в гель альгілату кальцію. Визначити ефективність роботи каталази, оксидази і нітратредуктази у іммобілізованих клітин.

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

Хід роботи:

Включення клітин *Pseudomonas fluorescens* в гель альгінату кальцію проводять за такою методикою:

1. 3 мл нічної культури бактерій *Pseudomonas fluorescens* центрифугують 5 хв. при 7000 об/хв. і ресуспендують в фізіологічному розчині (1,5 мл);

2. Обережно змішують 1,5 мл клітинної суспензії з 1,5 мл 4% розчину альгінату натрію;

3. За допомогою скляної піпетки (обсягом 1-2 мл) отриману суміш скакують з висоти близько 20 см в чашку Петрі з 0,2 М розчином CaCl_2 ;

4. Залишають частинки альгінату кальцію з включеними в них клітинами в розчині CaCl_2 на 5 хв. для затвердіння.

5. Для визначення каталази кілька сферичних частинок з іммобілізованими клітинами за допомогою пінцета поміщають в пробірку з перекисом водню (3% розчин). Ефективність роботи каталази оцінюють по інтенсивності утворення бульбашок водню.

6. Визначення оксидази здійснюють з 1% розчином N'N'-диметилпарафенилендіаміндигідрохлорида (DMPA). Кілька частинок з клітинами поміщають в пробірку з DMPA і витримують при перемішуванні (37°C) 15 хв. Про наявність оксидази буде свідчити забарвлення розчину в рожевий колір.

7. Для визначення наявності нітратредуктази кілька часток з клітинами поміщають в пробірку з 1 мл азотнокислого натрію або калію (1% розчин). Пробірку інкубують при перемішуванні протягом 15 хв. при 37°C. Потім у пробірку вносять 1 мл реактиву Грісса (1% розчин).

8. Враховують реакцію на нітрити: протягом 3-5 хв. з'являється червоне забарвлення.

Контрольні питання:

1. Охарактеризуйте способи іммобілізації клітин і ферментів.
2. Наведіть приклади успішного застосування іммобілізованих клітин і ферментів в практиці.
3. Опишіть переваги та недоліки іммобілізації клітин і ферментів в порівнянні з використанням бактеріальних культур і очищених ферментів.

Робота № 38. Вплив складу живильного середовища на накопичення амілази при твердо фазному культивуванні мікроміцетів

Деякі мікроорганізми здатні використовувати як поживні субстрати самі різні високомолекулярні сполуки: полісахариди, білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди та ін. Однак макромолекули не можуть проникати через мембрану клітини. Вони піддаються розщепленню, яке здійснюється під впливом екзоферментів, що відносяться до класу гідролаз. Більшість з них каталізує гідроліз полімеру до розчинних продуктів, зазвичай димерів або

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

мономерів, які надходять у клітину за допомогою специфічних транспортних механізмів. Утворення екзоферментів широко поширене серед різних груп мікроорганізмів. При пошуку продуцентів ферментів гідролаз в лабораторній практиці застосовують спеціальні методи. Сутність їх полягає в наступному. Мікроорганізми вирощують на агаризованому середовищі, що містить макромолекулярний субстрат. Якщо клітини виділяють в середовище екзоферменти, що гідролізують дані сполуки, то вирості колонії будуть оточені зоною, в якій виявляються продукти гідролізу.

Крохмаль піддається гідролітичному розщепленню під дією амілаз, активними продуцентами яких є різні види бацил, псевдомонад, стрептоміцетів і міцеліальних грибів.

Мета роботи: вивчення впливу складу і вологості живильного середовища на накопичення амілолітичних ферментів при твердофазному культивуванні мікроскопічного гриба *Aspergillus oryzae*.

До твердофазної ферментації (культивування) прийнято відносити вирощування мікроорганізмів на твердому, напівтвердому субстраті або твердому носії, інертному до живильних речовин, застосування якого полегшує мікроорганізмам доступ до останніх. Такий тип культивування також називають поверхневим. У роботі пропонується дослідити вплив складу і вологості живильного середовища на рівень накопичення амілолітичного ферменту в процесі вирощування культури мікроскопічного гриба *Aspergillus oryzae* на твердому сипучому середовищі, що складається з пшеничних висівок і деревної тирси. Амілаза каталізує реакцію гідролізу крохмалю і відноситься до ферментів групи гідролаз. Під дією α -амілази з крохмалю утворюється дисахарид мальтоза, і цей процес називають оцукрювання крохмалю. Оцукрювання лежить в основі приготування сусла з зерна та картоплі в спиртовому виробництві, приготування затору в пивоварінні.

Хід роботи

1. Визначити вологість сировинних компонентів - пшеничних висівок і тирси. Просушити паперові конверти (16 × 16 см) при 160°C протягом 3 хв. і охолодити в ексикаторі. Зважити порожній пакет, заповнити 5 г висівок або тирси і зважити. Розподілити матеріал тонкими шаром і сушити при 160°C 6 хв., охолодити в ексикаторі і зважити. Запис в лабораторному журналі:

Маса порожнього конверта, г

Маса конверта з вологим субстратом, г

Маса конверта з висушеним субстратом, г

Маса випареної вологи _____, г

(Найменування середовища)

Вологість _____, W,%

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

(Найменування середовища)

Вологість розраховують за формулою:

$$W = (a - c) \times 100\% / a - n,$$

де a – маса конверту з вологою наважкою, г;

c – маса конверту з висушеною наважкою, г;

n – маса пуского конверту, г.

Результати підрахунків записують до другого десяткового знаку. Виконайте паралельно два визначення вологості пшеничних висівок та тирси, розрахуйте середню величину, результати внесіть до табл.23.

2. Приготуйте 6 варіантів поживного середовища по 20 г, що відрізняються співвідношенням пшеничних висівок та тирси, які приймають участь у розрихленні середовища і регулюванні вмісту крохмалю.

Таблиця 23

Результати визначення вологості

Номер дослід у	Найменування середовища	Маса наважки, г		Кількість випареної вологи, г	Вологість, $W\%$	Середня вологість, $W\%$
		волога	висушена			
1	Пшеничні висівки					
2	Пшеничні висівки					
3	Тирса					
4	Тирса					

– Розрахуйте масу компонентів для кожного варіанту, зважте на технічних вагах. Приготуйте середовище, змішавши компоненти.

Варіант середовища	1	2	3	4	5	6
Пшеничні висівки	100	90	80	70	60	50
Деревна тирса	0	10	20	30	40	50

– Розрахуйте кількість води, необхідне для зволоження середовища до 60% вологи. Зменшіть розхід води на 1 мл, враховуючи посівний матеріал, що вводиться у вигляді суспензії та конідій. Занесіть дані до таблиці 24.

– Відміряйте необхідну кількість води мірним циліндром, повільно приливаючи її до маси, перемішайте для рівномірного зволоження частинок.

– Зволожену масу перенесіть в конічну колбу, використовуючи металеву воронку для запобігання забруднення поверхні горличка.

**РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ
ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ**

Таблиця 24

Результати визначення розходу води для зволоження середовища

Проміжні дані розрахунків	Варіант середовища					
	1	2	3	4	5	6

Колби закрийте ватною пробкою, паперовим ковпачком та стерилізуйте 30 хв. при 120°C в автоклаві. Вміст колби після стерилізації та охолодження інтенсивно струшують.

3. Для вивчення впливу вологості живильного середовища на накопичення ферментів приготувати 6 варіантів середовища по 20 г з різним вмістом води, згідно табл.25.

Таблиця 25

Рекомендуєма вологість живильного середовища

Варіант середовища	1	2	3	4	5	6
Задана вологість, %						
Вологість середовища до зволоження, %						
Розрахунок води на 20 г середовища, мл						

Зважити навіски пшеничних висівок і деревної тирси за варіантом 4. Розрахувати вологість середовища і витрати води до досягнення вологості, зменшуючи його на 1 мл суспензії посівного матеріалу згідно завданням. Алгоритм розрахунку виконати в журналі роботи, результати внести в табл. Подальші операції виконати як в п. 2.

4. Засіяти живильне середовище суспензією спор гриба. Для цього в пробірку з культурою гриба на скошеному агаризованому середовищі заливають стерильну воду до верхнього краю косяка. Конідії переводять кінцем стерильної піпетки у зважений стан і відбирають 1 мл суспензії спор, переносячи її потім в колбу зі стерильним середовищем. Після засіву середовище ретельно перемішують шляхом струшування і пересипають в стерильні кювети, потім закривають її кришкою. Кювети мають перфорації для повітрообміну. Операції по засіву середовища необхідно проводити, дотримуючись асептичних умов, біля полум'я спиртівки. Кювети з засіяним середовищем поміщають в термостат. Вирощування триває 48 - 54 год. при температурі 33°C протягом перших 12 год. росту, а далі підтримується на рівні 28 - 30°C.

Робота № 39. Визначення амілолітичної активності бактерій

Для виявлення амілолітичної активності часто використовують середовище наступного складу (г/л):

- пептон - 10,0;
- KH_2PO_4 - 5,0;
- розчинний крохмаль - 2,0;
- агар - 15,0;
- рН середовища 6,8 - 7,0.

1. Середовище стерилізують при 1,0 атм і розливають в стерильні чашки Петрі.
2. Коли середовище застигне, досліджувані мікроорганізми висівають штрихом по діаметру чашки або уколом. Тривалість культивування 2-10 діб.
3. Гідроліз крохмалю виявляють після обробки агарової пластинки розчином Люголя. Для цього на поверхню середовища наливають 3 - 5 мл розчину Люголя. Середовище, що містить крохмаль, забарвлюється в синій колір, а зона гідролізу залишається безбарвною або набуває червоно-бурого забарвлення, якщо крохмаль гідролізований до декстринів.
4. Зону гідролізу крохмалю вимірюють в міліметрах від краю штриха (колонії) до кордону світлої зони. Чим більше діаметр світлої зони, тим вища амілолітична активність (рис.43).

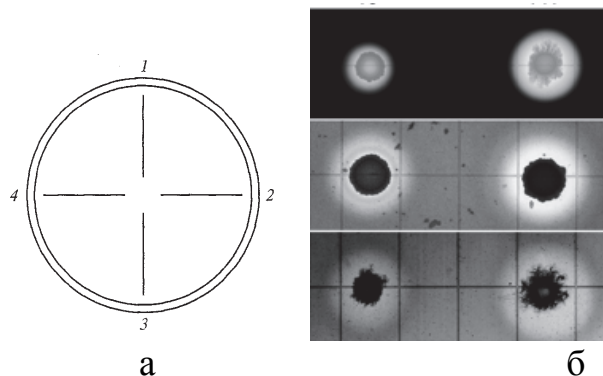


Рис.43. Визначення амілолітичної активності:

а) схема посіву (1-4 – штрихи різних культур); б) середовище з культурами після обробки розчином Люголя

Робота № 40. Визначення амілолітичної активності *Aspergillus oryzae*

Хід роботи:

1. Провести екстракцію ферментів з вирощеної культури гриба. Міцелій з середовища ретельно подрібнюють в кюветі за допомогою шпателя і на технічних вагах відважують 5 г поверхневої культури. Шпатель обов'язково занурити в дезінфікуючий розчин. Зважену порцію

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

поміщають в фарфорову ступку і старанно розтирають товкачем з 100 мл розчину, який отримують, змішуючи 10 мл ацетатного буфера (РФ 4,7) і 90 мл дистильованої води. Після чого розміщають в термостат на 30 хв. при 30°C. По закінченні часу екстракції вміст порцелянових ступок переносять на капроновий фільтр і добре віджимають для відділення екстракту від біошрота (залишків живильного середовища і міцелію).

2. Визначити вологість вирощених культур, зробити запис у журналі роботи аналогічно п. 1. заняття 1 даної роботи.

3. Освітлити отриманий екстракт (витяжку) шляхом центрифугування. Для цього мірним циліндром відміряють 25 мл фільтрату і переносять в центрифужні стаканчики, які встановлюють на роторі центрифуги попарно навпроти один одного. Центрифугування триває 5 хв. при 3 тис. обертах. Освітлений екстракт зливають в колбу для подальшого аналізу.

4. Визначають амілолітичну здатність (АЗ) екстракту, використовуючи крапельний метод по Климовській і Родзевич. В основі методу лежить здатність ферменту амілази, що знаходиться в витяжці, каталізувати гідроліз крохмалю до незабарвлених йодом продуктів. Для визначення АЗ важливо суворо дотримуватися температурних умов реакції. Для цього всі розчини - субстрат, 1%-ний розчин крохмалю, розчин ферменту і дистильована вода повинні бути нагріті до 30°C в ультратермостаті протягом 10 хв. У широку пробірку заливають 25 мл розчину крохмалю. Не виймаючи пробірок з термостата, за допомогою піпеток додають воду, а потім витяжку від 1 до 25 см³. Загальний обсяг реакційної суміші був 50 см³. Якщо ферментна витяжка малоактивна, то можна внести тільки її в кількості 25 см³, а воду взагалі не додавати. Вміст в пробірці перемішують паличкою і відзначають час за секундоміром, коли була додана витяжка до розчину крохмалю:

- кожні 60 с з пробірки, не виймаючи її з термостата, відбирають паличкою краплю проби;
- краплю поміщають на білу порцелянову пластину, з'єднуючи її з краплею робочого розчину йоду й спостерігають наявність чи відсутність забарвлення;
- реакція розщеплення крохмалю вважається закінченою, коли перестає відбуватись забарвлення при з'єднанні з краплею випробуваного розчину протягом перших 10 с;
- зміна забарвлення йоду чітко видно на межі зіткнення двох крапель - йоду і реакційної суміші.

Час, за який відбувається розщеплення крохмалю до продуктів, незабарвлених йодом, повинен бути в межах 10 - 20 хв. Якщо час гідролізу крохмалю менше 10 хв., то визначення повторюють, зменшуючи обсяг витяжки, та збільшуючи об'єм води. Якщо гідроліз крохмалю не закінчується протягом 20 хв., то аналіз також повторюють, збільшуючи обсяг ферментної витяжки і зменшуючи обсяг води. Кількість ферментної

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

витажки, яку необхідно брати на повторний аналіз, обчислюють з урахуванням отриманого часу гідролізу. Наприклад, якщо ферментна витяжка має малу або надто високу активність і кількість ферментного розчину від 1 до 25 см³ не забезпечує тривалості гідролізу крохмалю протягом 10 - 20 хв., для аналізу беруть не 25 см³ розчину крохмалю, а більшу або меншу його кількість, наприклад 10 або 40 см³, вносячи відповідну поправку в розрахункову формулу (відповідно, 0,1 або 0,4 замість звичайних 0,25 г).

Запис в лабораторному журналі:

Час, за який відбулось розщеплення крохмалю до незабарвлених йодом продуктів, хв.

Кількість ферментного розчину, взята на аналіз, мл

Вологість гриба, W, %

Амілолітична активність, од/г

За одиницю амілолітичної активності (здатності) прийнято таку кількість ферменту, яке каталізує розщеплення 1 г розчинного крохмалю до продуктів, незабарвлених йодом, за 1 год. при температурі 30°C в ретельно підтримуваних умовах. Розраховують амілолітичну активність за формулою:

$$A_3 = \frac{0,25 \cdot 60 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{T \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

де 0,25 – кількість крохмалю, яка знаходиться в 25 мл розчину; 60 – перерахунок хвилин в години; T – час гідролізу, хв., a- кількість ферментного розчину, що взято на аналіз, мл; 100 – кількість екстрагуючої води, мл; 5 – маса культури, що взята на екстракцію, г; 50 – об'єм реакційної суміші; W – вологість культури грибу, %.

3. Побудувати графіки залежностей $A_3=f$ (вміст крохмалю), $A_3=f$ (W, %).

4. Заповнити таблицю 26 і зробити висновки.

Таблиця 26

Результати досліджень

Варіант середовища	Склад середовища, %		Вода для зволоження	Вологість культури, %	A ₃ , од/г
	Пшеничні висівки	Деревна тирса			

8.2. Утворення лимонної кислоти *Aspergillus niger*

До початку двадцятих років минулого століття лимонну кислоту отримували з соку лимонів, таким чином задовольнялося близько трьох чвертей світової потреби в ній (вихід лимонної кислоти з однієї тонни лимонів становить 25 кг). Виробництво лимонної кислоти методом

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

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.

Лимонна кислота (ЛК) широко застосовується в харчовій, медичній, фармацевтичній, косметичній та інших галузях промисловості. Одним з головних завдань у виробництві лимонної кислоти є досягнення її високого виходу.

Властивістю продукувати ЛК володіють багато плісневих грибів *Aspergillus niger*, *A. wentii*, *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, приготованих з харчового цукру, бурякової меляси, очеретяної меляси або гідролізатів крохмалю.



Рис.44. Будова *Aspergillus niger*

Будова продуцента. Aspergillus niger відноситься до класу сумчастих грибів, родини аспергілових (рис.44).

Тіло гриба складається з безбарвних, сильно розгалужених і переплетених між собою тонких ниток (гіф), що утворюють міцелій (грибницю).

Гіфи септовані - розділені поперечними перегородками; діаметр гіф - 3-6 мкм. Для аспергілів характерний поверхневий ріст міцелію, проте при достатній аерації і суворому дотриманні вимог асептики вони можуть також розмножуватися в товщі твердої і в глибині рідких середовищ.

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

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

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 часу, здатності продукувати лимонну кислоту на різних субстратах.

Продуцент лимонної кислоти має 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.

Промислове виробництво лимонної кислоти здійснюється трьома різними способами: поверхневим культивуванням грибів, глибинним культивуванням, твердофазною ферментацією, що має назву "процес Коджі".

Робота № 41. Особливості утворення лимонної кислоти *Aspergillus niger* в різних умовах вирощування

Мета роботи: вивчити особливості утворення лимонної кислоти грибом *Aspergillus niger* в різних умовах вирощування.

Обладнання та матеріали: 20%-й розчин сахарози; 10%-ві розчини NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 та FeSO_4 ; колби ємністю 100 мл; циліндри ємністю 100 мл; піпетки на 10 і 1 мл; препарувальні голки; вата.

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

Хід роботи.

1. Готують 200 мл повного живильного середовища без мікроелементів,%: сахароза - 10,0; NH_4NO_3 - 0,3; KH_2PO_4 - 0,2; MgSO_4 - 0,05; FeSO_4 - 0,01. Визначають вихідну кислотність розчину за допомогою рН-метра. Живильне середовище ретельно перемішують і розливають по 50 мл у чотири конічні колбочки, кожна ємність 150 мл. Закривають ватними пробками. У всі колбочки вносять рівну кількість спор гриба. Колби підписують і ставлять в термостат при 28-30°C.

2. На шостий день, коли плівка гриба досягне великої щільності, проводять наступний дослід. З колби № 1 виймають міцелій гриба, ретельно промивають з нижньої сторони водою. Плівку гриба висушують при 105°C в сушильній шафі до постійної ваги. За допомогою рН-метра визначають кислотність фільтрату. З колби № 4 акуратно зливають фільтрат і під міцелій підводять 50 мл свіжого середовища, після чого колбу поміщають в термостат.

3. На сьомий день визначають кислотність фільтрату і суху вагу міцелію з колби № 2 описаним вище способом.

4. На восьмий день визначають кислотність фільтрату і сухої ваги міцелію з колб № 3 і 4 описаним вище способом. В результаті цієї роботи можуть бути отримані наступні дані.

На початку росту мікроміцети інтенсивно накопичують кислоту до тих пір, поки в середовищі досить цукру (колби № 1 і 2), з якого він може синтезувати кислоту. Однак як тільки середовище виснажується, міцелій гриба продовжує збільшуватися у вазі, починається переробка кислоти, та харчування за її рахунок (колба № 3). Культура ж, що отримала додатково цукор (колба № 4), дає значний стрибок у бік більшого накопичення кислоти і збільшення сухої ваги міцелію.

Завдання. Результати дослідів записати в таблицю і замалювати. Зробити висновки про утворення лимонної кислоти грибом *Aspergillus niger* в різних умовах.

Контрольні питання:

1. На якій фазі розвитку мікроміцетів починається активне накопичення лимонної кислоти?

2. При яких умовах культивування гриб *Aspergillus niger* продукує лимонну кислоту?

3. Які характеристики повинні мати продуценти лимонної кислоти?

4. Опишіть основні етапи утворення лимонної кислоти та основні способи промислового отримання.

8.3. 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. У Росії мікробіологічний синтез вітаміну В₁₂ за допомогою бактерій *Propionibacterium shermani* (патент 1737915) дозволяє досягати концентрацію вітаміну В₁₂ в культуральній рідині на рівні 40-50 мг/л.

Продуценти. 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* (табл.27).

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. sheroides*; є інформація про одержання рекомбінантного штаму *Pseudomonas denitrificans*, здатного синтезувати 100-300 мг/л вітаміну В₁₂.

Таблиця 27

Мікроорганізми-продуценти вітаміну В₁₂

Мікроорганізми	Ростовий субстрат	Основні умови культивування	Рівень синтезу В ₁₂ , мг/л
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Глюкоза	Анаеробіоз; 5,6 -ДМБ	206,0
<i>Rhodopseudomonas protamicus</i>	Те саме	5,6-ДМБ	135,0
<i>Propionibacterium shermanii</i>	» »	Те саме	60,0
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	» »	Аеробіоз, бетаїн	60,0
<i>Nocardia rugosa</i>	» »	Аеробіоз	18,0
<i>Rhizobium cobalaminogenum</i>	Сахароза	Те саме	16,5
<i>Micromonospora sp.</i>	Глюкоза	5,6-ДМБ	11,5
<i>Streptomyces olivaceus</i>	Те саме	Те саме	6,0
<i>Nocardia gardneri</i>	Гексадекан	Аеробіоз	4,5
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	Метанол	Анаеробіоз	3,6
<i>Pseudomonas sp.</i>	Те саме	5,6-ДМБ	3,2
<i>Arthrobacter hyalinus</i>	Ізопропанол	Те саме	1,1

Примітка. 5,6-ДМБ — 5,6-диметилбензimidазол.

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

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 Roger 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.

Робота № 42. Виробництво ціанкобаламіну (вітаміну В₁₂) за допомогою пропіоновокислих бактерій

Середовища культивування. 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

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

амоній. У середовище рекомендують вносити також пантотенову кислоту, яка стимулює синтез вітаміну В₁₂.

На початку 90-х років ХХ ст. науковцями Курганського комбінату медичних препаратів і виробів «Синтез» (Росія) отримано мутантний штам *Propionibacterium shermanii* 1-63, депонований у Російській колекції промислових мікроорганізмів за номером В-4891 (патент РФ № 1737915, 1994 р). Цей штам отримано ступінчатою селекцією зі штаму М-82 з використанням хімічних мутагенів. Відмінною рисою цього штаму є здатність синтезувати до 40 мг/л вітаміну В₁₂ за умов росту впродовж 120 год. на середовищах зі зниженим вмістом кукурудзяного екстракту.

Матеріали та обладнання: склад середовища для вирощування *Propionibacterium shermanii*, г/л: глюкоза — 30, лактоза — 10, кукурудзяний екстракт — 70, сірчанокислий амоній — 2, хлористий кобальт — 0,01. Штам культивують у стаціонарних умовах без доступу повітря упродовж 113-120 год., підтримуючи рН на рівні 6,8-7,2 розчином їдкою натру чи аміаку. Через 72 год. у середовище вносять 5,6-ДМБ у кількості 20-34 мг/л.

Хід роботи:

Одержання кристалічного вітаміну В₁₂. 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 В₁₂ переходить у розчин;
- водний розчин охолоджують, доводять рН до 6,8-7,0 50% розчином їдкою натру. Для коагуляції білків додають $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ і безводний $FeCl_3$, 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 Al_2O_3 , після чого кобаламіни елюють водним ацетоном;
- до водно-ацетонового розчину вітаміну додають ацетон і витримують 24-48 год. при температурі 3-4 °С. Кристали вітаміну відфільтровують, промивають безводним ацетоном висушують у вакуумі.

В одному з варіантів одержання кристалічного вітаміну В₁₂ після елюції 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

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

десорбують із вугілля вітамін ізопропіловим спиртом. Ізопропіловий спирт упарюють і вітамін В₁₂ піддають додатковому резорциновому очищенню кристалізації. Така схема виділення вітаміну була реалізована у Радянському Союзі.

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 % 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 мг% KCN, перемішують і витримують у темноті упродовж 20 хв. KCN добавляють 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 В₁₂, всі операції технологічного процесу слід проводити у затемнених умовах (або при червоному світлі).

Робота № 43. Виробництво ціанкобаламіну (вітаміну В₁₂) продуцентами *Pseudomonas denitrificans* та *Pseudomonas fluorescens*

Періодичне культивування бактерій здійснюють в аеробних умовах (з аерацією — 0,2 м³/год. і перемішуванням — до 420 об/хв.) упродовж 90 год. при температурі 28-29°C.

Для одержання посівного матеріалу використовують середовище такого складу, г/л: бурякова меляса — 60, пивні дріжджі — 1,0, N—Z-амін — 1,0, (NH₄)₂PO₄ — 2,0, MgSO₄ — 1,0, MnSO₄ — 0,2, ZnSO₄ — 0,020, MoSO₄ — 0,005; рН 7,4. Тривалість вирощування інокуляту 72 год.

Склад середовища для виробничого біосинтезу, г/л: бурякова меляса — 100, дріжджовий екстракт — 2,0, (NH₄)₂PO₄ — 5,0, MgSO₄ — 3,0, MnSO₄ — 0,2, CoNO₃ — 0,188, 5,6-ДМБ — 0,025, ZnSO₄ — 0,020, Na₂MoO₃ — 0,005; рН 7,4. Меляса багата на бетаїн і глутамінову кислоту, які позитивно впливають на біосинтез вітаміну. Встановлено, що бетаїн стимулює синтез 5-амінолевулінової кислоти — інтермедіату синтезу кобаламінів, а також змінює проникність мембрани.

Виділення вітаміну. Очищений вітамін одержують в результаті проведення таких стадій:

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

1. Культуральну рідину (3,3 л) нагрівають до 120 °С і витримують при такій температурі 30 хв. Потім охолоджують до 25°С, доводять рН до 8,5, додають KCN, витримують (перемішуючи) 16 год., після чого вносять ZnCl₂, доводять рН до 8,0, перемішують і фільтрують. У результаті проведених операцій одержують фільтрат, що містить вітамін В₁₂.

2. З фільтрату вітамін тричі екстрагують сумішшю крезолу і трихлористого вуглецю у співвідношенні 1:2, додаючи кожного разу суміш екстрагентів у кількості 350 мл. У результаті здійснення таких операцій одержують органічний екстракт вітаміну (органічний екстракт I);

3. До органічного екстракту I додають бутанол (500 мл), після чого тричі екстрагують вітамін водою (100 мл) і одержують водний екстракт вітаміну.

4. Суміші крезолу і трихлористого вуглецю у співвідношенні 1:2, у результаті чого одержують органічний екстракт II;

5. До органічного екстракту II додають 200 мл ацетону і 120 мл ефіру. Так одержують неочищений вітамін В₁₂.

6. Для одержання очищеного вітаміну неочищений препарат розчиняють у 10 мл метанолу, сорбують на активованому алюмінії (4 г), елюють 2 % розчином оцтової кислоти у метанолі і осаджують ефіром. Так одержують очищений вітамін В₁₂ (ступінь очищення 98 %). Вихід ціанкобаламіну становить 75 %.

Одержання вітаміну В₁₂ за допомогою *Pseudomonas fluorescens.m*

Штам бактерій *Pseudomonas fluorescens* ВКМ У-2224Д - продуцент вітаміну В₁₂, який застосовується як антианемічний препарат у медицині та у виробництві кормових добавок для сільськогосподарських тварин та птиці. Росте при 28-32°С і рН 7-7,2 і постійному перемішуванні. Ріст культури відбувається паралельно з біосинтезом вітаміну В₁₂ в аеробних умовах. Продуктивність культури за 150 годин росту ферментації становить 130-150 мкг/мл.

При вирощуванні продуцента на середовищі з м'ясою, 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.

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

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

Концентрація вітаміну В₁₂ визначається методом дифузії в агар з використанням культури *E.coli* 113-3 і спектрофотометричним - принцип якого полягає в трансформації коферменту В₁₂ в кобаламін нітрит. Концентрація кобаламіну визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 361 нм. Для підтримки штаму використовують агаризовані середовища з мелясою наступного складу, г/л: меляса - 100,0, амоній фосфорнокислий двозаміщений - 1,5, сірчаноокислий 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 при 42°C варіює. Денітрифікація варіює. Зберігання культури - зберігають штам у вигляді ліофільно-висушеної культури при температурі 4°C протягом 2-3 років або на щільних середовищах при постійних пересівах.

Умови біосинтезу вітаміну В₁₂ штамом *Pseudomonas fluorescens*. Біосинтез вітаміну В₁₂ культурою *Pseudomonas fluorescens* здійснюється за наступною схемою:

- посівна культура на агаризованому середовищі
- посівна культура на колбах на рідкому середовищі
- культура на рідкому середовищі в посівному апараті
- біосинтез на рідкому середовищі у ферментері.

Хід роботи:

1. Для отримання посівного матеріалу для засівання посівних апаратів використовують середовище наступного складу: меляса - 6-12%, двоосновний фосфат амонію - 0,01-0,1%, кобальт хлористий - 0,001-0,003%, магній сірчаноокислий - 0,1-0,3%, марганець сірчаноокислий - 0,01-0,05%, цинк сірчаноокислий - 0,002-0,02%, 5-6-діметилбензілімідазол - 0,001-0,003%, вода - до 1000 л, рН середовища - 7,0 0,2 од.

2. У колбу об'ємом 750 мл з об'ємом середовища 50 мл вносять культуру з пробірки в кількості 0,1%. Вирощують культуру при температурі 30°C протягом 48 годин на качалці. Отриманою культурою в дозі не менше 0,1% засівають стерильне живильне середовище в посівному апараті наступного складу: меляса - 6-12%, двоосновний фосфат амонію - 0,01-0,1%, кобальт хлористий - 0,001-0,003%, магній сірчаноокислий - 0,1-0,3%, марганець сірчаноокислий - 0,01-0,05%, цинк сірчаноокислий - 0,002-0,02%, 5-6-диметилбензілімідазол - 0,001-0,003%, вода - до 100%, рН середовища - 7,0 0,2 од.

3. Умови ферментації: постійне перемішування, температура 28-32°C, при подачі повітря 02-05 л/л середовища за хв. протягом 40-60 годин до оптичної щільності більше 0,2.

4. Отриманим посівним матеріалом засівають стерильне ферментаційне середовище наступного складу: меляса - 14-20%, сахароза - 2,0-5,0%, гліцерофосфорна кислота - 0,2-0,4%, кобальт хлористий - 0,01-

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

0,03%, холінхлорид - 1,0-2,0%, магній сірчаноокислий - 0,1-0,3%, окис магнію - 0,05-0,07%, сірчаноокислий амоній - 0,2-0,4%, цинк сірчаноокислий - 0,05-0,1%, хлористий кобальт - 0,01-0,02%, 5-6-диметилбензилімідазол - 0,01-0,02%, гліцерин - 0,1-0,2%, вода водопровідна - до 100%, рН середовища - 7,0 0,2 од.

5. Ферментацію проводять при температурі культуральної рідини 28-32°C, при постійному перемішуванні, надмірному тиску 0,5 атм, при витраті повітря 0,2 л/л середовища в хв. Культура *Pseudomonas fluorescens* ВКМ У-2224Д характеризується тим, що її ріст відбувається паралельно з біосинтезом вітаміну В₁₂ в аеробних умовах протягом всього процесу ферментації.

6. Вміст вітаміну В₁₂ в культуральній рідині до кінця ферментації становить 120-150 мкг/мл при визначенні мікробіологічним методом з використанням в якості тест-культури *E.coli* 113-3 або спектрофотометричним методом. При культивуванні пропіоново-кислих бактерій вміст вітаміну В₁₂ в культуральній рідині дорівнює 40-50 мкг/мл.

7. По закінченні процесу ферментації культуральну рідину підкисляють сірчаною кислотою до значення рН 5,8 од., проводять лізис культури. Для отримання готового продукту культуральна рідина може бути перероблена на розпилювальній сушарці з наповнювачами (крейда, сіль, висівки та ін.) або відправлена на стадії отримання і виділення вітаміну В₁₂ в чистому вигляді. Результати перевірки рівня біосинтезу вітаміну В₁₂ культурою *Pseudomonas fluorescens* ВКМ У-2224Д в лабораторних умовах наведені в табл.28.

Таблиця 28

Дослід	Кількість повторностей	Вміст вітаміну В ₁₂ , мкг/мл								
		120 годин		180 годин						
1	4	112	92	132	130	141	153	169	141	
2	3	100	96	132		145	235	129		
3	5	115	120	120	113	250	202	161	206	184
		111								
Середнє		114,4				176,3				

Результати перевірки рівня біосинтезу вітаміну В₁₂ культурою *Pseudomonas fluorescens* ВКМ У-2224Д в дослідно-промислових умовах (в апаратах об'ємом 2,5 м³) наведені в табл. 29.

Таблиця 29

Номер операції	Час вирощування, год.	Вміст вітаміну В ₁₂ , мкг/мл
1	150	
2	146	
3	161	
4	156	
5	140	

**РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ТА
УПРАВЛІННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ ПРОЦЕСАМИ**

Про ріст мікроорганізмів у природних субстратах або в живильних середовищах судять по зміні кількості їх клітин або біомаси в одиниці об'єму. Методи визначення цих показників можуть бути **прямими** (підрахунок клітин під мікроскопом, зважування) або **непрямими**. Непрямі методи засновані на вимірюванні параметрів, величина яких залежить від кількості або біомаси мікроорганізмів (число колоній, що вирости після посіву суспензії клітин на живильне середовище, розсіювання або поглинання суспензією світла, вміст у ній білка і т.д.). Вибір методу залежить від цілей дослідження, властивостей поживного середовища або субстрату, а також особливостей росту і морфології мікроорганізмів. Так, багато методів, що використовують для визначення числа одноклітинних мікроорганізмів, неприйнятні при підрахунку багатоклітинних (нитчастих, міцеліальних та інших форм).

При оцінці чисельності мікроорганізмів, особливо в природні субстратах (насамперед у ґрунті), необхідно пам'ятати, що їх клітини часто знаходяться в прикріпленому (адгезованому) стані або у вигляді мікроколоній. Тому перед початком підрахунку їх потрібно відокремити від часток субстрату і один від одного (десорбувати). Вибір методу десорбції (механічне перемішування суспензії клітин, розтирання, обробка ультразвуком, застосування поверхнево-активних речовин і т.д.) визначається особливостями досліджуваного субстрату.

Робота № 44. Методи кількісного підрахунку мікроорганізмів

Підрахунок клітин у рахункових камерах рекомендується використовувати для підрахунку великих об'єктів - дріжджів, одноклітинних водоростей, конідій грибів і деяких великих бактерій. Зазвичай використовують камеру Горяєва, хоча можна застосовувати й інші рахункові камери. Підрахувати клітини мікроорганізмів під мікроскопом можна, використовуючи рахункові камери, капіляри Перфильєва, препарати фіксованих і пофарбованих клітин, приготовлені на предметних скельцях або мембранних фільтрах. Перераховані методи дозволяють визначити загальну кількість клітин в одиниці об'єму. Варто пам'ятати, що підраховуються всі клітки, як живі, так і мертві. Основне обмеження більшості зазначених методів - необхідність досить високих концентрацій клітин в одиниці досліджуваного субстрату.

Камера Горяєва являє собою прозорий паралелепіпед (предметне скло), з борознами і нанесеною мікроскопічної сіткою (рис.45).

Розміри малих розподілів клітин сітки становлять 0,05 мм, а великих - 0,2 мм. При цьому сітка нанесена на ділянку скла, розташовану на 0,1 мм

РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ТА УПРАВЛІННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ ПРОЦЕСАМИ

нижче, ніж дві сусідні ділянки. Ці ділянки служать для притирання покривного скла. У результаті обсяг рідини над квадратом, утвореним великими поділками сітки Горяєва, становить 0,004 мікролітра.



Рис.45. Камера Горяєва

Підраховавши кількість клітин над великим квадратом, можна підрахувати щільність даного типу клітин в суспензії за формулою:

$$\text{Кількість клітин/мл} = \text{кількість клітин над великим квадратом}(N) \times 2,5 \cdot 10^5 .$$

При роботі з камерою необхідно дотримуватися встановленого порядку її заповнення:

- спочатку поглиблення з сіткою покривають спеціальним шліфованим покривним склом і, злегка притискаючи, зміщують покривне скло в протилежні сторони до появи кілець Ньютона. Ці кільця вказують на те, що покривне скло притерто до сторін камери. Тільки за такої умови обсяг суспензії мікроорганізмів, що знаходиться в камері, відповідає розрахунковому.
- Після цього камеру заповнюють досліджуваною суспензією мікроорганізмів. Суспензію вносять через борозенку камери капіляром або піпеткою.
- Підрахунок клітин рекомендується починати через 3-5 хв. після заповнення камери, щоб клітини осіли і при мікроскопіюванні були видимі в одній площині (рис.46).

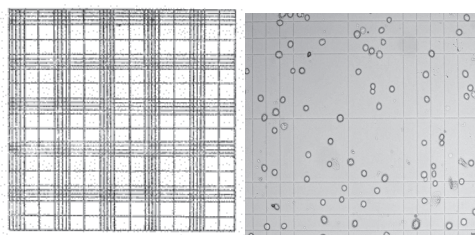


Рис.46. Підрахунок клітин

- Число клітин підраховують з об'єктивом $8\times$ або $40\times$. З імерсійним об'єктивом працювати не можна, тому що його фокусна відстань менше товщини скла камери. Зазвичай підраховують клітини мікроорганізмів в 10 великих або 20 маленьких квадратах сітки, переміщаючи останні по діагоналі. Підраховують всі клітини, що лежать в квадраті сітки, а також клітини, що перетинають верхню і праву сторони квадрата. При підрахунку кількість клітин у великому квадраті не повинно перевищувати 20, а в малому –10, в іншому випадку вихідну суспензію розводять водопровідною водою.

РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ТА УПРАВЛІННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ ПРОЦЕСАМИ

Для отримання достовірного результату загальне число підрахованих клітин мікроорганізмів повинно бути не менше 600. Підрахунок клітин повторяють 3-4 рази, кожен раз заново заповнюючи її камеру суспензією мікроорганізмів. Це забезпечує більшу точність, ніж підрахунок 600 клітин при одноразовому підрахунку. Кількість клітин в 1 мл досліджуваної суспензії розраховують за формулою:

$$M = \frac{A \cdot 10^3}{hS} n,$$

де M - число клітин в 1 мл суспензії;

A – середнє число клітин в 1 квадраті сітки;

h - висота камери;

S – площа 1 квадрата сітки, мм²;

10^3 – коефіцієнт переводу кубічних сантиметрів в кубічні міліметри;

N – розведення досліджуваної суспензії.

Мета роботи. Освоїти метод підрахунку мікробних клітин в камері Горяєва.

Матеріали та обладнання. Мікроскоп, рахункові камери Горяєва, бактеріологічні петлі, спиртівка, стерильна дистильована вода, чисті культури дріжджів, стерильні піпетки місткістю 1 - 2 мл.

Хід виконання роботи:

1. Приготуйте послідовні 10-кратні розведення вихідної суспензії дріжджів: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} (до 4,5 мл дистильованої води додайте 0,5 мл суспензії дріжджів).
2. При збільшенні 20 або 40 проведіть підрахунок клітин дріжджів в камері Горяєва під мікроскопом.
3. Результати роботи оформіть у вигляді табл.30.

Таблиця 30

Облік кількості клітин дріжджів в камері Горяєва

Розведення	Повторності	Кількість клітин дріжджів у великому квадраті камери Горяєва					Загальна кількість клітин в малих квадратах	Середнє число клітин	Кількість клітин у вихідному зразку
		1	2	3	4	5			
10^{-1}									
10^{-2}									
10^{-3}									

Робота № 45. Визначення біомаси мікроорганізмів ваговим методом

Мета роботи: Вивчення методики визначення біомаси мікроорганізмів ваговим методом.

Обладнання та матеріали: 1) чашки Петрі з культурою мікроорганізмів, 2) культуральна рідина з певною концентрацією мікроорганізмів, 3) фільтри, 4) центрифужні пробірки, 5) чашки Петрі, 6) центрифуга, 7) аналітичні ваги, 8) сушильна шафа, 9) ексикатор.

Цей метод широко застосовують для оцінки росту мікроорганізмів у рідких поживних середовищах. Його можна використовувати й для визначення маси клітин, вирощених на щільному поживному середовищі, однак у цьому випадку мікроорганізми необхідно попередньо ретельно змити з поверхні середовища фізіологічним розчином або водою й перевести в суспензію. Метод не може бути використаний при культивуванні мікроорганізмів на середовищах, до складу яких входять сполуки, не розчинні у воді.

Визначення біомаси складається із трьох послідовних операцій:

1. Доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення,
2. Відокремлення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини,
3. Визначення їх маси.

Найчастіше визначають масу сухих клітин, хоча іноді можна обмежитися визначенням сирої біомаси. В останньому випадку перший етап відпадає; досить тільки зважити центрифужну пробірку (фільтр), але не доводити її масу до постійного значення. Біомасу зазвичай виражають у грамах або міліграмах на літр культуральної рідини.

1. Доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення. Із цією метою фільтри, попередньо покладені у відкриту чашку Петрі, або центрифужні пробірки розміщують у сушильну шафу й висушують протягом 1-2 год. при температурі 80-85°C й 90-100°C відповідно. Потім чашку Петрі з фільтрами або центрифужні пробірки виймають із сушильної шафи й переносять в ексикатор з безводним хлористим кальцієм (CaCl₂) або концентрованою сірчаною кислотою. Ексикатор ставлять біля аналітичних вагів, на яких буде проводитися зважування. Через годину фільтри (центрифужні пробірки) зважують із точністю до 0,0001 г. Висушування й зважування повторюють, дотримуючи зазначеної послідовності операцій, доки маса не досягне постійного значення, тобто коливання в її значеннях не перевищать ±0,0001 г.

2. Відокремлення мікроорганізмів від середовища можливо центрифугуванням або фільтруванням. Центрифугуванням відокремлюють зазвичай бактерії. Для цього в центрифужну пробірку наливають точно

РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ТА УПРАВЛІННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ ПРОЦЕСАМИ

вимірний обсяг ретельно перемішаної рідкої культури, що залежно від її щільності коливається від 5 до 20 мл. Час центрифугування й число обертів залежать від розмірів клітин. Чим вони менше, тим більше потрібно обертів і тим тривалішим повинен бути час центрифугування. Найчастіше центрифугують 15-20 хв. при 5-10 тис. обертів у хв. Після центрифугування надосадову рідину обережно зливають, осад промивають злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої HCl на 1 л води) і знову центрифугують при тому ж числі обертів. Супернатант зливають негайно після зупинки центрифуги. У протилежному випадку частина осаду може бути загублена.

Мицелій актиноміцетів і грибів відокремлюють фільтруванням. Паперовий фільтр розміщують у скляну лійку й фільтрують через нього точно вимірний обсяг культури, від 5 до 10 мл. Осад на фільтрі багаторазово промивають підкисленою дистильованою водою. Для відділення бактерій використовують мембранні фільтри. Розміри пор мембранного фільтру повинні бути меншими за величину клітин, біомасу яких визначають. Мембранний фільтр розміщують на пористу пластинку спеціального тримача, вставленого в колбу. Щоб прискорити фільтрування, колбу підключають до водострумного насосу. Осад кілька разів промивають підкисленою дистильованою водою.

Визначення біомаси. Щоб визначити масу сухих клітин, центрифужну пробірку або фільтр із осадом клітин мікроорганізмів розміщують у сушильну шафу, висушують і зважують. Режим висушування й зважування той же, що використовується й при визначенні маси пробірок або фільтрів. Суху біомасу визначають за формулою:

$$M = \frac{(A-B)1000}{V},$$

де M - суха біомаса в г/л;

A - маса центрифужної пробірки (фільтра) з осадом у г;

B - маса центрифужної пробірки (фільтра) без осаду в г;

V - обсяг культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування) у мл.

Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища й ретельністю зважування.

Хід роботи:

1. Довести масу центрифужних пробірок та фільтрів до постійної.
2. З поверхні щільного живильного середовища чашок Петрі провести змив культури мікроорганізмів великою кількістю дистильованої води. Далі провести фільтрування через паперовий фільтр. Далі фільтр

РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ТА УПРАВЛІННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ ПРОЦЕСАМИ

розміщують до сушильної шафи і доводять його масу до постійної. Масу культури визначають за формулою.

3. Із колби в центрифужну пробірку наливають точно виміряний обсяг ретельно перемішаної рідкої культури в обсязі 5 мл. Проводять центрифугування при 3000 об/хв. на протязі 25 хв. Далі надосадову рідину зливають. Осад промивають підкисленою водою і пробірки знову ставлять на центригування. Потім масу пробірки доводять до постійної. Масу культури визначають за формулою.

Робота № 46. Метод кількісного обліку мікроорганізмів висівом на щільні поживні середовища

На відміну від підрахунку мікроорганізмів під мікроскопом цей метод дає можливість визначити тільки число життєздатних клітин в популяції. Оскільки середовищ, придатних для росту всіх мікроорганізмів, не існує, метод висіву дає можливість визначити лише число мікроорганізмів, здатних рости на середовищі певного складу. При цьому не враховуються мікроорганізми, які не ростуть на середовищах (так звані життєздатні, але не культивуємі форми) або ростуть дуже повільно.

В основі методу визначення кількості клітин висівом на щільні поживні середовища лежить принцип Коха, згідно з яким кожна колонія є потомством однієї клітини. Це дозволяє на підставі числа колоній, які вирости після посіву на щільне ЖС (живильне середовище) певного обсягу досліджуваної суспензії, судити про вихідний вміст в ній клітин мікроорганізмів. Результати кількісного обліку мікроорганізмів, проведеного методом Коха, часто виражають не в числі клітин, а в умовних одиницях - так званих колонієутворюючих одиницях (КУО).

Визначення числа мікроорганізмів цим методом включає три етапи: приготування розведень, посів на щільне середовище в чашки Петрі і підрахунок вирослих колоній.

Посів. Висівати суспензію можна поверхневим або глибинним способом. Перед посівом поверхневим способом розливають розплавлене, найчастіше агаризоване живильне середовище в ряд стерильних чашок Петрі по 15 - 20 мл в кожену. Чашки залишають на горизонтальній поверхні, поки середовище не застигне. Поверхню агаризованих середовищ перед посівом рекомендується підсушувати для видалення конденсаційної води. Після того як середовище застигне, на його поверхню стерильною піпеткою наносять точно виміряний об'єм (0,05 або 0,1 мл) відповідного розведення і рівномірно розподіляють по поверхні.

При глибинному посіві точно виміряний об'єм (як правило, 0,1 та 0,5 або 1,0 мл) вихідної суспензії або розведення вносять в розплавлене і охолоджене до 48 - 50°C агаризоване середовище, ретельно перемішують і потім негайно виливають в чашку Петрі. Середовищу дають застигнути.

РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ТА УПРАВЛІННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ ПРОЦЕСАМИ

Підрахунок вирослих колоній. Колонії мікроорганізмів в залежності від швидкості росту підраховують через 2 - 15 діб інкубації. Підрахунок, як правило, проводять, не відкриваючи чашок Петрі. Для зручності кожну прораховану колонію позначають точкою на зовнішній стороні дна чашки. При великій кількості колоній дно чашки Петрі ділять на сектори, прораховують колонії в кожному секторі і підсумовують результати.

Результати враховують на тих чашках Петрі, на яких виростає від 30 - 50 до 100 - 150 колоній. Якщо число вирослих колоній виявилось менше 10, то ці результати для розрахунку кількості клітин у вихідному матеріалі не використовують.

Кількість клітин в 1 мл досліджуваного субстрату обчислюють за формулою:

$$M = a \times 10^n / V$$

де M - кількість клітин в 1 мл;

a - середнє число колоній на чашці Петрі;

V - об'єм суспензії, взятий для посіву, мл;

10^n - коефіцієнт розведення.

Мета роботи. Освоїти метод кількісного обліку мікроорганізмів висівом на щільні поживні середовища (метод Коха).

Матеріали та обладнання. Бактеріологічні петлі, спиртівка, стерильна дистильована вода, чисті культури бактерій, стерильні піпетки на 1 - 2 мл, МПА в чашках Петрі, термостат з температурою 37 °С.

Хід виконання роботи

1. Приготуйте послідовні 10-кратні розведення вихідної суспензії бактерій: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (до 4,5 мл дистильованої води додайте 0,5 мл суспензії бактерій).
2. Отримані розведення суспензії мікроорганізмів ретельно перемішати (струсити) і висійте на поверхню агару до чашки Петрі (0,1 або 0,2 мл). Посів проводити, починаючи з найбільшого розведення (10^{-5}).
3. Рівномірно розподіліть на поверхні агару висіяні суспензії, повільно обертаючи чашки Петрі, і залиште їх при кімнатній температурі на 30 хв. для адсорбції мікробів на поверхні агару.
4. Засіяні чашки Петрі розмістіть до термостату з температурою 37°С та інкубуйте 24 - 48 год. (в залежності від виду мікроорганізмів). Після цього зробіть облік вирослих колоній. Враховувати необхідно ті чашки, на яких число колоній знаходиться в діапазоні від 10 до 150 і загальне число підрахованих колоній при посіві з даного розведення повинно бути не менше 300. При дотриманні цих умов облік результатів буде правильним.
5. Результати роботи оформіть у вигляді табл. 31.

Таблиця 31

Визначення концентрації бактеріальної суспензії

Розведення	Кількість колоній, що виросли на чашці Петрі	Середнє значення, (а)	Кількість мікроорганізмів в 1 мл досліджуваної суспензії, (М)
10^{-3}			
10^{-4}			
10^{-5}			

Робота № 47. Стандарти мутності та їх застосування для підрахунку клітин

У ряді випадків кількість клітин у суспензії буває достатньо визначити візуально шляхом порівняння зі стандартом мутності. Стандарти мутності являють собою суспензію частинок скла пірекс в дистильованій воді. За одиницю стандарту мутності умовно прийнята мутність суспензії (в фізрозчині) бактерій з концентрацією клітин 100 млн/мл. Стандарт мутності включає 4 еталона на 11, 10, 9 та 5 одиниць, що відповідає змісту $1,1 \times 10^9$; 1×10^9 ; $0,9 \times 10^9$ і $0,5 \times 10^9$ клітин в 1 мл суспензії. Для визначення кількості клітин пробірку з досліджуваною суспензією ставлять поруч з еталоном 10 і розглядають їх у відбитому та прохідному світлі на тлі білого аркуша паперу, в центрі якого нанесено декілька чорних ліній.

Еталони 9 і 11 допоміжні, що дозволяють більш чітко порівняти мутність досліджуваної суспензії бактерій з еталоном. Стандартизація мутності суспензії бактерій (особливо часто у випадку тест-організмів) має істотне значення при приготуванні посівного матеріалу в серійних дослідах, наприклад при визначенні антибіотичної активності препаратів методом дифузії в агар.

Контрольні питання:

1. Які методи кількісного обліку мікроорганізмів ви знаєте?
2. Назвіть основні методи визначення кількості мікроорганізмів під мікроскопом.
3. Який метод рекомендується використовувати для підрахунку клітин дріжджів? Опишіть його.
4. Охарактеризуйте метод граничних розведень стосовно до кількісного обліку біфідо- і молочнокислих бактерій.

Робота № 48. Стандартизація та оцінка якості біопрепаратів шляхом визначення титру препарату

Використання мікроорганізмів як основи біологічних препаратів для захисту рослин – порівняно новий напрям біотехнології, але вже має істотні досягнення. В даний час бактерії, гриби, віруси знаходять все більш широке застосування як промислові біопестициди. Технологія виробництва цих препаратів дуже різна, як різна природа і фізіологічні особливості мікроорганізмів -продуцентів.

Однак є ряд універсальних вимог до біопестицидів, основними серед них є: селективність і висока ефективність дії, безпека для людини і корисних представників флори і фауни, тривале збереження і зручність застосування.

Біологічні засоби захисту рослин (біопрепарати та ентомофаги) повинні відповідати певним вимогам, тобто бути стандартизовані. Стандартизацію та оцінку якості біопрепаратів проводять за кількістю діючого початку (спори, включення, клітини, метаболіти) в одиниці маси або об'єму і з біологічної активності.

Для визначення кількості діючого початку (титру препарату) використовують різні методи залежно від природи діючого агента. Так, кількість життєздатних спор або клітин визначають посівом препарату на живильне середовище з подальшим підрахунком вирослих колоній. Титр вірусних препаратів (та інших організмів, що не розмножуються на живильних середовищах) підраховують в камері Горяєва під світловим мікроскопом.

Кількість токсинів, антибіотиків, інших БАВ визначають хроматографічними і спектральними методами.

Біологічну активність як головний показник якості біопрепарату вимірюють реакцією тест-об'єкта на дію біопестицида. Тест-об'єктами є комахи (для ентомопатогенних препаратів) або фітопатогени (для препаратів проти хвороб рослин). Стандартизацію та оцінку якості біопрепаратів проводять по кількості діючого інфекційного навантаження (спори, включення, клітини, метаболіти) в одиниці маси або об'єму і по біологічній активності. Останній показник найбільш значущий.

Біологічна активність препаративної форми може бути більше або менше цього показника для штаму в залежності від інгредієнтів. Існують різні методи визначення кількості діючого інфекційного навантаження в одиниці маси або обсягу (титру препарату). Так, кількість життєздатних спор або клітин визначають посівом препарату на живильне середовище з подальшим підрахунком вирослих колоній. Для посіву використовують різні розведення суспензій препарату, що забезпечують ріст не більше 300 і не менше 50 колоній в одній чашці Петрі.

РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ТА УПРАВЛІННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ ПРОЦЕСАМИ

Титр визначають за формулою:

$$X = N \times n,$$

де N - середньоарифметичне число колоній з двох серій паралельно десятикратних розведень; n - максимальне розведення (10^i); i -кратність розведення.

Як правило, цей метод використовується для бактеріальних і грибних препаратів. Титр вірусних препаратів цим методом не визначають, оскільки віруси не розмножуються на середовищах. У цьому випадку використовують прямий підрахунок кількості діючого початку під електронним мікроскопом, або під світловим мікроскопом у камері Горяєва здійснюють підрахунок великих вірусів ядерного або цитоплазматичного поліедроза. Кількість токсинів, антибіотиків, інших біологічно активних речовин (БАР) визначають хроматографічними, фотометричними і спектрофотометричними методами. Наприклад, спектрофотометричний метод визначення кількості екзотоксину в бітоксібацілліну та інших утримуючих його препаратах заснований на здатності нуклеотидів поглинати УФ-світло в області 260 ... 290 нм. Виділений з препарату екзотоксин гідролізують хлорною кислотою до утворення нуклеотидів і спектрофотомерують. Визначають величину поглинання при 260,270 і 290 нм. Вміст δ -екзотоксину в препараті визначають за формулою:

$$C = \frac{D_{270} - D_{290}}{m \times 0,19} \times 22,19 \times V \times n \times 100\%$$

де C -вміст δ - екзотоксину в препараті,%; m - маса наважки, мкг;

D_{270} і D_{290} -поглинання при довжинах хвиль 270 і 290 нм;

V -об'єм вихідної рідини;

n - розведення.

Метод використовують, якщо D_{260} і D_{270} розрізняються не більше ніж на 10%.

Хід роботи:

1. Провести визначення титру біопрепаратів шляхом підрахунку в камері Горяєва.

2. Описати методи визначення титру біопрепаратів шляхом посіву на живильні середовища, в камері Горяєва або під електронним мікроскопом. Проаналізувати переваги і недоліки всіх методів визначення титру діючого початку.

3. Провести експрес-метод визначення життєздатних клітин бульбочкових бактерій в сухому нітрагіні. Для цього у 99 мл стерильної водопровідної води розводять 1 г сухого нітрагіна і витримують на шейкері протягом 2 год. при 200 об/хв. Потім суспензію клітин поміщають

РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ТА УПРАВЛІННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ ПРОЦЕСАМИ

в пробірку і забарвлюють розчином прімуліна (кінцеве розведення 1: 1000). Через 15 хв. 0,01 мл забарвлених клітин наносять на предметне скло, накривають покривним склом 18x18 мм, краї якого заливають розплавленим парафіном. Під люмінесцентним мікроскопом МЛ-2 препарат роздивляються і підраховують загальну кількість клітин і відсоток живих клітин в 1 мл суспензії по методу Виноградського - Шульгіною. Прімулін практично не проникає в живі клітини, але накопичується в мертвих. Завдяки цьому при перегляді препарату в світлі люмінесценції при висвітленні об'єкта через об'єктив живі клітини в полі зору тьмяно люмінесцують, а мертві світяться яскравим зеленувато-жовтим світлом. Загальна кількість клітин можна визначити в тому ж полі зору також при фазово-контрастному освітленні об'єкта знизу, через конденсор. Кількість життєздатних клітин в 1 г сухого нітрагіна визначають з урахуванням того, що для приготування мікроскопічного препарату використовують розведення Нітрагіна 10^{-2} .

Робота № 49. Визначення чутливості мікроорганізмів до різних концентрацій біопрепаратів методом паперових дисків

Мета роботи: дослідити ефективність дії різних концентрацій біопрепаратів та фунгіцидів на ріст збудників хвороб методом паперових дисків.

Обладнання та матеріали: чисті культури мікроорганізмів –збудників хвороб (*Pectobacterium sp.*), бактеріологічні петлі, спиртівки, стерильні пробірки, предметні скла, чашки Петрі з МПА, паперові диски, просочені розчинами препаратів, стерильний фізіологічний розчин, термостат з температурою 37°C.

Хід роботи:

Для визначення антимікробної дії препаратів застосовують метод індикаторних (паперових) дисків.

1. Змийте стерильним фізіологічним розчином культуру бактерій. Для цього в пробірку або чашку Петрі стерильно внесіть 2 - 3 мл фізрозчину. Бактеріологічною петлею обережно зніміть культуру з поверхні агару і ретельно розмішайте в фізіологічному розчині.

2. З отриманої суспензії клітин приготуйте бактеріальну суспензію з концентрацією 500 млн мікробних клітин по стандарту мутності та внесіть в чашку Петрі з підсушеним стерильним МПА. Рівномірно розподіліть суспензію на поверхні агару і залиште при кімнатній температурі на 30 хв. для адсорбції клітин.

РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ТА УПРАВЛІННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ ПРОЦЕСАМИ

3. Через 30 хв. стерильною піпеткою відберіть надлишок суспензії та помістіть на поверхню засіяної бактеріями середовища на рівному відстані (2,5 - 3,0 см) один від одного і на відстані 1,5 - 2,0 см від краю чашки паперові диски, просочені різними концентраціями препаратів (Рис. 47).

4. Інкубуйте посіви при температурі 37°C протягом 24 год.

5. Через 24 год. виміряйте діаметр зони затримки росту культури навколо кожного диска і визначте ступінь чутливості культури за наступними

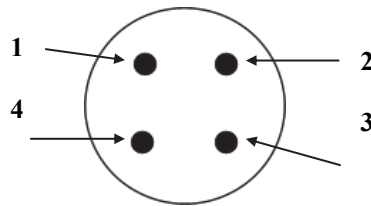


Рис. 47. Схема розміщення дисків, просочених різними концентраціями препаратів, на поверхні засіяного мікроорганізмами поживного середовища

критеріями:

а) діаметр зони затримки росту більше 25 мм - культура високочутлива;

б) від 15 до 25 - чутлива;

в) від 10 до 14 - малочутлива;

г) менше 10 мм і повна відсутність - стійка. Чим чутливіші мікроорганізми до препарату, тим ширша навколо диска зона відсутності росту мікроорганізму (стерильна зона). В подальшому вибирають таку концентрацію препарату, яка дає найширшу зону, тобто діє найефективніше.

6. Результати оформіть у вигляді табл. 32.

Контрольні питання:

1. Що таке стандартизація та які показники характеризують якість біопрепаратів і ентомофагів?

2. Яким методом доцільно визначати титр препаратів на основі спор грибів і чому?

Таблиця 32

Визначення чутливості мікроорганізмів до біопрепаратів

Різні концентрації препаратів	Найменування або номер дослідної культури			
	1		2	
	Діаметр зони затримки росту, мм	Ступінь чутливості	Діаметр зони затримки росту, мм	Ступінь чутливості

РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ТА УПРАВЛІННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ ПРОЦЕСАМИ

3. Назвіть переваги і недоліки методу визначення титру біопрепаратів за допомогою камери Горяєва.
4. В яких випадках слід використовувати методи хроматографії та спектрофотометрії.
5. Яким методом в лабораторних умовах можна найкраще підібрати оптимальні концентрації препаратів, що пригнічують ріст збудників хвороб рослин.

**РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНІ ДОКУМЕНТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ
ВИРОБНИЦТВ**

10.1. Розробка технічних умов (ТУ У) на продукт

Результати вивчення біотехнологічних процесів і формування технологічних схем виробництва продуктів біотехнології оформляється у вигляді спеціальних нормативних документів. Є два основні документи по технології виробництва і до них багато додаткових. Технічні умови на продукт рекомендують якісні та кількісні характеристики самого продукту біотехнології. Технічний регламент визначає спосіб отримання продукту і всі матеріали, які відносяться до нього.

Технічні умови на продукт – це сукупність вимог до характеристик якості готового продукту, що дозволяє його сертифікувати і бракувати (якщо продукт вимогам не відповідає). Технічні умови включають в себе :

1. дані про призначення продукту;
2. нормативні посилання;
3. форма випуску (порошок, гранули, таблетки, ампули суспензії, пасти, брикети та інше);
4. дані про наявність сортності продукту з врахуванням його якості;
5. опис характеристик продукту:
 - ✓ органолептичні характеристики (колір, запах, смак, консистенція);
 - ✓ вміст основних компонентів (не менше ...);
 - ✓ вміст домішок в тому числі шкочочинних (не більше ...);
 - ✓ зараженість мікроорганізмами (загальна і санітарно-показова мікрофлора);
 - ✓ токсичність, канцерогенність і для живих культур це – патогенність.
6. фізичні характеристики;
7. вимоги до сировини;
8. вимоги безпеки (в тому числі пожежної та вибухової небезпечності);
9. дані про дозвіл санітарно-епідеміологічної та екологічної служб, для ліків – фармакопейні статті, для харчових продуктів – дозвіл контрольних служб. Ці дані можуть бути відображені у вигляді посилань на гігієнічний сертифікат; затверджена гранично допустима концентрація для води, ґрунту, повітря; для мікроорганізмів обов'язкова довідка про не патогенність і довідка про реєстрацію в українській колекції промислових мікроорганізмів.
10. Вимоги до охорони довкілля, правила зберігання та транспортування, термін збереження і методи контролювання речовин різних середовищ;

Технічні умови можуть бути постійними і тимчасовими. Тимчасові технічні умови випускають на дослідну партію продукту, об'єм якої оговорюється.

10.2. Розробка технологічного регламенту

Технологічний регламент – комплексний документ, який включає в себе «ноу-хау» технології, є секретним і оберігаємим об'єктом. Він складається з наступних розділів:

1) Характеристика кінцевої продукції виробництва. У цьому розділі приводиться найменування і номер затверджених технічних умов на дану продукцію і переносяться дані із технічних умов (основне призначення, зовнішній вигляд, основні фізико-хімічні властивості, хімічні і структурні формули, їх склад і інші дані);

2) Хімічна або біотехнологічна схема виробництва. Схема будується на технології з виробництвами, де на кожній стадії відбувається процес хімічного перетворення речовин. В біотехнології така схема особливо необхідна для процесів біотрансформації та біокаталізу і в меншому ступені для процесів біосинтезу продуктів метаболізму, відмінних від біомаси мікроорганізмів.

3) Технологічна схема виробництва у вигляді блок-схем, відображає послідовність виконання робіт у виробництві з розділенням їх по стадіям та операціям технологічного процесу (рис.48). Також вказуються основні матеріальні потоки (надходження сировини і проміжні продукти, місця утворення відходів стічних вод, викидів у атмосферу системами очистки та утилізації). Кожна стадія і операція нумеруються: ТП-1, ТП-2. В цьому ж розділі є дані про підготовку культури мікроорганізмів-продуцентів.

4) Апаратурна схема виробництва зі специфікацією обладнання. Цей розділ містить креслення з апаратурною схемою виробництва та специфікацією обладнання, що закріплене за даним виробництвом. На схемі вказують все обладнання (в тому числі додаткове). Обладнання і прибори пронумеровують в чіткій послідовності згідно з технологічним процесом. Специфікація включає в себе найменування, кількість, матеріал, технічну характеристику та реєстраційний номер одиниць обладнання та приборів.

5) Характеристики сировини та матеріалів. Цей розділ оформляють у вигляді схем і таблиць, вказують сорт, певні позначення і показники, які обов'язкові для перевірки, відомості про мікроорганізми. Ці відомості викладено в документі, який називається паспорт на штам продуцент. Паспорт включає в себе морфологічні характеристики, методи діагностування та випробувань, що включає посилання на дозвіл

РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНІ ДОКУМЕНТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

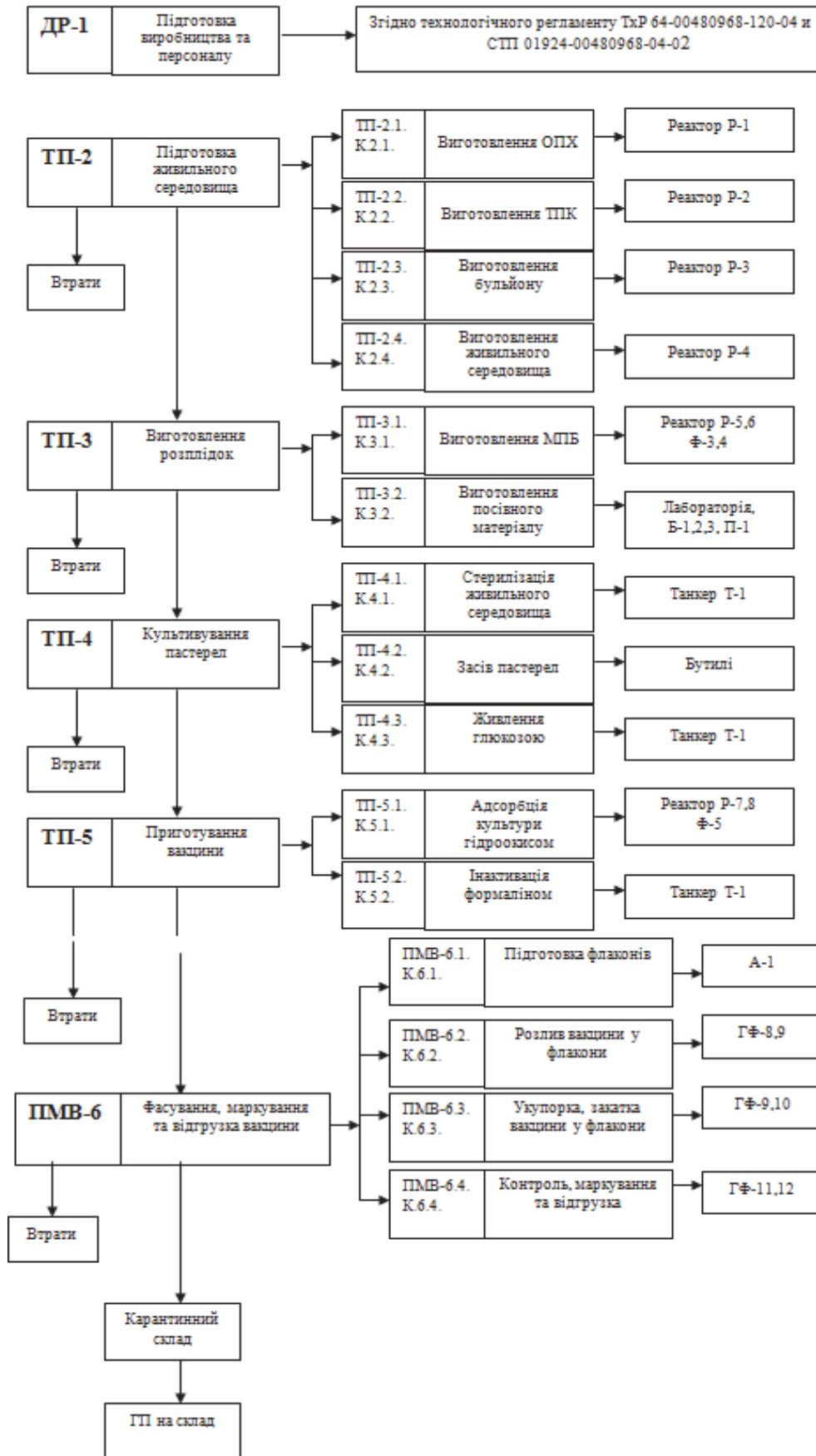


Рис. 48. Блок-схема отримання вакцини

РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНІ ДОКУМЕНТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

санепідемнагляду, номер реєстрації в колекції промислових мікроорганізмів. Штами-продуценти патентують, використовуючи ті ж самі документи.

6) Викладення технологічного процесу. В цьому розділі технологічний процес розглядається за стадіями з врахуванням хронологічної послідовності проведення операції. Викладається сутність процесів, які протікають з вказуванням основних та побічних реакцій, температур, швидкості, тиску, теплових ефектів, величини рН, рецептур технологічних режимів. В заключенні для кожної стадії складають таблицю балансу матеріальних потоків за наступною схемою:

- Кількість витраченого на цій стадії – найменування сировини або продуктів, концентрація основної речовини, кількість, об'єм та маса витрачених інгредієнтів;
- Кількість отриманого на цій стадії – це готовий продукт для кінцевої стадії, відходи виробництв і втрати. Відходи – це продукти, які не були використані, втрати – не повертаються у виробництво. Для відходів вказують вміст цінних речовин (в тому числі м'яса), найбільш крупні статті втрат – вологість при висушуванні, газоподібні продукти реакції, певні механічні втрати.

Зміст робіт викладають за операціями ТП-1, ТП-2 ... з наступною послідовністю:

- Підготовка сировини;
- Підготовка обладнання перед завантаженням;
- Завантаження сировини або напівпродуктів;
- Ведення технологічних процесів та методів контролю;
- Відбір кінцевого продукту та відходів на подальшу обробку.

В цьому розділі описують вимоги до обладнання: сухість, залишки середовища, герметичність, протикорозійне покриття. Вказується як проводиться завантаження, основні параметри процесу, способи їх контролю та регулювання, також можуть бути вказані дві таблички: 1 – норми технологічного режиму, 2 – можливі неполадки та способи їх ліквідації.

7) Матеріальний баланс. Містить таблиці матеріального балансу в яких зведено розрахунки:

- На одиницю продукції, що випускається;
- На одиничний виробничий потік;
- На все виробництво в цілому.

В таблиці вказується кількість сировини, що була витрачена, кількість отриманого продукту, відходи і втрати.

8) Переробка та обеззараження відходів виробництва. В цьому розділі надається матеріальний баланс по відходам виробництва, які переробляються та знешкоджуються, у певних таблицях зводиться коротка характеристика всіх відходів виробництва (назва відходів, кількість на

РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНІ ДОКУМЕНТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

одиницю готової продукції, агрегатний стан, речовини, які мають бути знешкоджені, процентний вміст речовини у відходах до і після знешкодження і кількість речовини, що утилізується).

9) Контроль виробництва. Зведена таблиця, в якій вказується певна стадія виробництва, контрольований параметр значення та розмірність норми, методи і засоби контролю, його періодичність.

10) Техніка безпеки, пожежна безпека у виробничій санітарії. Вказується посилання на нормативні документи.

11) Охорона оточуючого середовища. Вказують перелік викидів у довкілля, дані про фактичну величину викидів, концентрація в них шкідливих речовин, вказують ГДК речовин в робочій зоні, а також найбільш допустимий об'єм викидів, верхню межу, яка пройшла погодження санепідем органами. Такі ж дані проводяться по стічним водам, твердим та рідким відходам, тут же вказуються заходи по обеззараженню стічних вод і відходів.

12) Перелік виробничих інструкцій для кожного робочого місця у виробничих циклах.

13) Техніко-економічні нормативи. Вказується інтегральні загальні характеристики по всьому виробництву, вихід цільових продуктів, норми розходу сировини, норми енергозатрат і трудові затрати.

14) Інформаційні матеріали. Дані про розробників, дані про виробництво на підприємстві, дані про закордонні аналоги, повні відомості про штамп продуцент, фармакологічні властивості, обґрунтування вибору технологій та певних розрахунків по кінетиці речовин.

Етапи розробки технологій:

➤ Спочатку проводять наукові дослідження, результатом яких є лабораторна технологія. При цьому визначається принципова можливість отримання цільового продукту не лише в колбах, але й в апаратах невеликого масштабу, підсумковим документом по цих документах є лабораторний регламент.

➤ Створення дослідно-промислової установки. Перевірка лабораторної технології: виготовлення дослідних партій продуктів в кількості, необхідній для перевірки властивостей продукту (дія антибіотиків, вітамінів, ліків, оцінка їх якості). Кінцевим підсумковим документом є дослідно-промисловий регламент.

➤ Дослідно-промисловий регламент є основою для створення вихідних даних на проектування виробництва, за яким в подальшому проектується і будується промислова установка по даному виробництву.

➤ При введенні виробництва у дію створюється пусковий регламент, який діє до тих пір, поки в промислових умовах не будуть відтворені показники вихідних даних. Лише після цього складається постійний виробничий регламент, який діє протягом всього функціонування виробництва.

**ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ У
ЛАБОРАТОРНІЙ ПРАКТИЦІ ІЗ ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ**

РОЗДІЛ 1. ОРГАНІЗАЦІЯ ДОСЛІДЖЕНЬ З ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДСТУ 3803-98 Біотехнологія. Терміни і визначення.

ДСТУ 2424-94 Промислова мікробіологія. Терміни та визначення

Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсиколого-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів. Методичні вказівки

ДСанПіН 9.9.5-153-2008 Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I - IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами

ДСТУ 2156-93 Безпечність промислових підприємств. Терміни та визначення

ДСТУ 2881-94 Екологія мікроорганізмів. Терміни та визначення.

ДСТУ 2636 -94 Загальна мікробіологія. Терміни та визначення.

ISO 14001:2004 Системы экологического менеджмента. Требования и руководство по применению

ДСТУ ISO 9000 – 2001 Системи управління якістю. Основні положення та словник.

ДСТУ ISO 9001 – 2001 Системи управління якістю. Вимоги.

ДСТУ 3410 – 96 Система сертифікації УкрСЕПРО Основні положення.

ГОСТ 28471-90 Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение

ГОСТ 17.0.0.01-76 Система стандартов в области охраны природы и улучшения использования природных ресурсов. Основные положения

ГОСТ 17.0.0.04-90 Охрана природы. Экологический паспорт промышленного предприятия. Основные положения

ДСТУ ISO Guide 64:2010 Настанови щодо враховування екологічних питань у стандартах на продукцію (ISO Guide 64:2008, IDT)

ГОСТ 4.164-85 СПКП. Анализаторы радиоспектрометрические. Номенклатура показателей

ГОСТ 4.170-85 СПКП. Анализаторы аэрозолей твердых и сыпучих веществ. Номенклатура показателей

ГОСТ 4.319-85 СПКП. Приборы и аппараты лабораторные из стекла, кварца и фарфора. Номенклатура показателей

ГОСТ 8.221-76 ГСИ. Влагометрия и гигрометрия. Термины и определения

ГОСТ 8.472-82 ГСИ. Гигрометры пьезосорбционные. Методы и средства поверки

ГОСТ 6859-72 Приборы для отмеривания и отбора жидкостей. Технические условия.

ГОСТ 7995-80 Краны соединительные стеклянные. Технические условия.

ГОСТ 13350-78 Анализаторы жидкости кондуктометрические. ГСП. Общие технические условия

ДСТУ 3152-95 Автоклави продовольчі. Загальні технічні вимоги та вимоги безпеки

ГОСТ 15624-75 Масс-спектрометры. Термины и определения.

ГОСТ 16851-71 Анализаторы жидкости. Термины и определения

ГОСТ 16865-79 Аппаратура для рентгеноструктурного и рентгеноспектрального анализов. Термины и определения.

ГОСТ 18325-80 Мебель лабораторная для работы с радиоактивными веществами. Общие технические требования.

ГОСТ 22018-84 Анализаторы растворенного в воде кислорода амперометрические

ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ

ГСП. Общие технические требования.

ГОСТ 24104-88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия.

ГОСТ 26703-93 Хроматографы аналитические газовые. Общие технические требования и методы испытаний.

ГОСТ 29024-91 Анализаторы жидкости турбидиметрические и нефелометрические. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 4.321-85 СПКП. Посуда и оборудование лабораторные из кварца и фарфора. Номенклатура показателей

ГОСТ 8.269-77 ГСИ. Бюретки измерительные стеклянные для химических неавтоматических газоанализаторов. Методы и средства поверки.

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 7329-91 Изделия из стекла химико-лабораторного и электро-вакуумного. Метод поляризационно-оптического измерения разности хода лучей.

ГОСТ 7851-74 Посуда стеклянная химико-лабораторная. Горловины. Внутренние диаметры.

ГОСТ 8682-93 (ИСО 383-76) Посуда лабораторная стеклянная. Шлифы конические взаимозаменяемые.

ГОСТ 9147-80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия.

ГОСТ 9737-93 (ИСО 641-75) Посуда лабораторная стеклянная. Шлифы сферические взаимозаменяемые.

ГОСТ 12738-77 Колбы стеклянные с градуированной горловиной. Технические условия.

ГОСТ 18954-73 Прибор и пипетки стеклянные для отбора и хранения проб газа. Технические условия.

ГОСТ 19908-90 Тигли, чаши, стаканы, колбы, воронки, пробирки и наконечники из прозрачного кварцевого стекла. Общие технические условия.

ГОСТ 21400-75 Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний.

ГОСТ 23932-90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия.

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 28165-89 Приборы и аппараты лабораторные из стекла. Аквадистилляторы. Испарители. Установки ректификационные. Общие технические требования

ГОСТ 29044-91 (ИСО 384-78) Посуда лабораторная стеклянная. Принципы устройства и конструирования мерной посуды

ГОСТ 29169-91 (ИСО 648-77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой.

ГОСТ 29224-91 (ИСО 386-77) Посуда лабораторная стеклянная. Термометры жидкостные стеклянные лабораторные. Принципы устройства, конструирования и применения

ГОСТ 29225-91 (ИСО 1775-75) Посуда и оборудование фарфоровые лабораторные. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 29226-91 Вискозиметры жидкостей. Общие технические требования и методы испытаний.

ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.

ГОСТ 29228-91 (ИСО 835-2-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки

ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ

градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания.

ГОСТ 29229-91 (ИСО 835-3-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 3. Пипетки градуированные с временем ожидания 15 с.

ГОСТ 29230-91 (ИСО 835-4-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные

ГОСТ 29251-91 (ИСО 385-1-84) Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 1. Общие требования.

ГОСТ 29252-91 (ИСО 385-2-84) Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 2. Бюретки без времени ожидания.

ГОСТ 29253-91 (ИСО 385-3-84) Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 3. Бюретки с временем ожидания 30 с.

ДСТУ 2215-93 Розчини та індикатори. Терміни та визначення

ДСТУ 2216-93 Реактиви та особливо чисті речовини. Позначення та методи визначення чистоти. Терміни та визначення

ДСТУ ГОСТ 8.531-2003 Метрологія. Стандартні зразки складу монолітних та дисперсних матеріалів. Способи оцінювання однорідності (ГОСТ 8.531-2002, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.532-2003 Метрологія. Стандартні зразки складу речовин і матеріалів. Міжлабораторна метрологічна атестація. Зміст і порядок проведення робіт (ГОСТ 8.532-2002, IDT)

ДСТУ ГОСТ 4919.2:2008 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов (ГОСТ 4919.2-77, IDT)

ДСТУ ГОСТ 22001:2008 Реактивы и особо чистые вещества. Метод атомно-абсорбционной спектрометрии определения примесей химических элементов (ГОСТ 22001-87, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27025:2009 Реактивы. Общие указания по проведению испытаний (ГОСТ 27025-86, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27026:2009 Реактивы. Определение нелетучего остатка (ГОСТ 27026-86, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27184:2009 Реактивы. Определение остатка после прокаливания (ГОСТ 27184-86, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27565:2008 Вещества особо чистые. Концентрирование микропримесей методом упаривания (ГОСТ 27565-87, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27566:2008 Реактивы и особо чистые вещества. Метод атомно-эмиссионной спектроскопии для определения примесей химических элементов в жидкофазных веществах (ГОСТ 27566-87, IDT)

ДСТУ ГОСТ 28687:2009 Реактивы. Метод определения пероксидов в органических растворителях (ГОСТ 28687-90, IDT)

ДСТУ ГОСТ 28738:2009 Реактивы. Методы определения примеси общей серы в органических растворителях (ГОСТ 28738-90, IDT)

ДСТУ ISO 3696-2003 Вода для застосування в лабораторіях. Вимоги та методи перевірення (ISO 3696:1987, IDT)

ДСТУ-Н ISO Guide 31:2008 Метрологія. Стандартні зразки. Зміст сертифікатів і етикеток (ISO Guide 31:2000, IDT)

ДСТУ-Н ISO Guide 34:2006 Загальні вимоги до компетентності виробників стандартних зразків (ISO Guide 34:2000, IDT)

ДСТУ-Н ISO Guide 35:2006 Атестація стандартних зразків. Загальні та статистичні принципи (ISO Guide 35:1989, IDT)

ГОСТ 8.134-98 ГСИ. Шкала pH водных растворов.

ГОСТ 8.315-97 ГСИ. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения.

ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ

ДСТУ ГОСТ 4919.2:2008 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов (ГОСТ 4919.2-77, IDT)

ДСТУ ГОСТ 22001:2008 Реактивы и особо чистые вещества. Метод атомно-абсорбционной спектрометрии определения примесей химических элементов (ГОСТ 22001-87, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27025:2009 Реактивы. Общие указания по проведению испытаний (ГОСТ 27025-86, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27026:2009 Реактивы. Определение нелетучего остатка (ГОСТ 27026-86, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27184:2009 Реактивы. Определение остатка после прокаливания (ГОСТ 27184-86, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27565:2008 Вещества особо чистые. Концентрирование микропримесей методом упаривания (ГОСТ 27565-87, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27566:2008 Реактивы и особо чистые вещества. Метод атомно-эмиссионной спектроскопии для определения примесей химических элементов в жидкофазных веществах (ГОСТ 27566-87, IDT)

ДСТУ ГОСТ 28687:2009 Реактивы. Метод определения пероксидов в органических растворителях (ГОСТ 28687-90, IDT)

ДСТУ ГОСТ 28738:2009 Реактивы. Методы определения примеси общей серы в органических растворителях (ГОСТ 28738-90, IDT)

ДСТУ ISO 3696-2003 Вода для застосування в лабораторіях. Вимоги та методи перевірення (ISO 3696:1987, IDT)

ГОСТ 195-77 Натрий сернистокислый. Технические условия.

ГОСТ 199-78 Натрий уксуснокислый 3-водный. Технические условия.

ГОСТ 200-76 Натрий фосфорноватистокислый 1-водный. Технические условия.

ГОСТ 245-76 Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия.

ГОСТ 342-77 Натрий дифосфат 10-водный. Технические условия.

ГОСТ 435-77 Марганец (II) сернокислый 5-водный. Технические условия.

ГОСТ 3117-78 Аммоний уксуснокислый. Технические условия.

ГОСТ 3118-77 Кислота соляная. Технические условия.

ГОСТ 3158-75 Барий сернокислый. Технические условия.

ГОСТ 4144-79 Калий азотистокислый. Технические условия.

ГОСТ 4145-74 Калий сернокислый. Технические условия.

ГОСТ 4197-74 Натрий азотистокислый. Технические условия.

ГОСТ 4217-77 Калий азотнокислый. Технические условия.

ГОСТ 4220-75 Калий двуххромовокислый. Технические условия.

ГОСТ 4221-76 Калий углекислый. Технические условия.

ГОСТ 24363-80 Калия гидроокись. Технические условия

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

ДСТУ ISO 7954:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови з підрахунку дріжджів і мікроскопічних грибів. Техніка підрахування колоній, культивованих за температури 25°C (ISO 7954:1987, IDT)

ДСТУ ГОСТ 30712-2003 Продукти безалкогольної промисловості. Методи мікробіологічного аналізу (ГОСТ 30712-2001, IDT)

ДСТУ 4812:2007 Дріжджі хлібопекарські пресовані. Технічні умови.

ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ

ДСТУ ISO 6611/IDF 94:2007 Молоко та молочні продукти. Визначення колонієутворювальних одиниць дріжджів та/чи плісені. Метод підрахування колоній, що виросли за температури 25°C (ISO 6611/IDF 94:2004, IDT)

ISO 22000:2005 Системы менеджмента безопасности пищевых продуктов. Требования ко всем организациям в цепи производства и потребления пищевых продуктов

ГОСТ 2.787-71 ЕСКД. Обозначения условные графические в схемах. Элементы, приборы и устройства газовой системы хроматографов

ДСТУ ГОСТ 4919.2:2008 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов (ГОСТ 4919.2-77, IDT)

ДСТУ ГОСТ 22001:2008 Реактивы и особо чистые вещества. Метод атомно-абсорбционной спектрометрии определения примесей химических элементов (ГОСТ 22001-87, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27025:2009 Реактивы. Общие указания по проведению испытаний (ГОСТ 27025-86, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27565:2008 Вещества особо чистые. Концентрирование микропримесей методом упаривания (ГОСТ 27565-87, IDT)

ДСТУ ГОСТ 27566:2008 Реактивы и особо чистые вещества. Метод атомно-эмиссионной спектроскопии для определения примесей химических элементов в жидкофазных веществах (ГОСТ 27566-87, IDT)

ДСТУ ГОСТ 28738:2009 Реактивы. Методы определения примеси общей серы в органических растворителях (ГОСТ 28738-90, IDT)

ДСТУ ISO 3696-2003 Вода для застосування в лабораторіях. Вимоги та методи перевірення (ISO 3696:1987, IDT)

ГОСТ 17206-96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 19908-90 Тигли, чаши, стаканы, колбы, воронки, пробирки и наконечники из прозрачного кварцевого стекла. Общие технические условия

ГОСТ 195-77 Натрий сернистокислый. Технические условия.

ГОСТ 200-76 Натрий фосфорноватистокислый 1-водный. Технические условия.

ГОСТ 245-76 Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия.

ГОСТ 342-77 Натрий дифосфат 10-водный. Технические условия.

ГОСТ 435-77 Марганец (II) сернокислый 5-водный. Технические условия.

ГОСТ 3117-78 Аммоний уксуснокислый. Технические условия.

ГОСТ 3158-75 Барий сернокислый. Технические условия.

ГОСТ 4145-74 Калий сернокислый. Технические условия.

ГОСТ 4197-74 Натрий азотистокислый. Технические условия.

ГОСТ 4217-77 Калий азотнокислый. Технические условия.

ГОСТ 4220-75 Калий двухромовокислый. Технические условия.

ГОСТ 4221-76 Калий углекислый. Технические условия.

ГОСТ 24363-80 Калия гидроксид. Технические условия

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ

ДСТУ ISO 9998:2005 Якість води. Настанови щодо оцінювання та підрахування колоній мікроорганізмів на середовищі, яке використовують для визначення якості води (ISO 9998:1991, IDT)

ГОСТ 248 -81 Вода питьевая. Полевые методы санитарно-микробиологического анализа

ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ

ДСТУ ISO 4225:2008 Якість повітря. Загальні положення. Словник термінів (ISO 4225:1994, IDT)

ГОСТ 24481-80 Вода питьевая. Отбор проб.

ДСТУ ISO 9998:2005 Якість води. Настанови щодо оцінювання та підрахування колоній мікроорганізмів на середовищі, яке використовують для визначення якості води (ISO 9998:1991, IDT)

ГОСТ 248 -81 Вода питьевая. Полевые методы санитарно-микробиологического анализа

ДСТУ ISO 9887-2002 Якість води. Оцінювання здатності до аеробного біологічного розкладання органічних сполук у водному середовищі. Напівбезперервний метод із використанням активного мулу (ISO 9887:1992, IDT)

ДСТУ ISO 10712-2003 Якість води. Тест на пригнічення росту *Pseudomonas putida* (тест на пригнічення розмноження клітин *Pseudomonas*) (ISO 10712:1995, IDT)

ДСТУ ISO 14507:2005 Якість ґрунту. Попереднє оброблення проб для визначення органічних забруднювальних речовин (ISO 14507:2003, IDT)

ГОСТ 248 -81 Вода питьевая. Полевые методы санитарно-микробиологического анализа

ДСТУ ISO 4225:2008 Якість повітря. Загальні положення. Словник термінів (ISO 4225:1994, IDT)

ГОСТ 24481-80 Вода питьевая. Отбор проб.

ДСТУ ISO 9887-2002 Якість води. Оцінювання здатності до аеробного біологічного розкладання органічних сполук у водному середовищі. Напівбезперервний метод із використанням активного мулу (ISO 9887:1992, IDT)

ДСТУ 3750-98 Мікробіологія ґрунту. Терміни та визначення

ДСТУ ISO 17616:2010 Якість ґрунту. Настанови щодо вибору та оцінювання методів біологічних аналізів для екотоксикологічного характеризування ґрунтів і ґрунтових матеріалів (ISO 17616:2008, IDT).

ГОСТ 17.4.4.02-84 Охрана природы. Почвы. Метод отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.

ГОСТ 29269-91 Почвы. Общие требования к проведению анализов

ДСТУ ISO 11266-2001 Якість ґрунту. Настанови щодо лабораторного випробування біодеградації органічних хімічних речовин у ґрунті в аеробних умовах (ISO 11266:1994, IDT)

ДСТУ ISO 14238-2003 Якість ґрунту. Біологічні методи. Визначання мінералізації азоту і нітрифікації в ґрунтах та впливу хімічних речовин на ці процеси (ISO 14238:1997, IDT)

ДСТУ ISO 14240-1-2003 Якість ґрунту. Визначання ґрунтової мікробної біомаси. Частина 1. Метод субстрат-стимульованого дихання (ISO 14240-1:1997, IDT)

ДСТУ ISO 15473:2005 Якість ґрунту. Настанови з лабораторного випробування біодеградації органічних хімічних речовин у ґрунті в анаеробних умовах (ISO 15473:2002, IDT)

ДСТУ ISO 17155:2005 Якість ґрунту. Визначення чисельності та активності ґрунтової мікрофлори із застосуванням кривих дихання (ISO 17155:2002, IDT)

РОЗДІЛ 4. ТИПИ ФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

ДСТУ 3946-2000 Система розроблення і поставлення продукції на виробництво. Продукція харчова. Основні положення

ДСТУ 5098-1:2008 Харчова промисловість. Методики виконання вимірювання. Частина 1. Загальні вимоги

ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ

ДСТУ-Н 7182:2010 Молочна та м'ясна промисловість. Правила розроблення, оформлення та вимоги до змісту технологічної інструкції.

ДСТУ-Н САС/RCP 46:2008 Звід гігієнічних правил для охолоджених упакованих харчових продуктів із подовженим терміном зберігання (САС/RCP 46:1999, IDT)

ДСТУ ISO 22000:2007 Системи керування безпечністю харчових продуктів. Вимоги до будь-яких організацій харчового ланцюга (ISO 22000:2005, IDT)

ДСТУ-П ISO/TS 22003:2009 Системи управління безпечністю харчових продуктів. Вимоги до органів, що здійснюють аудит та сертифікацію систем управління безпечністю харчових продуктів (ISO/TS 22003:2007, IDT)

ДСТУ ISO 22005:2009 Простежуваність у кормових та харчових ланцюгах. Загальні принципи та основні вимоги щодо розроблення та запровадження системи (ISO 22005:2007, IDT)

ДСТУ ISO 6222-2002 Якість води. Підрахунок мікроорганізмів, що утворюють колонії. Підрахунок колоній шляхом інокуляції в живильне агарове середовище (ISO 6222:1999, IDT)

ДСТУ 3750-98 Мікробіологія ґрунту. Терміни та визначення

ДСТУ ISO 17616:2010 Якість ґрунту. Настанови щодо вибору та оцінювання методів біологічних аналізів для екотоксикологічного характеризування ґрунтів і ґрунтових матеріалів (ISO 17616:2008, IDT).

ГОСТ 17.4.4.02-84 Охрана природы. Почвы. Метод отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.

ГОСТ 29269-91 Почвы. Общие требования к проведению анализов

ДСТУ ISO 14004:2006 Системи екологічного управління. Загальні настанови щодо принципів, систем та засобів забезпечення

ДСТУ ISO 14001-97 Системы управления окружающей средой. Состав и описание элементов, руководящие указания по их применению

ДБН А.2.2-1-2003 Проектування. Склад і зміст матеріалів оцінки впливів на навколишнє середовище (ОВНС) при проектуванні і будівництві підприємств, будинків і споруд

ГОСТ 3347-91 Насосы центробежные для жидких молочных продуктов. Общие технические условия.

ГОСТ 11117-85 Сепараторы для молока. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 12027-93 Установки теплообменные с пластинчатыми аппаратами для пищевых жидкостей. Технические требования, требования безопасности.

ГОСТ 13697-68 Молокомеры. Методы и средства поверки.

ГОСТ 18113-88 Сепараторы-сливкоотделители. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 18518-80 Автоматы фасовочные для сыпучих пищевых продуктов в бумажную и картонную потребительскую тару. Общие технические условия.

ГОСТ 20258-95 Машины моечные для стеклянной тары. Общие технические требования и методы испытаний.

ГОСТ 23094-78 Жиромеры стеклянные. Общие технические условия.

ГОСТ 24740-90 Линии упаковывания жидкой пищевой продукции в стеклянные бутылки. Типы и основные параметры.

ГОСТ 24885-91 Сепараторы центробежные жидкостные. Общие технические условия.

ГОСТ 25509-82 Маслодельная промышленность. Термины и определения

ГОСТ 26582-85 Машины и оборудование продовольственные. Общие технические условия

РОЗДІЛ 5. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ПРОДУЦЕНТІВ

ГОСТ 28471-90 Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение

ГОСТ 28 5-90 Продукция микробиологическая. Правила приемки и методы отбора проб.

ГОСТ 17.4.4.02-84 Охрана природы. Почвы. Метод отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.

ГОСТ 29269-91 Почвы. Общие требования к проведению анализов

ДСТУ ISO 11266-2001 Якість ґрунту. Настанови щодо лабораторного випробування біодеградації органічних хімічних речовин у ґрунті в аеробних умовах (ISO 11266:1994, IDT)

ДСТУ ISO 14238-2003 Якість ґрунту. Біологічні методи. Визначання мінералізації азоту і нітрифікації в ґрунтах та впливу хімічних речовин на ці процеси (ISO 14238:1997, IDT)

ДСТУ ISO 14240-1-2003 Якість ґрунту. Визначання ґрунтової мікробної біомаси. Частина 1. Метод субстрат-стимульованого дихання (ISO 14240-1:1997, IDT)

ДСТУ ISO 15473:2005 Якість ґрунту. Настанови з лабораторного випробування біодеградації органічних хімічних речовин у ґрунті в анаеробних умовах (ISO 15473:2002, IDT)

ДСТУ ISO 17155:2005 Якість ґрунту. Визначення чисельності та активності ґрунтової мікрофлори із застосуванням кривих дихання (ISO 17155:2002, IDT)

ДСТУ ISO 14004-97 Системы управления окружающей средой. Общие руководящие указания по принципам управления, системам и средствам обеспечения

ДСТУ 3750-98 Мікробіологія ґрунту. Терміни та визначення

ДСТУ ISO 17616:2010 Якість ґрунту. Настанови щодо вибору та оцінювання методів біологічних аналізів для екотоксикологічного характеризування ґрунтів і ґрунтових матеріалів (ISO 17616:2008, IDT).

ГОСТ 17.4.4.02-84 Охрана природы. Почвы. Метод отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.

ГОСТ 29269-91 Почвы. Общие требования к проведению анализов

ДСТУ ГОСТ 27566:2008 Реактивы и особо чистые вещества. Метод атомно-эмиссионной спектроскопии для определения примесей химических элементов в жидкофазных веществах (ГОСТ 27566-87, IDT)

ДСТУ ГОСТ 28687:2009 Реактивы. Метод определения пероксидов в органических растворителях (ГОСТ 28687-90, IDT)

ДСТУ ГОСТ 28738:2009 Реактивы. Методы определения примеси общей серы в органических растворителях (ГОСТ 28738-90, IDT)

ДСТУ ISO 3696-2003 Вода для застосування в лабораторіях. Вимоги та методи перевірення (ISO 3696:1987, IDT)

ГОСТ 17206-96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 29269-91 Почвы. Общие требования к проведению анализов.

ДСТУ ISO 11266-2001 Якість ґрунту. Настанови щодо лабораторного випробування біодеградації органічних хімічних речовин у ґрунті в аеробних умовах (ISO 11266:1994, IDT)

ДСТУ ISO 15799:2005 Якість ґрунту. Настанови щодо встановлення екотоксикологічної характеристики ґрунтів та ґрунтових матеріалів (ISO 15799:2003, IDT)

ДСТУ ISO 16072:2005 Якість ґрунту. Лабораторні методи визначення мікробного дихання ґрунту (ISO 16072:2002, IDT)

ДСТУ ISO 17155:2005 Якість ґрунту. Визначення чисельності та активності

ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ

грунтової мікрофлори із застосуванням кривих дихання (ISO 17155:2002, IDT)

ДСТУ ISO 23753-1:2010 Якість ґрунту. Визначення дегідрогеназної активності ґрунтів. Частина 1. Метод з використанням трифенілтетразолхлориду (ISO 23753-1:2005, IDT)

ДСТУ ISO 10712-2003 Якість води. Тест на пригнічення росту *Pseudomonas putida* (тест на пригнічення розмноження клітин *Pseudomonas*) (ISO 10712:1995, IDT)

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТІВ

ДСТУ ISO 6611/IDF 94:2007 Молоко та молочні продукти. Визначення колонієутворювальних одиниць дріжджів та/чи плісені. Метод підрахування колоній, що виростили за температури 25°C (ISO 6611/IDF 94:2004, IDT)

ДСТУ ISO 6730:2006 (IDF 101:2005) Молоко. Метод підрахування колоній психротрофних мікроорганізмів, що формують колонії за температури 6,5°C (ISO 6730:2005, IDT; IDF 101:2005, IDT)

ДСТУ ISO 8553:2005 (IDF 131:2004) Молоко. Визначення кількості мікроорганізмів чашковим методом із застосуванням петлі за температури 30°C (ISO 8553:2004, IDT; IDF 131:2004, IDT)

ДСТУ ISO 13969:2005 (IDF 183:2003) Молоко та молочні продукти. Настанови щодо стандартизованого описування випробування інгібіторів мікроорганізмів (ISO 13969:2003, IDT; IDF 183:2003, IDT)

ДСТУ ISO 15174:2005 (IDF 176:2002) Молоко та молочні продукти. Визначення загальної молокозсідальної активності коагулянтів мікробного походження (ISO 15174:2002, IDT; IDF 176:2002, IDT)

ДСТУ IDF 73A:2003 Молоко і молочні продукти. Підрахунок кількості коліформ. Метод підрахунку колоній і метод визначення найімовірнішого числа за температури 30°C (IDF 73A:1985, IDT)

ДСТУ IDF 83:2003 Молоко і молочні продукти. Стандартний метод визначення термонуклеази, продукованої коагулазопозитивними стафілококами у молоці та молочних продуктах (IDF 83:1978, IDT)

ДСТУ IDF 93A:2003 Молоко і молочні продукти. Визначення *Salmonella* (IDF 93A:1985, IDT)

ДСТУ IDF 100B:2003 Молоко і молочні продукти. Визначення кількості мікроорганізмів. Метод підрахунку колоній за температури 30°C (IDF 100B:1991, IDT)

ДСТУ IDF 117B:2003 Йогурт. Визначення кількості характерних мікроорганізмів. Метод підрахунку колоній за температури 37°C (IDF 117B:1997, IDT)

ДСТУ IDF 122C:2003 Молоко і молочні продукти. Підготовка проб і розведень для мікробіологічного дослідження (IDF 122C:1996, IDT)

ДСТУ IDF 138:2003 Сухе молоко. Визначення *Staphylococcus aureus*. Методика підрахунку колоній за температури 37°C (IDF 138:1986, IDT)

ДСТУ IDF 149A:2003 Культури молочнокислих заквасок. Визначення видового складу (IDF 149A:1997, IDT)

РОЗДІЛ 7. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ХЛІБОПЕЧЕННІ, ПИВОВАРІННІ ТА ОТРИМАННІ БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ

ДСТУ 4657:2006 Дріжджі хлібопекарські. Виробництво. Терміни та визначення понять

ДСТУ 3139-95 Пивоварство. Терміни та визначення

ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТИВ

ДСТУ 3296-95 Виробництво етилового спирту з харчової сировини. Терміни та визначення

ДСТУ 2164-93 Вина виноградні. Терміни та визначення

ДСТУ 3099-95 Спирт етиловий ректифікований із меляси високоякісний.

Технічні умови

ДСТУ 3888-99 Пиво. Загальні технічні умови

ДСТУ 4181-2003 Спирт етиловий ректифікований і спирт етиловий сирець.

Правила приймання і методи випробувань

ДСТУ 4221-2003 Спирт етиловий ректифікований. Технічні умови

ДСТУ 4800:2007 Шампанське України. Технічні умови

ДСТУ 4806:2007 Вина. Загальні технічні умови

ДСТУ 4807:2007 Вина ігристі. Технічні умови

ДСТУ 4836:2007 Сидри. Загальні технічні умови

ДСТУ 4850:2007 Пиво. Методи визначення діоксиду вуглецю та стійкості

ДСТУ 4851:2007 Пиво. Методи визначення кольору

ДСТУ 4852:2007 Пиво. Методи визначення кислотності

ДСТУ 4853:2007 Пиво. Правила приймання та методи відбирання проб

ДСТУ ГОСТ 13191:2009 Вина, виноматеріали, коньяки и коньячные спирты, соки плодово-ягодные спиртованные. Метод определения этилового спирта (ГОСТ 13191-73, IDT)

ДСТУ ISO 3835-1:2006 Устаткування для виноградарства та виноробства. Словник термінів. Частина 1. (ISO 3835-1:1976, IDT)

ДСТУ ISO 3835-2:2006 Устаткування для виноградарства та виноробства. Словник термінів. Частина 2. (ISO 3835-2:1977, IDT)

ДСТУ ISO 3835-3:2006 Устаткування для виноградарства та виноробства. Словник термінів. Частина 3. (ISO 3835-3:1980, IDT)

ДСТУ ISO 3835-4:2006 Устаткування для виноградарства та виноробства. Словник термінів. Частина 4. (ISO 3835-4:1981, IDT)

ДСТУ ISO 3835-5:2006 Устаткування для виноградарства та виноробства. Словник термінів. Частина 5. (ISO 3835-5:1982, IDT)

РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОДУЦЕНТІВ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

ДСТУ 4457:2005 Сычужный фермент натуральный

ГОСТ 18663-78 Витамин В₁₂ кормовой. Технические условия

ГОСТ 7047-55 Витамины А, С, Д, В₁, В₂ и РР. Отбор проб, методы определения витаминов и испытания качества витаминных препаратов

ГОСТ 908-2004 Кислота лимонная моногидрат пищевая. Технические условия

ДСТУ ISO 8196-1:2007 Молоко. Визначення та оцінювання підсумкової точності опосередкованих методів аналізування. Частина 1. Аналітичні характеристики опосередкованих методів (ISO 8196-1:2000, IDT)

ДСТУ ISO 8196-2:2007 Молоко. Визначення та оцінювання підсумкової точності опосередкованих методів аналізування. Частина 2. Калібрування та якість контролювання в молочній лабораторії (ISO 8196-2:2000, IDT)

ДСТУ ISO 8381:2007 Продукты дитячого харчування на основі молока. Визначення вмісту жиру гравіметричним методом (контрольний метод) (ISO 8381:2000, IDT)

ДСТУ ISO 8967/IDF 134:2008 Молоко сухе та продукти із сухого молока. Метод визначення насипної щільності (ISO 8967:2005/IDF 134:2005, IDT)

ДСТУ ISO 8968-1:2005 (IDF 20-1:2001) Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 1. Метод К'ельдаля (ISO 8968-1:2001, IDT; IDF 20-1:2001, IDT)

ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ

ДСТУ ISO 8968-2:2005 (IDF 20-2:2001) Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 2. Метод із використанням блоку для спалювання (макрометод) (ISO 8968-2:2001, IDT; IDF 20-2:2001, IDT)

РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ТА УПРАВЛІННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ ПРОЦЕСАМИ

ДСТУ-Н САС/RCP 46:2008 Звід гігієнічних правил для охолоджених упакованих харчових продуктів із подовженим терміном зберігання (САС/RCP 46:1999, IDT)

ДСТУ ISO 22000:2007 Системи керування безпечністю харчових продуктів. Вимоги до будь-яких організацій харчового ланцюга (ISO 22000:2005, IDT)

ДСТУ-П ISO/TS 22003:2009 Системи управління безпечністю харчових продуктів. Вимоги до органів, що здійснюють аудит та сертифікацію систем управління безпечністю харчових продуктів (ISO/TS 22003:2007, IDT)

ДСТУ ISO 22005:2009 Простежуваність у кормових та харчових ланцюгах. Загальні принципи та основні вимоги щодо розроблення та запровадження системи (ISO 22005:2007, IDT)

ДСТУ ГОСТ 22171:2009 Анализаторы жидкости кондуктометрические лабораторные. Общие технические условия (ГОСТ 22171-90, IDT)

ДСТУ ГОСТ МЭК 61010-2-010:2004 Безпечність електричного обладнання для вимірювання, керування і лабораторного застосування. Частина 2-010. Окремі вимоги до лабораторного устаткування для нагрівання матеріалів (ГОСТ МЭК 61010-2-010-2002, IDT)

ДСТУ ГОСТ МЭК 61010-2-020:2004 Безпечність електричного обладнання для вимірювання, керування і лабораторного застосування. Частина 2-020. Окремі вимоги до лабораторних центрифуг (ГОСТ МЭК 61010-2-020-2002, IDT)

ДСТУ ГОСТ МЭК 61010-2-051:2004 Безпечність електричного обладнання для вимірювання, керування і лабораторного застосування. Частина 2-051. Окремі вимоги до лабораторного устаткування для перемішування та збовтування (ГОСТ МЭК 61010-2-051-2002, IDT)

ДСТУ ГОСТ МЭК 61010-2-061:2004 Безпечність електричного обладнання для вимірювання, керування і лабораторного застосування. Частина 2-061. Окремі вимоги до лабораторних атомних спектрометрів з термічною атомізацією та іонізацією (ГОСТ МЭК 61010-2-061-2002, IDT)

ДСТУ EN 61010-2-010:2005 Вимоги безпеки до електричного устаткування для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 2-010. Додаткові вимоги до лабораторного устаткування для нагрівання матеріалів (EN 61010-2-010:1994, IDT)

ДСТУ EN 61010-2-020:2005 Вимоги безпеки до електричного устаткування для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 2-020. Додаткові вимоги до лабораторних центрифуг (EN 61010-2-020:1994, IDT)

ДСТУ IEC 61010-1:2005 Вимоги безпеки до електричного устаткування для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 1. Загальні вимоги (IEC 61010-1:2001, IDT)

ДСТУ IEC 61010-2-051:2007 Вимоги безпеки до електричного обладнання для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 2-051. Вимоги до лабораторного обладнання для розмішування та збовтування (IEC 61010-2-051:2005, IDT)

ДСТУ IEC 61010-2-061:2007 Вимоги безпеки до електричного устаткування для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 2-061. Додаткові вимоги до лабораторних атомних спектрометрів з тепловою атомізацією та іонізацією (IEC 61010-2-061:2005, IDT)

ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ

ДСТУ ІЕС 61010-2-081:2008 Вимоги безпеки до електричного устаткування для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 2-081. Додаткові вимоги до автоматичного й напіваавтоматичного лабораторного устаткування для аналізування та інших потреб (ІЕС 61010-2-081:2001, ІДТ)

ДСТУ ІЕС/TR 61010-3-031:2007 Вимоги безпеки до електричного устаткування для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 3-031. Звіт щодо оцінювання відповідності згідно з ІЕС 61010-031:2002 (ІЕС/TR 61010-3-031:2003, ІДТ)

ГОСТ 24297-87 Входной контроль продукции. Основные положения (Вхідний контроль продукції. Основні положення)

РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНІ ДОКУМЕНТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

ДСТУ 1.2-2003 Національна стандартизація. Порядок розроблення національних нормативних документів

ДСТУ 2282-93 Система стандартів безпеки праці. Устаткування технологічне для виробництва твердих сирів. Вимоги безпеки

ДСТУ 1277-92 Сир лиманський розсольний. Технічні умови

ДСТУ 4395:2005 Сири м'які. Загальні технічні умови

ДСТУ 4420:2005 Молочна промисловість. Виробництво сиру. Терміни та визначення понять

ДСТУ 4421:2005 Сири тверді (український асортимент). Технічні умови (CODEX STAN C-11966-C-35-1978, NEQ)

ДСТУ 4503:2005 Вироби сиркові. Загальні технічні умови

ДСТУ 4554:2006 Сир кисломолочний. Технічні умови

ДСТУ 4558:2006 Сир пошехонський. Технічні умови

ДСТУ 4635:2006 Сири плавлені. Загальні технічні умови

ДСТУ 4669:2006 Сири напівтверді. Загальні технічні умови

ДСТУ 5038:2008 Сири. Визначення вмісту азоту методом К'ельдаля

ДСТУ 5052:2008 Напівфабрикати із сиру кисломолочного. Загальні технічні умови

ДСТУ 6003:2008 Сири тверді. Загальні технічні умови

ДСТУ 7065:2009 Бринза. Загальні технічні умови

ДСТУ ISO 1735:2005 Сир і плавлений сир. Гравіметричний метод визначення вмісту жиру (контрольний метод) (ISO 1735:1987, ІДТ)

ДСТУ ISO 1854:2005 Сир альбумідний. Гравіметричний метод визначення вмісту жиру (контрольний метод) (ISO 1854:1999, ІДТ)

ДСТУ ISO 2920:2005 Сир альбумідний. Визначення вмісту сухої речовини (контрольний метод) (ISO 2920:1974, ІДТ)

ДСТУ ISO 2962:2005 Сири і плавлені сири. Визначення вмісту загального фосфору спектрометричним методом молекулярної абсорбції (ISO 2962:1984, ІДТ)

ДСТУ ISO/TS 2963/IDF/RM 34:2008 Сири та сири плавлені. Визначення масової частки лимонної кислоти ферментативним методом (ISO/TS 2963:2006/IDF/RM 34:2006, ІДТ)

ДСТУ ISO 5534:2005 Сир і плавлений сир. Визначення загального вмісту сухих речовин (контрольний метод) (ISO 5534:2004, IDF 4:2004, ІДТ)

ДСТУ ISO 5943/IDF 88:2007 Сир та сири плавлені. Визначення вмісту хлориду. Метод потенціометричного титрування (ISO 5943:2004, IDF 88:2004, ІДТ)

ДСТУ ISO 9233:2005 Сир і сирні кірки. Визначення вмісту натаміцину методами спектрометричної молекулярної абсорбції і високороздільної рідинної хроматографії (ISO 9233:1991, ІДТ)

ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ

ДСТУ ISO 11816-2:2005 (IDF 155-2:2003) Молоко та молочні продукти. Визначення активності лужної фосфатази. Частина 2. Флюорометричний метод для сиру (ISO 11816-2:2003, IDT; IDF 155-2:2003, IDT)

РСТ УСССР 1791-82 Сир дієтичний. Технічні умови

ГОСТ 11041-88 Сыр российский. Технические условия.

ГОСТ 27599-88 Сыродельная промышленность. Термины и определения

ДСТУ 6031:2008 Казеїн харчовий. Технічні умови

Аборигенний (aboriginal, indigenous) [лат. *aborigines*, від *ab origine* - від початку] - організм, що тривалий час мешкає на певному місці або при певних умовах навколишнього середовища.

Абсорбент (absorbent) [лат. *absorbents* - поглинаючий] - тверде тіло або рідина, що поглинають ззовні речовини всім своїм об'ємом, вступаючи з ним в хімічну взаємодію. А. застосовують для швидкої і ефективної очищення будь-яких поверхонь і ємностей, обладнання, апаратури, захисту від протікання на підприємствах промисловості; він швидко і ефективно вбирає нафту, емульсії, водні розчини, а також агресивні рідини: кислоти, луги, фенольні сполуки, охолоджувальні емульсії і т. д. Деякі А. використовують як лікарські засоби (напр., каолін, крейда, активоване вугілля).

Автоклав (autoclave) [грец. *autos* - сам і лат. *clavis* - ключ] - герметично закритий апарат для стерилізації водяною парою при підвищеному тиску і температурі вище точки кипіння; вживається для стерилізації хімічного посуду, розчинів, середовищ, для різних технічних цілей.

Автолізат (autolysat) [грец. *autos* - сам і *lysis* - розкладання] - продукт руйнування клітин в результаті автолізу. Напр., при отриманні дріжджового А. руйнування клітинних компонентів відбувається під дією ферментів самої дріжджової клітини. Цей процес протікає у звичайних умовах або при невеликому нагріванні дріжджового осаду без поживних речовин до 50 ° С протягом 1-2 діб; при цьому близько половини всіх білків в дріжджових клітинах розщеплюється до амінокислот. Дріжджові А. мають здатність надавати харчовим продуктам присмак м'яса або посилювати такий смак, тому вони широко використовуються в харчовій промисловості для приготування різних приправ, в якості смакових добавок в готових продуктах (напр., в картопляних чіпсах). А. кормових дріжджів представляє собою білково-вітамінний концентрат, використовуваний в якості кормової добавки; А. пивних дріжджів є сировиною для виробництва біорегуляторів, які мають сприятливий вплив на метаболізм в клітинах шкіри.

Автотрофні бактерії, аутотрофний бактерії (autotrophic bacteria) [грец. *autos* - сам і *trophe* - їжа, харчування; грец. *bacterion* - паличка] - бактерії, здатні синтезувати з неорганічних речовин (двоокису вуглецю, неорганічних сполук азоту, амонію) всі необхідні для життя органічні речовини, використовуючи енергію фотосинтезу або хемосинтезу. Більшість А.Б. (крім метаноутворюючих бактерій) асимілюють CO₂ за допомогою відновного пентозофосфатного шляху.

Автохтони (autochtons) [грец. *autochthon* - тубільний, місцевий] - організми будь-яких систематичних груп і рангів (види, роди тощо), що виникли і спочатку еволюціонували саме в даному місці проживання.

Агар, агар-агар (agar, agar-agar) [малайська. *agar-agar* - водорості] - сухий екстракт з червоних водоростей родів *Gelidium* або *Gracilaria*, що складається з агарози (70%) і агаропектина (30%). У водних розчинах А. утворює щільний гель при охолодженні нижче 44°C. Застосовується в мікробіології для приготування поживних середовищ, а також у фармацевтичній, харчової та ін. галузях промисловості. Використовується в якості інкапсулюючого агента.

Адсорбція (adsorption) [лат. *ad* - на, при та *sorbeo* - поглинаю] - 1) процес поглинання речовини поверхневим шаром твердого тіла або рідини (адсорбенту); застосовується для розділення або очищення речовин (неспецифічна А.)

Аероби, аеробні організми (aerobes, aerobic organisms) [грец. *aer* - повітря і *b (ios)* - життя] - організми, що вимагають для свого життя присутності кисню. До А. відносяться переважна більшість тварин, всі рослини, а також значна частина мікроорганізмів. Серед останніх розрізняють облигатні (безумовні) А. (аерофіли) і факультативні (умовні) А., здатні виживати при незначній кількості вільного кисню і навіть без нього (за рахунок кисню нітратів, сульфатів та інших сполук). До першої групи належать, напр., оцтовокислі бактерії, до другої - дріжджі, денітрифікуючі бактерії та ін. У зв'язку з тим, що при окисленні утворюються токсичні продукти неповного відновлення O_2 , А. володіють рядом спеціальних ферментів, що забезпечують їх розкладання (каталаза, супероксиддисмутаза і ін.).

Азотобактер (*Azotobacter*) [грец. *azo (os)* - неживий і *bacter-(ion)* - паличка] - рід аеробних вільноживучих (у ґрунті і воді) азотфіксуючих бактерій (*Azotobacter*); бере участі в азотофіксації, є продуцентом ряду вітамінів, ростових речовин (ауксинів), антибіотиків. Приготований з А. препарат азотобактерин застосовується як добриво для рослин.

Азотобактерин (azotobacterin) [грец. *azo (os)* - неживий, *bacterion* - паличка і лат. - *in (e)* - суфікс, що означає «подібний»] - бактеріальне добриво, що містить вільноживучі аеробні ґрунтові мікроорганізми *Azotobacter chroococcum*, здатні фіксувати до 20 мг атмосферного азоту на 1 г використаного цукру. Внесені в якості добрива в ґрунт бактерії також виділяють біологічно активні речовини (нікотинову та пантотенову кислоти, піридоксин, біотин, гетероауксин, гіббереллін та ін.) Ці речовини стимулюють ріст рослин.

Актиноміцети (actinomycetes) [грец. *aktis (aktinos)* - промінь і *myces* - гриб] - клас мікроорганізмів, грампозитивні бактерії, що мають міцеліальні, ниткоподібні, паличкоподібні і кокковидні клітини. Для типових представників А. (вищі форми) характерна наявність добре вираженого розгалуженого септованого або несептованого одноклітинного міцелію. А. розмножуються спорами і поперечним поділом (відшнуровуванням) гіф. А. продукують різноманітні антибіотики (див. Антибіотики), антипухлинні сполуки та ін. біологічно активні речовини (особливо бактерії роду *Streptomyces*).

Алохтонне (allochtones) [грец. *allos* - інший, другий і *chthon* - земля] - організми, що населяють певну територію, але історично виникли в якомусь іншому місці.

Амілази (amylases) [грец. *amylon* - крохмаль] - ферменти класу гідролаз (див. гідролази, гідролітичні ферменти), каталізують гідроліз резервних полісахаридів (крохмаль у рослин і глікоген у тварин) шляхом розщеплення глікозидних зв'язків між 1-м і 4-м атомами вуглецю. Розрізняють альфа-А. (розщеплюють зв'язки всередині полісахариду), бета-А. (відщеплюють залишки мальтози від кінців полімеру) і глюко-А., або гамма-А. (розщеплюють полісахарид з утворенням вільної глюкози). А. синтезуються багатьма мікроорганізмами (бактерії, гриби, актиноміцети, дріжджі), тваринами і рослинами. Основними субстратами для дії А. є крохмаль, що складається з амілози і амілопектину, продукти часткового гідролізу крохмалю і глікоген. А. широко використовуються в хлібопекарській, пивоварній та спиртовій промисловості.

Анаероби, анаеробні організми (anaerobes, anaerobic organisms) [грец. *an* - від'ємна частинка, *aer* - повітря і *b (ios)* - життя] - організми, здатні жити в безкисневому середовищі; необхідний для життя кисень одержують за допомогою розщеплення кисневмісних органічних сполук. А. поширені в основному серед прокариотів; серед

еукаріот до життя без вільного O₂ (анаеробіоз) здатні лише деякі форми. Розрізняють облигатні А., що розвиваються тільки за відсутності кисню (напр., клостридії), і факультативні А., здатні жити і в його присутності (напр., кишкова паличка). Поширені в ґрунті, воді, в донних відкладах. Термін «А.» ввів Л. Пастер, який відкрив в 1861 р. бактерії маслянокислого бродіння.

Анаеростат (anaerostat) [грец. *an* – від’ємна частинка, *aer* - повітря і *stat (ikos)* - зупиняє] - прилад для створення та стабільної підтримки анаеробних умов, використовуваний для культивування анаеробів. Існують мікро і макро А. Мікро А. являє собою склянку циліндричної форми, який через вакуумну гумову прокладку закривають кришкою; на кришці розташовані вакуумметр і пристрій з клапаном для відсмоктування і нагнітання повітря і газу. Макро А. - це водяний термостат, всередині якого вмонтовано товстостінний котел циліндричної форми, що герметично закривається кришкою. На верхній стінці А. розташовані вакуумметр і два голчастих крана: один для відбирання повітря, а інший для нагнітання суміші газів.

Архебактерії (archeacteria) [грец. *archaios* - древній і грец. *bacterion* - паличка] - група мікроорганізмів з прокаріотичною організацією клітин, що суттєво відрізняються по ряду фізіолого-біохімічних властивостей від справжніх бактерій (еубактерій).

Ауксотрофи (auxotrophs) [грец. *auxo* - вирощую, збільшую і *trophe* - їжа, харчування] - мікроорганізми (бактерії, гриби або водорості), що втратили в результаті мутації (див. ауксотрофності мутація) здатність синтезувати з простіших речовин-попередників одні з речовин, необхідних для їх росту (основи, вітаміни і т. д.), в результаті чого вони не можуть рости на мінімальному середовищі; для забезпечення нормального росту А. у середовище потрібно додавати відсутню речовину (напр., амінокислота, вітамін, азотна основа та ін.).

Ацидофільні бактерії, Ацидофіли, кислотолюбиві бактерії (acidophilic bacteria, acidophiles) [лат. *acidus* - кислий і *phileo* - люблю; грец. *bacterion* - паличка] - бактерії, для нормального існування яких необхідна значна кислотність середовища (рН 4 і нижче). До А.Б. відносяться: оцтовокислі бактерії, добре ростуть при рН 3,3; молочнокислі бактерії, що живуть на молочних субстратах при рН 3,4; хемоавтотрофні бактерії, що окислюють сірку в рудах до сірчаної кислоти і розмножуються при рН 1-2. Виділяють облигатні форми, що втратили здатність рости в нейтральній області рН, і факультативні, зберегли цю здатність. Серед облигатних А. виділяються 2 фізіологічні групи: 1) бактерії, що ростуть у кислому середовищі при помірних температурах (мезофільні А.), до яких відносяться представники роду *Thiobacillus*, 2) бактерії, що ростуть у кислому середовищі при високих температурах (термофільні А.), до яких відносяться *Bacillus acidocaldarius*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Thermoplasma acidophilum*. А.Б. мають велике практичне значення, використовуються у виробництві оцтової кислоти, в молочній промисловості, при силосуванні кормів та інших процесах.

Бактеріальна маса, біомаса бактерій (bacterial mass, bacterial biomass) [грец. *bacterion* - паличка; лат. *massa* - ком, клубок] - один з інтегральних показників росту популяції бактерій. Показники Б.м.: а) щільність бактерій і б) час подвоєння. Розрізняють «сиру масу» (після центрифугування клітин) і «суху масу» (після висушування відмитого осаду при 100°C до постійної маси). Б.м. використовують для виділення біологічно активних речовин, нуклеїнових кислот і ін. Часто мікробні клітини самі по собі можуть служити кінцевим продуктом виробничого процесу.

Бактеріальний препарат (bacterial preparation) [грец. *bacterion* - паличка; лат. *praeparatus* - приготований] - препарат, в якому діючим початком є бактерії і (або) продукти їх життєдіяльності.

Бактеріальне добриво (bacterial fertilizer) [грец. *bacterion* - паличка] - препарат, що містить корисні для с.-г. рослин ґрунтові мікроорганізми, які при внесенні в ґрунт посилюють фіксацію азоту, фосфору, мінералізацію органічних речовин, покращують кореневе живлення рослин. Основою ряду Б.у. є бульбочкові бактерії з роду *Rhizobium*, які в симбіозі з бобовими культурами здатні фіксувати вільний азот атмосфери, перетворюючи його в сполуки, легкозасвоювані рослиною (нітрагін, ризоторфін), азотофіксуючі бактерії з роду *Azotobacter* (азотобактерин), мікроорганізми з роду *Bacillus*, які мають здатність перетворювати складні фосфорорганічні сполуки (нуклеїнові кислоти, нуклеопротейни і т. д.) і важко засвоювані мінеральні фосфати в доступну для рослин форму (фосфобактерин).

Безперервна культура (continuous culture) [лат. *cultus* - обробіток, оброблення] - 1) суспензійна культура клітин, що безперервно насичується в хемостаті або турбідостаті поживними речовинами за допомогою періодичного додавання свіжого живильного середовища, в якому клітини переважно знаходяться в логарифмічній фазі росту, 2) культура клітин, здатна при культивуванні до необмеженого числа подвоєння популяції; такі клітини можуть або не можуть проявляти *in vitro* властивості злоякісної трансформації. Трансформовану Н.К. називають також «перещеплюваною культурою».

Бета-лактамі антибіотики (beta-lactam antibiotics) [грец. *beta* - друга літера грец. алфавіту, позначення одного з станів речовини; лат. *lac (lactis)* - молоко; грец. *anti* - проти і *bios (biotikos)* - життя] - антибіотики, що містять у своєму складі чотиричленне беталактаміне кільце (пеніциліни, цефалоспорини, карбапенеми, монобактами); активні проти багатьох грампозитивних і грамнегативних, аеробних і анаеробних бактерій. Б-Л.А. перешкоджають утворенню пептидних містків і об'єднанню пептидгліканів клітинної стінки бактерій в єдину структуру (блокують ферменти, що здійснюють синтез клітинної стінки бактерій). Реакцію утворення зв'язку між амінокислотними залишками пептидних містків і передостаннім залишком D-аланіну бічних пептидів каталізує фермент транспептидаза. Б-Л.А., що володіють просторовою схожістю з субстратом реакції D-аланіл-D-аланином, утворюють ковалентний ацильний зв'язок з активним центром транспептидази і необоротно інгібують її, що в кінцевому підсумку призводить до загибелі бактерій в результаті осмотичного лізису.

Біокаталіз (biocatalysis) [грец. *bio (s)* - життя і *katalysis* - руйнування] - прискорення за допомогою ферментів хімічних реакцій, що протікають в живих організмах. Б. - процес високоефективний, специфічний і, на відміну від хімічного каталізу, відбувається в більш «м'яких» умовах, тобто умовах, властивих живому організму (температурі, тиску, реакції середовища і т. д.). Одну з провідних ролей Б. в промисловості займають процеси окислювальної біотрансформації органічних сполук, у тому числі вуглеводневої сировини, напр. у виробництві оптичних ізомерів епоксидів ненасичених вуглеводнів, які застосовуються в тонкому органічному синтезі при виробництві біологічно активних речовин, а також рідких кристалів для електроніки.

Біоконверсія (bioconversion) [грец. *bio (s)* - життя і лат. *conversio* - зміна, перетворення] – хімічна реструктуризація сирого матеріалу за допомогою біокаталізу (див. біокаталізу). Напр., один з напрямків Б. полягає в перетворенні нехарчової сировини (відходи целюлозно-паперової промисловості та сільського господарства) за

допомогою ферментів і мікроорганізмів з метою отримання вуглеводів, біологічно активних речовин та біопалива.

Біореактор, ферментер (bioreactor, fermenter) [грец. *bio* (*s*) - життя, лат. *re--* - приставка, що позначає повторність дії і *actio* - дія] - апарат для культивування мікроорганізмів або еукаріотичних клітин, в якому протікають ферментативні біохімічні реакції за участю живих клітин або клітинних екстрактів. Основними елементами Б. є подвійні стінки, проміжок між якими заповнюється охолоджуючою або нагріваючою рідиною, вхідні отвори для газових і рідких потоків, система контролю за складом живильного середовища та умовами всередині реактора (температура, вміст кисню та ін.) Звичайний Б. представляє собою закритий циліндричний резервуар, в якому механічно перемішуються середовище і мікроорганізми. Температура регулюється за допомогою води або пари, що пропускаються по трубках теплообмінника. У тих випадках, коли ферментативний процес вимагає багато кисню, через середовище прокачують повітря, іноді насичене киснем. Деякі продукти, навпаки, утворюються в безкисневих умовах, і в цих випадках використовуються Б. іншої конструкції. Так, пиво варять при дуже низьких концентраціях розчиненого кисню, при цьому вміст Б. не аерується і не перемішується. Розрізняють такі основні типи Б.: лабораторні (ємністю 0,5-100 л), пілотні (ємністю 100 л), промислові ємністю (10-100 м³) і більше. Б. використовується для отримання великих кількостей мікробної біомаси при виробництві антибіотиків, ферментів, вітамінів, амінокислот, білково-вітамінних концентратів та інших біологічно активних речовин.

Біосурфактанти (biosurfactants) [грец. *bio* (*s*) - життя і англ. *surfactant* - поверхнево-активна речовина] - поверхнево-активні речовини бактеріального походження з вираженими мультифункціональними властивостями. Б. отримують біотехнологічним шляхом у процесі вирощування різних мікроорганізмів: бацил, грибів, псевдомонад. За хімічною будовою вони дуже різноманітні, але мають спільні переваги - безпечні з екологічної точки зору. Використовуються для створення нових фармакологічних засобів з високою біологічною (протизапальною, імуномодулюючою) активністю, для відновлення нафтозабруднених земель та ін. Напр., рамноліпіди, віднайдені *Pseudomonas aeruginosa*, надають толерантність до важких металів і посилюють деградацію вуглеводнів нафти.

Біфідобактерії (bifidobacteria) [лат. *bifidus* - розділений надвоє і грец. *bacterion* - паличка] - рід бактерій з сімейства *Actinomycetaceae*, складає 80-90% кишкової флори дітей, які знаходяться на грудному вигодовуванні, і молодняка с.-г. тварин у підсосному періоді. Б. - поліморфні анаеробні нерухомі грампозитивні палички, не утворюють спор, часто дихотомічно розгалужені; для людини непатогенні, є антагоністами ряду патогенних мікроорганізмів, у т. ч. гнильних бактерій, сприяють перетравленню вуглеводів, здійснюють синтез вітамінів К і групи В. Перші Б. виділив Г. Тіссер в 1899 р.

Бродіння (zymosis) - анаеробний метаболічний процес перетворення органічних речовин (вуглеводи, спирти, органічні кислоти, амінокислоти), в результаті якого організми отримують енергію, необхідну для їх життєдіяльності, утворюються спирти, органічні кислоти, ацетон, СО₂ та ін. сполуки. Розрізняють безліч видів Б.: спиртове (з утворенням спирту і вуглекислого газу), яке викликають дріжджоподібні організми і деякі плісняві гриби; маслянокисле (супроводжується утворенням масляної кислоти), яке здійснюється в більшості випадків облигатними анаеробами і викликає псування консервованих продуктів; метанове (з утворенням метану), яке здійснюється в основному мікроорганізмами, що розщеплюють клітковину (напр., при очищенні

стічних вод); молочнокисле (супроводжується утворенням молочної кислоти), яке відбувається за участю мікроорганізмів і широко використовується при виготовленні кисломолочних та деяких інших харчових продуктів. Б. - еволюційно більш рання і енергетично менш вигідна форма добування енергії з поживних речовин. Багато видів Б. використовуються в харчовій та мікробіологічній промисловості для отримання спиртів, органічних кислот і ін. речовин. Мікробна природа Б. була відкрита Л. Пастером в 1857 р.

Відкрита безперервна культура (open continuous culture) [лат. cultus - обробіток, оброблення] - культура клітин, в якій приплив свіжого живильного середовища урівноважений відтоком відповідного обсягу культури.

Від'ємно-доливна культура, періодична культура (batch culture) [лат. cultus - обробіток, оброблення] - закрыта система культури мікроорганізму або суспензії клітин зі специфічним типом поживних речовин, температури, тиску та аерації, зростаюча обмежений час до повного використання всіх продуктів харчування. В.-д.к. протилежна безперервній культурі.

Вторинні метаболіти, ідіоліти (secondary metabolite, idiolite) [грец. metabole - зміна] - речовина, що є продуктом метаболічних процесів, що протікають в мікробних або рослинних клітинах, яка являє собою низькомолекулярну сполуку, що не є необхідною для нормального росту організмів (антибіотики, алкалоїди, пігменти, гормони росту рослин, токсини та ін.) Мікроорганізми, що виробляють В.М., спочатку проходять стадію швидкого росту, під час якої синтез вторинних речовин незначний. У міру уповільнення росту через виснаження одного або декількох необхідних поживних речовин в культуральному середовищі мікроорганізми переходять в ідіофазу (стаціонарна фаза); В.М. синтезуються саме в цей період. В.М. виробляють обмежену кількість таксономічних груп (в основному нитчастими і спороутворюючими бактеріями, грибами) і часто являють собою суміш близькоспоріднених сполук, що відносяться до однієї і тієї ж хімічної групи. Оскільки більшість В.М. є біологічно активними сполуками, вони становлять великий практичний інтерес. Серед них присутні речовини, що володіють антимікробною активністю, специфічні інгібітори ферментів, ростові фактори; багатьом В.М. притаманна фармакологічна активність. У медицині В.М. застосовуються значно ширше і частіше, ніж первинні метаболіти. Отримання такого роду речовин послужило основою для створення цілого ряду галузей мікробіологічної промисловості. Першим став мікробіологічний спосіб отримання пеніциліну, розроблений в 1940-х р., який заклав фундамент сучасної промислової біотехнології. Перші вітчизняні зразки пеніциліну отримані З. Єрмольєвою в 1942 р.

Вихровий біореактор (vortical bioreactor) [грец. bio (s) - життя, лат. re-- приставка, що позначає повторність дії і actio - дія] - біореактор, в якому переміщування культурального середовища здійснюється шляхом створення в ньому тривимірного руху типу «обертвого вихрового кільця» - квазістаціонарного потоку з осью протитечією, генерованою аеруючим газовим вихором за рахунок перепаду тиску над поверхнею і сили тертя повітряного потоку об поверхню суспензії; аеруючий газовий вихор формується встановленим над поверхнею суспензії відцентровим активатором.

Галофіли (halophils) [грец. hals (halos) - сіль і phileo - люблю] - організми, що мешкають тільки в умовах високої солоності (у морях, солоних озерах, засолених ґрунтах і т. п.). У бактеріях-Г. у великій кількості міститься бактеріородопсин (див. Бактеріородопсин). Екстремальні Г. розвиваються в середовищах з концентрацією

хлориду натрію 15-32% (напр., бактерії родів *Halobacterium* і *Halococcus*). Рослини Г., що ростуть на солончаках і солонцях, називають галофіти (див. галофіти).

Гетеротрофні бактерії (heterotrophic bacteria) [грец. *heteros* - інший, різний і *trophe* - харчування; грец. *bacterion* - паличка] - бактерії, які використовують як джерело енергії та вуглецю органічні сполуки. Цим вони відрізняються від фотосинтезуючих бактерій, асиміляційні в якості джерела вуглецю CO₂. Переважна кількість відомих видів бактерій відноситься до Г.Б., серед яких є як аероби, так і анаероби. Залежно від здатності до зростання на багатій або бідній органічною речовиною середовищі Г.Б. ділять на дві групи - евтрофів і оліготрофів. Багато Г.Б. утилізують цукри, спирти і органічні кислоти, однак існують спеціалізовані Г.Б., здатні розкладати також целюлозу, лігнін, хітин, кератин, вуглеводні, феноли та інші речовини. Г.Б. широко поширені в ґрунті, воді і ґрунті водойм, в харчових продуктах і т. д. Вони беруть активну участь у кругообігу речовин у природі, здійснюючи процеси ремінералізації, завдяки чому біогенні сполуки знову стають доступними для первинних продуцентів.

Глибинна культура мікроорганізмів (submerged culture) [лат. *cultus* - обробіток, оброблення; грец. *mikros* - маленький і лат. *organismus* - живе тіло, жива істота] - культура мікроорганізмів, що вирощується у глибині (в обсязі) рідкого живильного середовища при енергійній аерації в герметично закритих апаратах. У порівнянні з поверхневим способом культивування Г.к.м. має ряд переваг: скорочення виробничих площ, стерильність, підвищення продуктивності, регулювання параметрів в широких межах, більш раціональне використання сировини, створення умов для переходу до безперервного способу.

Десорбція (desorption) [лат. *de--* - приставка, що означає відділення, видалення, знищення, скасування чогось, і *sorbe* - поглинати] - видалення сорбованої речовини з адсорбенту або абсорбенту Д. відбувається при зменшенні концентрації сорбуючої речовини в середовищі, а також при підвищенні температури. Д. застосовують, напр., для вилучення з адсорбентів поглинутих ними газів, пари або розчинених речовин, а також для їх регенерації. Практично при Д. через шар адсорбенту продувають гарячий водяний пар, повітря або інертні гази, що захоплюють раніше поглинену речовину, або промивають шар адсорбенту різними реагентами, які розчиняють адсорбовані речовини. Швидкість Д. залежить від температури, природи і швидкості потоку десорбуючого газу або розчинника, а також від особливостей структури адсорбенту. Д. - один з обов'язкових циклів при адсорбції в апаратах періодичної дії. Д. у адсорберах з рухомих адсорбційним шаром протікає безперервно.

Дезінтеграція клітини (cell disin-tegration) [франц. *des-*, від лат *de--* - приставка, що позначає знищення, видалення, скасування чогось, і лат. *integratio* - відновлення, заповнення, від *integer* - цілий] - руйнування клітин за допомогою механічного, фізичного, хімічного або іншого впливу з метою виділення їх вмісту (напр., екстрагування нуклеїнових кислот, білків та ін.).

Діаліз (dialysis) [грец. *dialysis* - розкладання, відділення] - процес поділу молекул за розміром на основі їх різної здатності до дифузії через напівпроникну мембрану; використовується для очищення високомолекулярних речовин від низькомолекулярних домішок (напр., білків від солей), для видалення з крові токсичних речовин та ін.

Дріжджі (yeast) - позатаксономічна група одноклітинних грибів, які втратили міцеліальну будову у зв'язку з переходом до проживання в рідких і напіврідких багатих органічною речовиною субстратах; об'єднує близько 1500 видів, що відносяться до

аскомицетів і базидіомицетів. Д. розмножуються брунькуванням, рідше - спорами або простим поділом клітини; в деяких видів встановлений статевий процес. В анаеробних умовах дріжджі можуть використовувати як джерело енергії тільки вуглеводи, причому в основному гексози і побудовані на їх основі олігосахариди. Практичне використання в біотехнологічних процесах отримали в основному істинні (спороутворюючі) Д., що розмножуються статевим способом (напр., сахаромицети), які зазвичай не патогенні для людини. Так, пекарські та пивні Д. (*Saccharomyces cerevisiae*) широко використовують для хлібопечення і пивоваріння, *Kluyveromyces fragilis* здійснює зброджування лактози, *Saccharomycopsis lipolytica* деградує вуглеводні і використовується для отримання білкової маси. Знаходять застосування і деякі дейтеромицети (недосконалі гриби): *Candida utilis* росте в сульфідних стічних водах (відходи паперової промисловості); *Trichosporon cutaneum*, окислює численні органічні сполуки, включаючи деякі токсичні (напр., фенол), відіграє важливу роль в системах аеробного переробки стоків; *Trichosporon cutaneum* синтезує астаксантин – каротиноїд, який надає м'якості форелі та лосося, вирощуваних на фермах, характерний помаранчевий або рожевий колір. Промислові Д. зазвичай не розмножуються статевим шляхом, не утворюють спор і є поліплоїдними. Останнім пояснюється їх сила і здатність швидко адаптуватися до змін середовища культивування.

Ерліфтний біореактор (airlift bioreactor) [англ. *air* - повітря і *lift* - піднімати; грец. *bios* - життя, лат. *re--* приставка, що позначає повторність дії, і *actio* - дія] - циліндричний біореактор (див. Біореактор, ферментер), в якому перемішування здійснюється потоком газу, що подається через середовище знизу.

Інокулят (inoculum) [лат. *inoculatio* - щеплення] - 1) визначена за обсягом і масою доза матеріалу (культури клітин, вакцини, патологічного субстрату та ін., яка вводиться в біологічну систему (тваринний організм, живильне середовище, культуру клітин та ін. Процес введення І. називають інокуляцією, 2) суспензія клітин, є вихідною для нарощування клітинної культури і використовується для початкового посіву на живильне середовище; 3) чиста культура мікроорганізмів, що вводиться в якості біодобрива або засобу біологічної боротьби з шкідниками.

Кобаламін, вітамін В₁₂ (cobalamine, vitamin B₁₂) [англ. *cobalt* - кобальт, від нім. *Kobold* - гірський дух, гном, нібито заважає працювати гірникам, і англ. *amino* - група NH₂, від *ammonia* - аміак, від лат. *sal ammoniacus* - сіль Аммона, нашатир] - водорозчинний кобальт, який містить вітамін, близький за структурою до гемоглобіну. У формі коферменту бере участь у ферментативних реакціях переносу одновуглецевих фрагментів, в обміні метіоніну та ін. сполук, у взаємодії з фолієвою кислотою прискорює розвиток еритроцитів, необхідних для мієлінізації нервових волокон. К. синтезується мікроорганізмами, міститься в продуктах тваринного походження (печінка, нирки, рибне борошно). Для промислового виробництва використовуються штами *Propionibacterium freudenreichii*, *P. shermanii* і *Pseudomonas denitrificans*. У людини і тварин недолік К. призводить до розвитку злоякісної макроцитарної мегалобластичної анемії. К. виділений з печінки в кристалічному вигляді в 1948 р.

Ксантан (xanthan) [від лат. родового назви бактерій *Xanthomonas* і лат. *-An* (e) - суфікс, використовуваний для назви вуглеводнів] - позаклітинний полісахарид (див. Полісахариди, глікани) бактерії *Xanthomonas campestris*, утворений в процесі ферментації глюкози і сахарози, який має високу в'язкість в розчині. Ксантан має здатність до стабілізації розчинів (утриманню часток у суспензії), що має велике значення для запобігання утворення осаду при використанні його в продуктах з тривалим терміном зберігання. Застосовується для вилучення нафти із зникаючих

родовищ (при закачуванні в пласти під підвищеним тиском вивільняє краплі нафти з усіх тріщин і поглиблень нафтоносних порід). К. використовується також як загущувач при виготовленні медичних гелів і косметичних засобів. Виявлено вперше в кінці 50-х рр. А. Джинсом з співавт.

Культура мікроорганізмів (culture of microorganism) [лат. *cultus* - обробіток, оброблення; грец. *mikros* - маленький і лат. *organismus* - живе тіло, жива істота] - популяція життєздатних мікроорганізмів, зазвичай одного виду (чиста культура), але зрідка двох-або полівидова (змішана - первинно виділена з природних джерел), вирощена на певній живильному середовищі і призначена для промислового, с. - х. або медичного застосування. Розрізняють безліч різних типів К.м.: елективну культуру, в якій переважно розвивається один вид мікроорганізмів, змішану культуру та ін.

Культивування (cultivation) [лат. *cultus* - обробіток, оброблення] - вирощування мікроорганізмів, тварин або рослинних клітин, тканин або органів в штучних умовах на штучних середовищах.

Культуральна рідина (culture broth) [лат. *cultus* - обробіток, оброблення] – рідке середовище, одержуване при культивуванні різних про-і еукаріотів *in vitro* і містить залишкові поживні речовини і продукти метаболізму цих клітин.

Логарифмічна (експоненціальна) фаза росту (logarithmic growth phase, log growth phase, exponential growth phase) [грец. *logos* - ставлення і *arithmos* - число; грец. *phasis* - поява] - фаза (стадія) росту культури клітин, що характеризується експоненціальним (із зростаючим прискоренням, експоненціальна функція: $y = e^x$) зростанням числа клітин в часі. Напр., мікроорганізми, що діляться кожні 2 год., збільшуються в числі: 1, 2, 4, 8, 16, 32 і т. д. з двогодинним періодом подвоєння. На цьому етапі оболонка клітин стоншена («незрілі» клітини), що підвищує їх пошкоджуваність зовнішніми впливами. У Л.ф.р. утворюються продукти (див. Первинний метаболіт), життєво важливі для росту мікроорганізмів: амінокислоти, нуклеотиди, білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи і т. д. Л.ф.р. переходить в стаціонарну фазу росту (див. Стаціонарна фаза росту).

Меляса (molasses) [франц. *melasse* - кормова патока] - побічний продукт бурякоцукрового виробництва, один з видів сировини мікробіологічної промисловості, що використовують як компонент живильних середовищ при культивуванні мікроорганізмів.

Мікробні інсектициди (microbial insecticides) [грец. *mikros* - малий, маленький і *bios* - життя; лат. *insectum* - комаха і *caedere* - вбивати, знищувати] - речовини, що знищують комах-шкідників с.-г. рослин, які виділяються вірусами, грибами і найпростішими. Найбільш зручними М.І. вважаються спороутворюючі бактерії. М.і. високо специфічні і діють тільки на певних шкідливих комах, залишаючи неушкодженими корисні. Патогенність мікроорганізмів викликана дією певних токсинів, тому розвиток стійкості до біопрепаратів у комах не відбувається. Важливо, що М.п. піддаються біодеградації. Мікроорганізми можуть регулювати ріст рослин і тварин, пригнічувати захворювання. Деякі бактерії змінюють кислотність і солоність ґрунту, інші продукують сполуки, що зв'язують залізо, треті - виробляють регулятори росту і т. д. Як правило, мікроорганізмами інокулюють насіння та / або рослини перед їх посадкою.

Мембранний біореактор (membrane bioreactor) [лат. *membrane* - шкірка, перетинка; грец. *bios* - життя, лат. *re-* - приставка, що позначає повторність дії, і *actio* - дія] -

біореактор, в якому клітини ростуть на чи за напівпроникною мембраною, що пропускає поживні речовини, але затримує самі клітини.

Мікробний антагонізм (microbial antagonism) [грец. *mikros* - малий, маленький і *bios* - життя; грец. *antagonisma* - суперечка, боротьба] - пригнічення росту одного мікроба іншим, одна з форм взаємин між мікроорганізмами в асоціаціях. Антагоністичні властивості притаманні багатьом ґрунтовим споровим і гнильним бактеріям, актиноміцетам, грибам (базидіальним, сумчастим та ін.) Механізм антагоністичної дії мікробів може бути пов'язаний з різними причинами: утворенням токсичних продуктів метаболізму, антибіотиків.

Мікробіологічний синтез (microbiosynthesis) [грец. *mikros* - малий, маленький і *bios* - життя; грец. *synthesis* - з'єднання, поєднання, складання] - спосіб отримання хімічних сполук, біологічно активних речовин та ін. продуктів, заснований на біологічних властивостях, властивих мікробним клітинам. При М.с. складні речовини утворюються з простіших в результаті функціонування ферментних систем мікроорганізмів. Використовувані для М.с. мікроорганізми (бактерії, гриби) мають здатність розмножуватися з великою швидкістю і здійснювати синтез надлишкової кількості певних продуктів, що перевищує потреби мікробної клітини. Існує кілька сотень видів мікроорганізмів, що синтезують продукти або здійснюють реакції, корисні для людини, які виділені з природних джерел чи отримані в результаті мутагенезу та селекції, а також за допомогою методів генної інженерії. В якості сировини для М.с. органічних сполук застосовують дешеві джерела азоту (напр., нітрати або солі амонію) і вуглецю (напр., вуглеводи, органічні кислоти, спирти, жири, вуглеводні, у т. ч. газоподібні). М.с. зазвичай здійснюють у ферментерах. Мікроорганізми служать важливим джерелом білка, який вони синтезують в 10-100 тис. раз швидше, ніж тварини. Спектр речовин, одержуваних за допомогою М.с., вельми широкий: ферменти, антибіотики, нуклеозидфосфати, амінокислоти, вітаміни, алкалоїди, гібереліни, білково-вітамінні препарати та ін. Напр., за допомогою М.с. отримують фермент глюкоізомеразу (див. Глюкоізомеразу), використовуваний для ізомеризації глюкози у фруктозу; утворюється глюкозо-фруктозний сироп, який використовують у харчовій промисловості замість сахарози. Шляхом М.с. здійснюють отримання численних рекомбінантних білків, що володіють фармакологічною активністю (ген гормону росту людини, інсулін, фактори згортання крові, еритропоетин, інтерферони та ін.) До числа продуктів М.с. відносяться також деякі засоби захисту рослин (напр., бактеріальні препарати, що викликають загибель шкідливих комах) і бактеріальні добрива.

Мінімальне середовище (minimal medium) [лат. *minimus* - найменший] - 1) мікробіологічне середовище, що містить тільки ті речовини, які необхідні для росту та репродукції прототрофних, але не ауксотрофних мікроорганізмів; 2) середовище для культивування еукаріотичних клітин, що містить мінімальну кількість компонентів.

Молочнокислі бактерії (lactic acid bacteria) [грец. *bakterion* - паличка] - грампозитивні бактерії, до яких відносяться представники родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc* і *Streptococcus*. М.б. не утворюють спор, не чутливі до кисню. Гетероферментативні М.б. роду *Leuconostoc* перетворюють вуглеводи в молочну кислоту (див. Молочна кислота), етанол і вуглекислий газ. Гомоферментативні бактерії роду *Streptococcus* продукують тільки молочну кислоту, а бродіння, здійснюване представниками роду *Lactobacillus*, дозволяє отримати поряд з молочною кислотою ряд різноманітних продуктів.

Одиниця біологічної активності (unit of biological activity) [грец. *bios* - життя і *logos* - слово, вчення; лат. *activus* - діяльний] - умовна одиниця, використовується зазвичай для вираження величини біологічної активності антибіотиків. За О.б.а. приймають мінімальну кількість антибіотика, здатну пригнічувати розвиток чи затримати ріст стандартного штаму тест-мікроба в певному обсязі живильного середовища. Напр., О.б.а. пеніциліну - мінімальна кількість препарату, що здатна затримувати ріст золотистого штаму стафілококів в 50 мл поживного бульйону. О.б.а. використовується також для вираження активності токсинів, факторів росту та інших біологічно активних речовин.

Оцтовокислі бактерії (acetic bacteria) [грец. *oksos* - кисле вино; грец. *bakterion* - паличка] - грамнегативні аеробні еубактерії (див. Аероби, аеробні організми), представлені родами *Gluconobacter* і *Acetobacter*. О.б. окислюють одно-і багатоатомні спирти. Напр., вони перетворюють етиловий спирт в оцтову кислоту, а оцтову кислоту - у вуглекислий газ і воду. На поверхні рідких поживних середовищ О.б. утворюють плівку, на щільних середовищах - великі, гладкі, блискучі, слизові, безбарвні колонії; зустрічаються в природі на фруктах і овочах. Застосовують для промислового отримання оцту з вина або розведеного спирту, а також при синтезі вітаміну С для окислення сорбіту в сорбозу. Викликають прокисання вина, пива і деяких харчових продуктів.

Періодичне культивування (batch culture process) [грец. *periodos* - кругообіг; лат. *cultus* - обробіток, оброблення] - культивування мікроорганізмів або еукаріотичних клітин в накопичувальному (статичному) режимі. Протягом циклу культивування поживні речовини в середовище додатково не вводяться, продукти обміну не видаляються; коли вміст цільового продукту досягає максимуму, процес припиняють.

Петлевий біореактор (loop bioreactor) [грец. *bios* - життя, лат. *ge--* - приставка, що позначає повторність дії, і *actio* - дія] - ферментер, в якому матеріал циркулює між більшим і меншим за розмірами судинами або по петлях труб. Циркуляція допомагає змішувати матеріали та забезпечує добрий для ферментації розподіл газів у рідині. П.б. використовується, зокрема, для фотосинтетичної ферментації, при якій фотосинтезуючі організми пропускаються через систему невеликих прозорих труб, що забезпечує їм оптимальний доступ до світла.

Первинний метаболіт (primary metabolite) [грец. *metabole* - зміна] - речовина біологічного походження, що накопичується у всіх або принаймні в більшості організмів у результаті сукупності біохімічних реакцій. Біополімерні П.м. з різних організмів, незважаючи на один і той же план будови і подібні біологічні функції, відрізняються один від одного в основному послідовністю, що утворюють ці речовини мономерів. Чим ближче філогенетична спорідненість організмів, тим більше схожості в їх біополімерних молекулах. До П.м. відносяться ферменти, структурні білки, амінокислоти, нуклеїнові кислоти, ліпіди та ін. При рості мікроорганізмів у культурі П.м. накопичуються в логарифмічній фазі (див. Логарифмічна (експоненціальна) фаза росту). Багато П.м. представляють цінні для практики речовини. Так, глютамінова кислота (її натрієва сіль) входить до складу багатьох харчових продуктів; лізин використовується як харчова добавка; фенілаланін є попередником замітника цукру аспартама. П.м. синтезуються природними мікроорганізмами в кількостях, необхідних лише для задоволення їхніх потреб. Тому завдання промислових мікробіологів полягає у створенні мутантних форм мікроорганізмів - надпродуцентів відповідних речовин. Напр., отримані

мікроорганізми, які синтезують амінокислоти до концентрації 100 г / л (для порівняння: організми дикого типу накопичують амінокислоти в кількостях, що обчислюються міліграмами).

Прототрофи (prototroph) [грец. *protos* - перший і *trophe* - їжа, харчування] - організми, здатні синтезувати складні речовини з обмеженого числа простих сполук і тому ростуть на мінімальному середовищі. До П. відносяться більшість бактерій, для яких джерелом вуглецю є цукор, дріжджі, а також зелені рослини, які використовують двоокис вуглецю.

Стационарна фаза росту (stationary growth phase) [лат. *stationarius* - нерухомий; грец. *phasis* - поява] - плато на кривій росту клітин в штучних умовах після логарифмічної фази росту. У С.ф.р. число клітин залишається константним, так як нові клітини утворюються з тією ж швидкістю, з якою гинуть старі клітини. У С.ф.р. деякі мікроорганізми (в основному нитчасті бактерії, гриби і спороутворюючі бактерії) синтезують речовини, що не утворюються в логарифмічній фазі.

Середньолетальна доза, LD₅₀ (median lethal dose, LD50) [лат. *lethalis* - смертельний; грец. *dosis* - порція] - доза токсичного агента (бактерій, вірусів, токсинів та ін.) або радіації, необхідна для того, щоб загинула половина клітин, що ростуть в культурі, або членів випробуваної популяції. Звичайно вказується в одиницях ваги речовини на одиницю ваги випробуваного суб'єкта. Напр., для вимірювання цієї дози у тварин, стандартизованих по ряду параметрів (вид, порода, лінія, маса, вік, іноді стать), вводять різні дози досліджуваного штаму або токсину і через певний час визначають здійснюваний ними летальний ефект.

Турбідостат (turbidostat) [лат. *turbid* (us) - мутний і грец. *stat* (ikos) - зупиняє] - установка для безперервного гомогенного культивування мікроорганізмів і культур клітин, в якій щільність біомаси підтримується на певному рівні за допомогою нефелометруючого пристрою, що регулює швидкість подачі свіжої середовища та поступового видалення надлишку біомаси. При засіві в Т. змішаної культури мікроорганізмів автоматично відбирається найбільш швидкозростаючий вид.

Ферментація (fermentation) [лат. *fermentum* - закваска] - процес біохімічної переробки органічної сировини за допомогою мікроорганізмів, окремих ферментів або їх комплексів. Ф. являє собою сукупність послідовних операцій від внесення в заздалегідь приготовлену та термостатоване середовище інокулята до завершення процесів росту, біосинтезу або біотрансформації. Для проведення Ф. використовуються спеціальні біореактори. Окремий випадок Ф. - бродіння.

Флотація (flotation) [франц. *flottation*, від *flotter* - плавати на поверхні води] - спосіб виділення (збагачення) клітин з мікробної суспензії за допомогою обробки її органічними розчинниками (флотореагент), у яких питома щільність менше води. Ф. заснована також на властивості клітин концентруватися на поверхні розділу рідкої і газової фаз емульсії, яку отримують безперервним продуванням повітря через суспензію. Ф. - один з елементів технології одержання мікробних препаратів; її використовують, напр., для виявлення мікобактерій в мокроті або інших матеріалах. Крім того, Ф. є одним з головних методів збагачення корисних копалин. З її допомогою збагачуються всі мідні, молібденові і свинцево-цинкові руди, значна частина берилієвих, вісмутових, залізних, золотих та ін. руд. За допомогою Ф. можна розділяти також водорозчинні солі, зважені в їх насичених розчинах. Ф. застосовують також для очищення води від органічних речовин (нафти, масел та ін.)

Ф. використовують в хімічній, харчовій та ін. галузях для прискорення відстоювання, виділення твердих суспензій і емульгування органічних речовин, очищення промислових стоків та ін.

Фототрофні (фотосинтезуючі) бактерії (phototrophic bacteria, photosynthetic bacteria) [грец. *phos (photos)* - світло і *trophe* - їжа, живлення; грец. *bacterion* - паличка] - бактерії, які в якості джерела енергії використовують сонячне світло. Основним джерелом вуглецю в одних випадках є вуглекислий газ (фотоавтотрофи), в інших - органічні кислоти (фотогетеротрофи). До Ф.Б. відносяться пурпурні і зелені бактерії, ціанобактерії, прохлорофіти і деякі галобактерії. Фотосинтез у всіх Ф.Б. (за винятком галобактерій) відбувається за участю хлорофілів. Фотосинтетичний апарат Ф.Б. складається з трьох основних компонентів: 1) світлозбиральних пігментів, що поглинають енергію світла і передають її в реакційні центри, 2) фотохімічних реакційних центрів, де відбувається трансформація електромагнітної форми енергії в хімічну, 3) фотосинтетичних електронтранспортних систем, що забезпечують перенесення електронів, сполучений з запасанням енергії в молекулах АТФ. У фотохімічній реакції беруть участь, як правило, хлорофіли або бактериохлорофіли α в модифікованій формі. Ці ж види хлорофілів, поряд з пігментами інших типів (фікобіліпротеїнів, каротиноїди) виконують функцію антени. У деяких пурпурних бактерій, що містять тільки бактериохлорофіл b , він виконує обидві функції. Деякі Ф.Б. отримали практичне використання, напр. азотфіксируючі ціанобактерії застосовують для підвищення родючості рисових полів, пурпурні бактерії і ціанобактерії культивують у промислових масштабах для одержання кормового білка і т. д.

Хемосинтезуючі бактерії (chemosynthetk bacteria) [грец. *chemeia* - хімія і *synthesis* - сполука, складання; грец. *bakterion* - паличка] - бактерії, які здійснюють хемосинтез. Х.б. не є єдиною в таксономічному відношенні групою, а систематизуються в залежності від окислюючого неорганічного субстрату. Аеробні Х.б. (Водневі, нітрифікуючі, тіонові та ін.) засвоюють CO_2 так само, як при фотосинтезі; анаеробні Х.б. відновлюють сполуки сірки і CO_2 . Х.б. мають важливе значення для сільського господарства: нітрифікуючі ґрунтові бактерії утворюють нітрати з амонію, сірчані бактерії беруть участь в утворенні в ґрунті доступних для рослин сульфатів, метанутворюючі бактерії використовуються для отримання біогазу з органічних відходів; відіграють важливу роль у біогеохімічних циклах в біосфері.

Хемостат (chemostat) [грец. *chemeia* - хімія і *statikos* - зупиняє] - апарат, що використовується для вирощування бактерій і культур клітин, в якому автоматично регулюється видалення частини культури і надходження свіжого живильного середовища; конструкція Х. передбачає можливість зміни окремих параметрів культивування з метою оцінки їх впливу на бактеріальну культуру. Один з компонентів живильного середовища в Х. лімітується, що забезпечує постійний експоненціальний ріст популяції і дозволяє регулювати його швидкість (субстратне лімітування). Нестача однієї з живильних речовин призводить до уповільнення швидкості росту. Для усунення цього недоліку застосовують апарати (турбідостати), в яких надходження свіжої живильного середовища автоматично регулюється фотонейрометричним способом.

Чиста культура (pure culture) [лат. *cultus* - обробіток, оброблення] - культура мікроорганізмів, що містить лише один біологічний вид і не містить будь-яких інших або гібридних форм.

Штам (strain) [нім. Stamm - стовбур, основа] - чиста культура одного виду мікроорганізмів (або вірусів), виділена з певного джерела або отримана в результаті мутації, що володіє специфічними фізіолого-біохімічними ознаками; різні Ш. одного і того ж виду мікроорганізму можуть розрізнятися за рядом властивостей, напр. вірулентністю, чутливістю до антибіотиків, продуктивністю та ін.

ДОДАТКИ

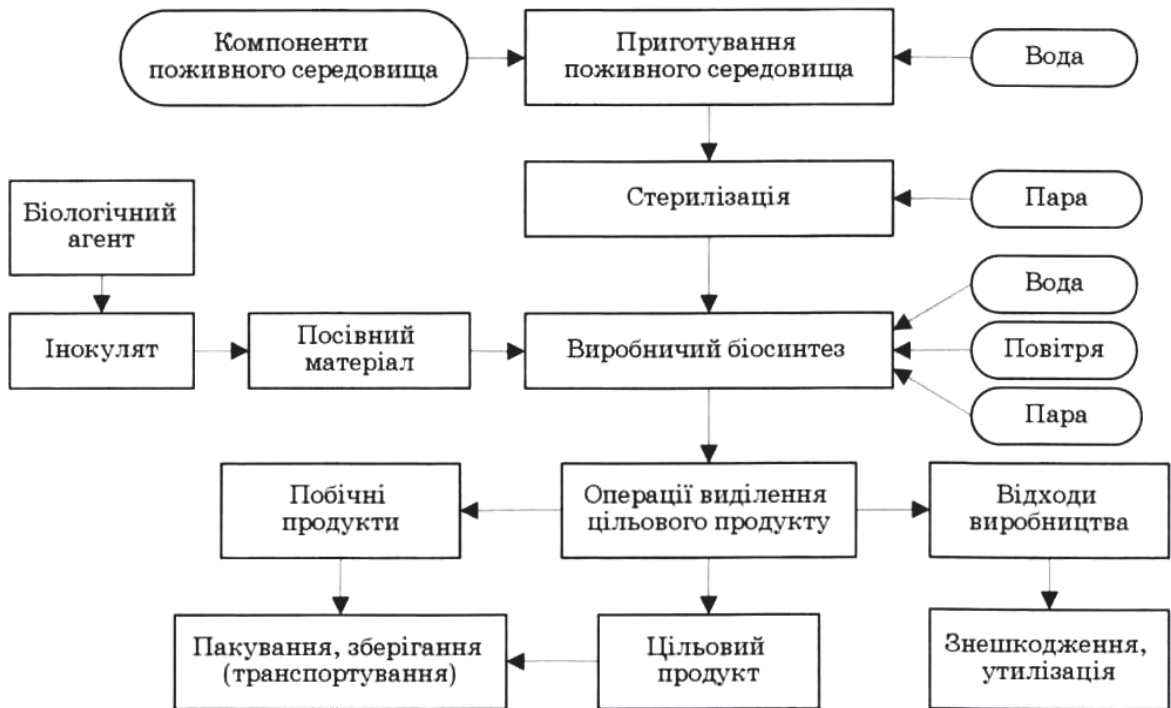


Рис.1. Узагальнена схема біотехнологічного процесу
(за Пирог Т. П., Ігнатова О.А., 2009)

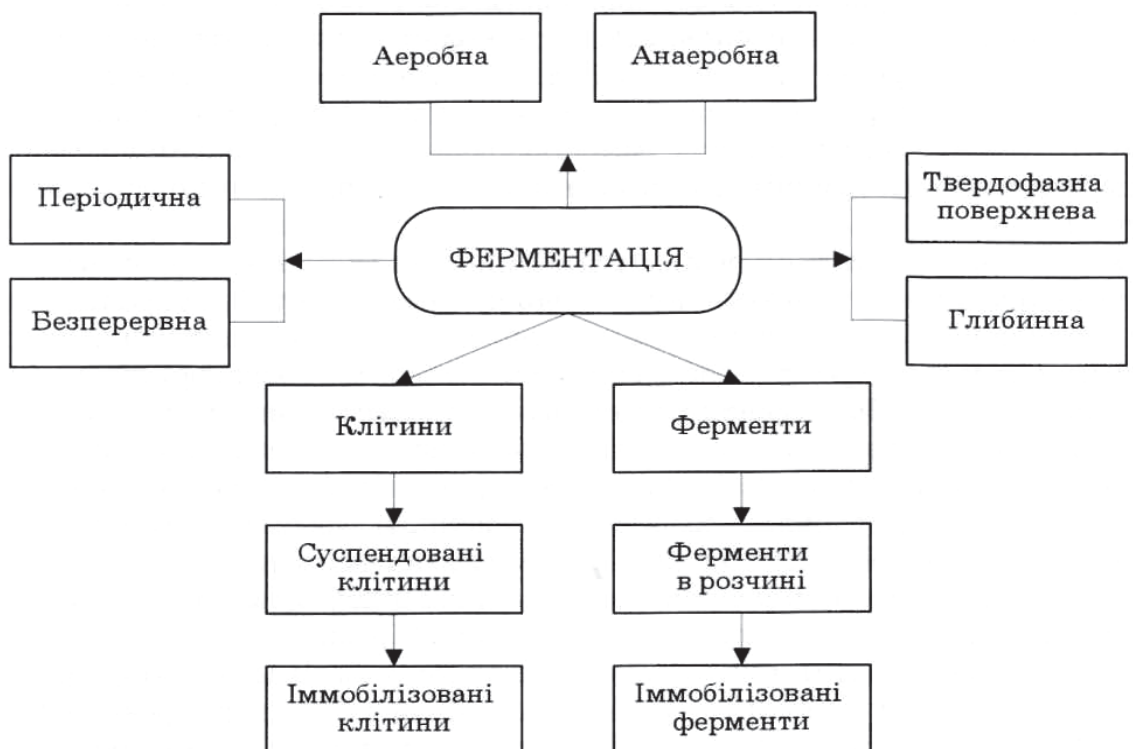


Рис.2.Варіанти ферментації
(за Пирог Т. П., Ігнатова О.А., 2009)

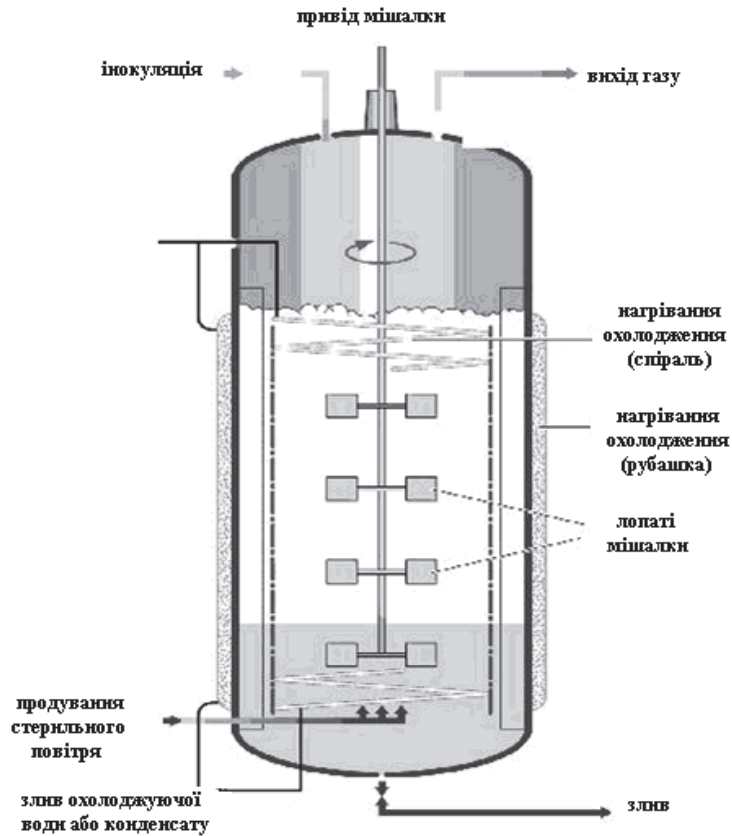


Рис.3. Ферментер (біореактор) для культивування мікроорганізмів

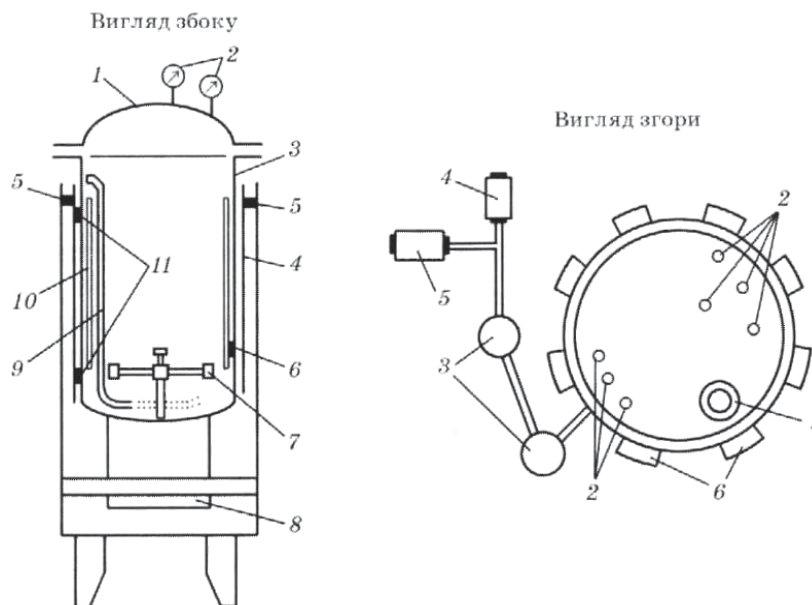


Рис. 4. Схема біореактора (за А.Я. Самойленко, Е.А. Рубан): вигляд збоку: 1 — кришка; 2 — манометри паровий і повітряний; 3 — місткість; 4 — парова сорочка; 5 — вузол кріплення і повороту біореактора; 6 — датчик температури; 7 — турбінна лопатева мішалка; 8 — двигун з магнітним приводом; 9 — газорозподільний барботер; 10 — перегородка відбійники; 11 — вхід і вихід теплоносіїв з парової сорочки; вигляд згори: 1 — оглядове вікно; 2 — штуцери із заглушками для дробного введення інгредієнтів; 3 — вхідний і вихідний стерилізувальні повітряні фільтри; 4 — клапан для виходу повітря з біореактора; 5 — запобіжний клапан; 6 — замочні пристосування



Рис.5. Загальна схема одержання екзоферментів
(за Пирог Т. П., Ігнатова О.А., 2009)

ДОДАТКИ

Класифікація продуктів мікробного синтезу (за Пирог Т. П., Ігнатова О.А., 2009)

Група препаратів	Назва препаратів	Характеристика мікроорганізмів		
		Представники	Тип метаболізму	Тип живлення
Пробіотики	Біоспорин, субалін, бактерин SL, ендоспорин	Бактерії роду <i>Bacillus</i>	Окислювальний	Хемоорганогетеротрофія
	Біфідумбактерин, біфілонг	Бактерії роду <i>Bifidobacterium</i>	Бродильний	Те саме
	Колібактерин	<i>Escherichia coli</i>	Окиснювальний	»»
	Лактобактерин, лактосан, лактин-К	Бактерії роду <i>Lactobacillus</i>	Бродильний	» »
Бактеріальні добрива	Ризобін, ризоторфін (нітрагін)	Симбіотичні азотфіксувальні бактерії роду <i>Rhizobium</i>	Окиснювальний	» »
	Азотобактерин	Вільно існуючі азотфіксувальні бактерії роду <i>Azotobacter</i>	Окиснювальний	» »
	Фосфобактерин	Бактерії роду <i>Bacillus</i>	Те саме	» »
Хлібопекарські дріжджі	Хлібопекарські дріжджі	Дріжджі <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	» »	» »
Білкові продукти	Гапрін	Метано-окислювальні бактерії роду <i>Methylococcus</i>	» »	» »
	Кормові дріжджі	<i>Saccharomyces, Candida, Rhodotorula, Trichosporon</i>	» »	» »
	Спіруліна	Ціанобактерії <i>Spirulina platensis</i>	» »	Фотолітоавтотрофія

ДОДАТКИ

Найважливіші первинні метаболіти мікроорганізмів

(за Пирог Т. П., Ігнатова О.А., 2009)

Група метаболітів	Назва	Продуцент
Аміно-кислоти	Лізин	<i>Brevibacterium flavum</i>
	Глутамінова кислота	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
	Пролін	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
	Лейцин	<i>Brevibacterium flavum</i>
	Триптофан	<i>Bacillus subtilis</i>
Органічні кислоти	Лимонна кислота	<i>Aspergillus niger</i>
	Оцтова кислота	<i>Acetobacter suboxydans</i>
	Ітаконова кислота	<i>Aspergillus terreus</i>
	Глюконова кислота	<i>Aspergillus niger</i>
Вітаміни	Ціанкобаламін (В ₁₂)	<i>Propionibacterium shermanii</i>
	Рибофлавін (В ₂)	<i>Eremothecium ashbyii</i>
	β-каротин (попередник вітаміну А)	<i>Blakeslea trispora</i>
	Ергостерин (вихідний продукт для одержання вітаміну D ₂)	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
	Аскорбінова кислота	<i>Acetobacter suboxydans</i> (здійснює перетворення D-сорбіту на L-сорбозу)

Найважливіші вторинні метаболіти мікроорганізмів

(за Пирог Т. П., Ігнатова О.А., 2009)

Група метаболітів	Назва	Продуцент
Антибіотики	Пеніцилін	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	Цефалоспорин	<i>Cephalosporium acremonium</i>
	Грамїцидин	<i>Bacillus brevis</i>
	Тетрациклін	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
	Еритроміцин	<i>Streptomyces erythreus</i>
	Стрептоміцин	<i>Streptomyces griseus</i>
	Поліміксин	<i>Bacillus polymyxa</i>
	Гентаміцин	<i>Micromonospora echinospora</i>
Екзополісахариди	Декстран	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	Пулулан	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	Курдлан	<i>Alcaligenes faecalis</i>
	Ксантан	<i>Xanthomonas campestris</i>
	Гелан	<i>Pseudomonas elodea</i>
	Альгінат	<i>Azotobacter vinelandii</i>
	Етаполан	<i>Acinetobacter sp.</i>
Поверхнево-активні речовини (біосурфактанти)	Сурфактин	<i>Bacillus subtilis</i>
	Фосфоліпіди	<i>Acinetobacter spp.</i>
	Емульсан RAG-1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	Емульсан BD4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD413
	Біодисперсан	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2
	Алазан	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> KA53
	Емульсан 378 Ліпозан	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Candida lipolytica</i>

ДОДАТКИ

Продукти бродіння (за Пирог Т. П. , Ігнатова О.А., 2009)

Типи бродіння	Продукт бродіння	Мікроорганізми
Спиртове	Етанол	<i>Sachoromyces cerevasiae</i> <i>Zymomonas mobilis</i>
Спиртове за присутності бісульфіту	Гліцерин	<i>Sachoromyces cerevasiae</i>
Гомоферментативне молочнокисле	Молочна кислота	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Streprococcus bovis</i>
Ацетоно-бутилове	Ацетон 2-пропанол Бутанол	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium acetobutyricum</i>

Класифікація біологічної дії антибіотиків за механізмом дії (за Пирог Т. П. , Ігнатова О.А., 2009)

Номер групи	Біологічна дія антибіотиків	Представники
1	Пригнічення синтезу клітинної стінки	Пеніциліни, бацитрацин, ванкоміцин, цефалоспорини
2	Порушення функцій мембрани	Полієни, валіноміцин, граміцидини, трихоміцин
3	Пригнічення синтезу (обміну) РНК	Анзаміцини, гризеофульвін, канаміцин, неоміцин, новобіоцин, олівоміцини
	Пригнічення синтезу (обміну) ДНК	Актиноміцин Д, мітоміцини, новобіоцин, саркоміцин, брунеоміцин
4	Пригнічення синтезу пуринів і піримідинів	Азасерин, декоїнін, саркоміцин
5	Пригнічення синтезу білка	Бацитрацин, аміноглікозиди, макроліди, тетрацикліни, хлорамфенікол
6	Інгібітори дихання	Олігоміцини, патулін, піоціанін
7	Інгібітори окиснювального фосфорилування	Валіноміцин, граміцидини, коліцини, олігоміцин
8	Антиметаболіти амінокислот, вітамінів, нуклеїнових кислот	Циклосерин
9	Конкурентна дія в процесі метаболізму	Пуроміцин, циклосерин, актитіазова кислота

ДОДАТКИ

Антибіотики мікробного походження (за Пирог Т. П. , Ігнатова О.А., 2009)

Мікроорганізми	Продуцент	Антибіотики	Хімічна природа антибіотиків	
Бактерії	<i>Bacillus brevis</i> <i>Bucillus polymyxa</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Streptococcus lactis</i>	Грамїцидини (А, В, CD, С(S), D) Поліміксини (А1, А2, В1,В2,С,D1,Д2, Е1 (колістин А), Е2(колістин В) М, Р1, Р2 Бацитрацини (А, А1 В, С, D, Е, F1 F2, F3, G) Нізін	Поліпептиди та низькомолекулярні білки	
Бактерії (актиноміцети)	<i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces fradiae.</i> <i>Streptomyces albogriseolus</i> <i>Streptomyces kanamyceticus</i> <i>Micromonospora purpurea</i>	Стрептоміцин Неоміцини Канаміцини Гентаміцини	Аміноглікозиди	
	<i>Streptomyces aureofaciens</i> <i>Streptomyces rimosus</i> <i>Streptomyces aureofaciens</i>	Хлортетрациклін Окситетрациклін Тетрациклін	Тетрацикліни	
	<i>Streptomyces antibioticus,</i> <i>Streptomyces chrysomallus,</i> <i>Streptomyces flavus</i>	Актиноміцини	Хромопептиди	
	<i>Streptomyces erythreus</i> <i>Streptomyces antibioticus</i> <i>Streptomyces filipensis</i> <i>Streptomyces notalensis</i>	Еритроміцин Олеандоміцин Філіпін Пімаріцин	Макроліди	
	<i>Nocardia mediterranea</i> <i>Streptomyces spectabilis</i> <i>Streptomyces tolypophorus</i>	Рифаміцини(рифоцин, рифампіцин, рифамід) Стрептоваріцини Толіпоміцини	Анзаміцини	
	Міцеліальні гриби	<i>Penicillium chrysogenum,</i> <i>Penicillium brevicompactum,</i> <i>Penicillium nigricans,</i> <i>Aspergillus nidulans,</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Cephalosporium acremonium</i>	Пеніциліни Цефалоспорини	β-лактамі антибіотики
		<i>Aspergillus fumigatus</i>	Фумагілін	Полієновий антибіотик
		<i>Penicillium griseofulvum</i> <i>Trichotecium roseum</i>	Гризеофульвін Трихотецин	Гетероциклічні антибіотики

ДОДАТКИ

Мікроорганізми – продуценти ферментів
(за Пирог Т. П. , Ігнатова О.А., 2009)

Фермент	Гриби	Бактерії
а-Амілаза	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Глюкоамілаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus niveus</i> <i>Endomycopsis</i> sp.	—
Пуланаза	—	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Декстраназа	<i>Penicillium</i> sp.	—
β-Глюконаза	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Глюкозоізомераза	—	<i>Actinoplanes missouriensis</i>
Інвертаза	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—
Целюлази	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma roseum</i> <i>Trichoderma viride</i>	—
Пектинази	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus awamori</i>	—
Протеїнази	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor mihei</i> <i>Mucor rouxii</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i>
Ліпази	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus awamori</i> <i>Candida cylindrica</i> <i>Mucor mihei</i> <i>Rhizopus</i> sp.	—
Глюкозооксидаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium vitale</i> <i>Penicillium notatum</i>	—
Каталаза	<i>Aspergillus</i> sp.	—
Деацетилаза	<i>Aspergillus</i> sp.	—
Аспартаза	—	<i>Escherichia coli</i>
Фумараза	—	<i>Escherichia coli</i>
Пеніцилінамідаза	—	<i>Escherichia coli</i>

М'ясо-пептонний бульйон (МПБ):

1. До м'ясної води прибавляють 1% пептону і 0,5% хлориду натрію, кип'ятять протягом 1-2 хв. при помішуванні, потім охолоджують і визначають рН.
2. Внесенням лугу (20%-й NaOH) або 1 н кислоти встановлюють рН середовища 7,6-7,8. Кип'ятять протягом 30-45 хв., охолоджують, фільтрують через паперовий фільтр і доводять об'єм до початкового.
3. Перевіряють рН, доводять його до 7,2-7,4, розливають у колби і стерилізують при 120⁰ С протягом 15-20 хв.

М'ясо-пептонний агар:

1. До виготовлено й охолодженого МПБ прибавляють 1,5-2,0% агар-агару, витримують протягом 15-20 хв. при кімнатній температурі (для набухання).
2. Суміш підігрівають на водяній бані до повного розчинення агар-агару.
3. Охолоджують до 50⁰ С і для просвітлення вносять у середовище ретельно збитий, у подвійному об'ємі холодної води, яєчний білок (білок 1 яйця на 1 л середовища). Прогрівають в автоклаві при 0,5 атм протягом 45 хв. Білок адсорбує звішені частинки, згортається й осідає на дно.
4. Середовище фільтрують через шар марлі або вати.
5. Перевіряють і доводять до необхідного значення рН середовища.
6. Середовище розливають у колби і стерилізують при 120⁰ С (1 атм) протягом 15-20 хв.

Пептонна вода (ПВ):

1. В 1 л дистильованої води розчиняють при нагріванні 100 г пептону, 50 г хлориду натрію, 1 г нітрату калію, і 20 г бікарбонату натрію.
2. Розчин фільтрують через паперовий фільтр, розливають у колби і стерилізують при 1 атм протягом 30 хв.

Ґрунтовий агар (ГА):

1. З повітряно-сухого ґрунту видаляють рослинні рештки, кусочки скла та інших домішок.
2. Ґрунт розтирають у ступці, а потім просівають через сито з діаметром пор 1 мм.
3. Ґрунт поміщають у колбу і заливають дистильованою водою у співвідношенні 1:5. Суспензію ретельно перемішують, а потім прибавляють 1,5-2,0% агар-агару.
4. Середовище стерилізують в автоклаві при 120⁰ С протягом 1 год. Стерилізацію повторюють через 1-2 доби.

Сусловий агар (СА):

1. Пивне сусло розводять до вмісту цукрів 7-8⁰ за Баллінгом і стерилізують при 120⁰ С протягом 10 хв.

2. В 1 л охолодженого суслу прибавляють 1,5-2,0% агар-агару, витримують при кімнатній температурі протягом 15-20 хв., розплавляють середовище на водяній бані, розливають у колби і стерилізують при 110⁰ С протягом 10 хв.

Середовище Сабуро:

1. В 1 л водопровідної води вносять 80 г пресованих пекарських дріжджів (або 20 г сухих дріжджів).
2. Кип'ятять протягом 15 хв., фільтрують через паперовий фільтр.
3. У холодну дріжджову воду вносять 1,5-2,0% агар-агару і витримують протягом 15-20 хв. при кімнатній температурі, а потім плавлять на водяній бані, прибавляючи 1% пептону і 4% глюкози (або мальтози).
4. Середовище фільтрують через шар вати, розливають у колби і стерилізують при 0,5 атм протягом 20 хв.

Середовище Чапека:

1. В 1 л водопровідної води внести при перемішуванні:
 - глюкозу (сахарозу) - 30,0 г
 - натрій азотнокислий - 2,0 г
 - калій фосфорнокислий однозаміщений – 1,0 г
 - магній сірчаноокислий – 0,5 г
 - калій хлористий – 0,5 г
 - залізо сірчаноокисле – 0,01 г
 - агар-агар – 20,0 г
2. Середовище стерилізують протягом 10 хв. при 116,5⁰ С (0,75 атм) в автоклаві.

Середовище Ендо:

Поживне середовище Ендо випускається у вигляді сухого порошку і готується згідно пропису, вказаного на етикетці.

Середовище Ешбі:

Для виготовлення синтетичного середовища Ешбі, яке призначене для культивування азотфіксуючих бактерій, на 1 л водопровідної води добавляють:

- калій фосфорнокислий двозаміщений 0,2 г
- магній фосфорнокислий – 0,2 г
- калій фосфорнокислий 0,1 г
- натрій хлористий – 0,2 г
- крейду – 5,0 г
- сахарозу – 20 г
- агар-агар – 20 г.

Крохмале-аміачний агар – найбільш поширене середовище для підрахунку стрептоміцетів в ґрунті:

- амоній сірчаноокислий – 2,0 г
- калій фосфорнокислий двозаміщений – 1,0 г
- магній сірчаноокислий – 1,0 г

- натрій хлористий – 1,0 г
- крейду – 3,0 г.
- розчинний крохмаль – 10,0 г
- агар-агар – 20 г

Крохмаль попередньо розмішують у невеликій кількості води, а потім доливають до основного середовища

Цикл перетворень вуглецевмісних сполук складний. У ньому беруть участь мікроорганізми, що розкладають органічні речовини з утворенням різних проміжних і кінцевих продуктів. Ці мікроорганізми відносяться до різних фізіолого-трофічних груп, а їх виділення можливе при висівах матеріалу на середовища, в яких єдиним джерелом вуглецю є органічні речовини.

Серед усієї маси мікроорганізмів, що беруть участь у кругообігу вуглецю, найважливішу роль відіграють оліготрофи, гетеротрофи, дріжджі, стрептоміцети (актиноміцети), мікроміцети (гриби), що розкладають целюлозу, пектинові речовини, жири, вуглеводи.

Олігокарбофіли — одна з найменш вивчених груп мікроорганізмів, життєдіяльність яких забезпечується малою кількістю поживних речовин. Їх виділення і кількісний облік роблять на голодному агарі — агаризованій водопровідній воді, агаризованій воді з досліджуваної водойми чи агаризованому екстракті з ґрунту (дивись нижче). Агар для приготування середовища має бути ретельно відмитий (вилужений). Середовище розливають у стерильні пляшки і автоклавують 20 хв. при тиску $1 \cdot 10^5$ Па.

Посів роблять глибинним методом заливання в агар, інкубують при температурі не вище 28 °С. Облік і опис колоній роблять через 48-72 год. Колонії оліготрофів поверхневі, дрібні, круглі, а за забарвленням — молочно-білі, сірі чи зовсім безбарвні.

Серед мікробного населення ґрунтів і водойм певне місце займають *бактерії, здатні продукувати біологічно-активні речовини*, необхідні для нормальної життєдіяльності біоти. Для вилучення цих мікроорганізмів та встановлення їх кількості надійні результати дає застосування **глюкозо-мінерального середовища Красильникова**, яке має такий склад:

Середовище Красильникова

KN03	1,0 г
K ₂ HP0 ₄	1,0 г
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,2 г
CaCl ₂ ×6H ₂ O	0,1 г
NaCl	0,1 г
FeSO ₄ ·7H ₂ O	слідові кількості
Глюкоза	20,0 г
Агар –агар	15,0 г
Дистильована вода	1000 мл

ДОДАТКИ

Усі солі для приготування цього середовища мають бути марки «чда», глюкоза — в ампулах для ін'єкцій, агар — ретельно відмитим кілька годин у дистильованій воді.

Важливою складовою мікробних угруповань ґрунтів і водних об'єктів є *актиноміцети*, *гриби(мікроміцети)* і *дріжджі*, чисельність яких значно зростає при низькому значенні рН, нестачі азоту і значних запасах органічних речовин. Кількість їх враховують на агаризованих середовищах Чапека-Доксе і середовищі Ваксмана в модифікації Мартинова.

Можна використовувати також елективні середовища з різним джерелом вуглецю, селективні середовища з лігніном, різними інгібіторами бактерій тощо. Зберігати чисті культури до їх ідентифікації рекомендується на середовищі Сабуро з глюкозою.

Середовище Чапека-Доксе (рН – 6,4)

NaNO ₃	2,0 г
K ₂ HPO ₄	1,0 г
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5 г
KCl	0,5 г
NaCl	0,1 г
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,01 г
Корн-стип (подрібнене зерно кукурудзи)	10,0 г
Солодке сусло (8°Баллінга)	20,0 г
Дистильована вода	1000 мл
50%-вий стерильний водний розчин глюкози	60 мл

Усі інгредієнти, крім глюкози, розчиняють у дистильованій воді, нагріваючи її текучою парою.

Середовище фільтрують через вату і стерилізують в автоклаві 1 год. при тиску $7 \cdot 10^4$ Па.

Перед вживанням до середовища додають розчин глюкози, попередньо простерилізований при 100 °С.

Повністю готове середовище стерилізують 30 хв. при 100 °С текучою парою.

Середовище Ваксмана в модифікації Мартинова (рН 6,3-7,0)

NaNO ₃ ,г	1,0
KH ₂ PO ₄ , г	1,0
Агар, г	15,0
Ґрунтовий екстракт, мл	1000
Бенгальський червоний, г	0,07
50%-й стерильний водний розчин глюкози, мл	20
Стрептоміцинсульфат, мг	30

Для приготування ґрунтового екстракту 500 г орного ґрунту або донних відкладень водойми заливають 1200 мл дистильованої води і кип'ятять

ДОДАТКИ

протягом 1 год. Фільтрують через вату і доводять дистильованою водою до 1 л, стерилізують в автоклаві 30 хв. при тиску $1 \cdot 10^5$ Па.

Усі інгредієнти крім глюкози і стрептоміцинсульфату розчиняють у ґрунтовому екстракті й стерилізують в автоклаві 20 хв. при тиску $7 \cdot 10^4$ Па. Далі чинять так само, як і з середовищем Чапека-Доксе. Перед розливанням у чашки середовище охолоджують до 70°C і додають стрептоміцинсульфат.

У чашках із середовищем Чапека-Доксе через 28-30 год. підраховують жовто-білі чи жовті опуклі колонії дріжджових грибів і через 7-10 днів колонії цвілевих грибів. Середовище Ваксмана в модифікації Мартинова слугує контрольним, тому що на середовищі Чапека-Доксе ріст цвілевих грибів може інгібуватися мукоровими грибами.

Середовище Сабуро (рН 6,8)

Пептон, г	10
Глюкоза, г	20
Агар, г	20
Дистильована вода, мл	1000

Зазначені інгредієнти додають до дистильованої води і кип'ятять протягом 1 год. Середовище фільтрують через вату і стерилізують 3 дні текучою парою по 30 хв.

При виділенні й кількісному обліку у водоймах *дріжджів* можуть бути застосовані також інші середовища.

Середовище для дріжджів із суслон і сахарозою (рН 6,8-7,0)

Сахароза, г	15,0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, г	2
KH_2PO_4 , г	1
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, г	1
Суслон неохмелене, мл	10
Пропіоновокислий натрій, г	0,5
Стрептоміцин, мг	До 10
Водопровідна вода, мл	1000
Агар, г	20

Середовище треба стерилізувати текучою парою або 20 хв. в автоклаві при тиску $7 \cdot 10^4$ Па.

Середовище для дріжджів із глюкозою (рН 6,8)

Глюкоза, г	60
K_2HPO_4 , г	1
KH_2PO_4 , г	0,1
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, г	0,7
NaCl , г	0,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, г	0,4
Відвар дріжджів, мл	50
Дріжджовий автолізат, мл	50

ДОДАТКИ

Водопровідна вода, мл	900
Агар, г	20

Дріжджовий відвар отримують при кип'ятінні 200 г пресованих дріжджів у 1 л водопровідної води.

Існує кілька способів приготування дріжджового автолізу. При автолізі дріжджів під впливом протеаз, що містяться в них, більша частина білків переходить у розчин у вигляді пептонів і альбумоз.

За способом Омелянського для отримання автолізу 1 кг пресованих дріжджів треба залити 1 л кип'яченої води з температурою 60 °С, розмішати в гомогенну масу, нагріти її на водяній бані до 50 °С. При цій же температурі інкубувати у термостаті протягом 3 діб. Після цього проавтоклаувати 30 хв. при тиску $2 \cdot 10^4$ Па і кілька разів профільтрувати до одержання прозорої рідини. У ній міститься 0,9 % азоту. Осад переносять з фільтра в колбу, заливають 600 мл води, збовтують і знову відфільтровують. Обидва фільтрати змішують. Вміст азоту в суміші коливається від 0,6 до 0,8 %. Фільтрат нейтралізують до рН 6,8, розливають у стерильний посуд і автоклавують 15 хв. при тискові $7 \cdot 10^4$ Па.

За способом Скородумової 500 г пресованих дріжджів треба залити рівною кількістю води, розмішати і витримати в термостаті 2-3 доби при 45 °С. Потім профільтрувати, а осад на фільтрі промити 1 л води. Отриманий фільтрат розбавити водою до 2 л, розлити в стерильний посуд і автоклаувати 30 хв. при тискові $1 \cdot 10^5$ Па.

За способом Плотникової для отримання автолізу 100 г пресованих дріжджів заливають 300 мл води, перемішують і витримують у термостаті 2 доби при 53-56 °С, періодично перемішуючи. Потім додають 200 мл води і фільтрують. Стерилізують в автоклаві 30 хв. при тиску $7 \cdot 10^4$ Па.

За способом Санкт-Петербурзького інституту вакцин і сироваток 1 кг пресованих дріжджів заливають 500 мл водопровідної води (при температурі 45 °С), яка вміщує 10 г цукрового піску. Інкубують протягом доби при 50 °С. Потім відфільтровують і стерилізують текучою парою.

За Кудрявцевим для отримання автолізу 400 г пресованих дріжджів заливають 1 л води і, періодично збовтуючи, інкубують 2 доби при температурі 48 °С. Після цього фільтрують і стерилізують текучою парою чи в автоклаві при $5 \cdot 10^4$ Па.

За Одинцовою пресовані хлібопекарські чи пивні дріжджі потрібно добре промити і розбавити водою до консистенції сметани. Потім підкислити розведеною сірчаною кислотою до рН 6,0 і витримати в термостаті 20 год. при 48 °С, після чого кип'ятити протягом 5 хв., відстояти і профільтрувати.

Неохмелене солодове сусло отримують з пивоварних заводів. Для приготування живильних середовищ його розбавляють водою у 2 рази.

Після цього його щільність за Баллінгом близька до 8°. Можна отримати сусло й у лабораторії.

За *Омелянським* 1 л води слід нагріти до 48-50 °С і при постійному помішуванні, щоб уникнути утворення грудочок, всипати 250 г меленого солоду. При цій же температурі витримати 30 хв. Потім підвищити температуру до 55-58 °С й підтримувати її стільки часу, скільки буде потрібно для повного оцукрення крохмалю, тобто доти, доки остигла рідина не перестане давати посиніння з йодом. Піднімати температуру не можна, тому що при цьому руйнуватиметься амілаза. У результаті виходить мутна рідина. При відстоюванні в ній утвориться багато осаду. Рідину можна декантувати, користуючись ділильною лінійкою, чи процідити крізь сито з отворами не більше 1 мм. Розливати її слід у стерильний посуд, намагаючись не забруднити горлечка, щоб не прилипали пробки. Стерилізувати сусло краще в апараті Коха протягом 3 діб по 30 хв. На четверту добу за кілька годин до стерилізації рідину прогрівають при 35-40 °С. На п'яту добу її витримують без стерилізації при 25-30 °С. Остання стерилізація проводиться на добу і триває 1 год. У проміжках між етапами стерилізації сусло витримують на холоді. Можлива також стерилізація в автоклаві протягом 15-20 хв. при тиску $4 \cdot 10^4$ Па.

Для вивчення характеру **спороутворення** у **дріжджів** рекомендується культивувати їх на агарі *Городкової*.

Агар *Городкової*

М'ясний екстракт, г	10,0
Пептон, г	10,0
NaCl, г	5,0
Глюкоза, г	2,5
Агар, г	20,0
Водопровідна вода, мл	1000

Агар *Городкової* в модифікації Лоддер та Крегер Ван Рий

Глюкоза, г	1,0
Пептон, г	10,0
NaCl, г	5,0
Агар, г	30,0
Водопровідна вода, мл	1000

У ґрунтовій мікробіології кращими середовищами для виділення і кількісного підрахунку дріжджів вважаються сусло-агар, підкислений молочною кислотою з розрахунку 3 мг/л, солодовий агар, агар Сабуро і середовище Ваксмана. Для обліку олігонітрофільних дріжджів частіше використовують середовище Ешбі із сахарозою. Для придушення росту бактерій і актиноміцетів у зазначені середовища додають органічні й мінеральні кислоти, антибіотики і барвники. З інших середовищ, придатних для культивування дріжджів, варто вказати середовище *Цетліна*

ДОДАТКИ

та Охмана. Останнє містить такі компоненти, як гліцерин, натуральні соки і витяжки з листків буряка.

Середовище Цетліна

Глюкоза, г	5,0
KH_2PO_4 , г	0,2
$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, г	0,05
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г	0,05
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, г	0,001
Дистильована вода, мл	1000

Вивчення засвоєння дріжджами вуглеводів найзручніше проводити на середовищі Кудрявцева.

Середовище Кудрявцева

Досліджуваний цукор, г	60,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г	0,7
NaCl , г	0,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, г	0,4
KH_2PO_4 , г	1,0
K_2HPO_4 , г	0,1
Відвар дріжджів, мл	50
Дріжджовий автолізат, мл	50
Водопровідна вода, мл	1000
Агар, г	20

Кислотність середовища 5,8-5,9. На кожні 100 мл середовища додають по 3 мл 0,04%-го розчину індикатора бромтимолового синього.

Можливо застосувати також середовище Лоддер і Крегер Ван Рий.

Середовище Лоддер і Крегер Ван Рий

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, г	0,5
KH_2PO_4 , г	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г	0,05
Вилужений агар, г	2,0

До цього середовища слід додати 0,05 мл концентрованого в 100 разів розчину. Його склад такий:

Біотин, мкг	2
Кальцій пантотеновий, мкг	400
Інозит, мкг	2000
Ніацин, мкг	400
Параамінобензойна кислота, мкг	200
Солянокислий піридоксин, мкг	400
Тіамін, мкг	400
Рибофлавін, мкг	200
Водопровідна вода, мл	10

ДОДАТКИ

Під час приготування цього середовища розчин вітамінів може бути замінений дріжджовою водою, розчинивши 200 г пресованих дріжджів в 1 л дистильованої води. Цей розчин витримують 15 хв. в автоклаві при тиску $9 \cdot 10^4$ Па і двічі фільтрують. Зберігають у холодильнику.

Для вивчення засвоєння дріжджами різних джерел азоту можна використовувати і середовище такого складу:

Водопровідна вода, мл	1000
Глюкоза, г	20
KH_2PO_4 , г	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г	0,5
Вилужений агар, г	20,0

Середовище стерилізують в автоклаві 15 хв. при тиску $4 \cdot 10^4$ Па.

Для виділення і кількісного обліку *цвілевих грибів* найчастіше застосовують середовище Чапека, а також середовище Фреда і Ваксмана з рН 5,6.

Середовище Чапека

NaN_3 , г	2,0
KH_2PO_4 , г	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г	0,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г	0,01
KCl, г	0,5
Сахароза, г	30,0
Дистильована вода, мл	1000
Агар, г	15,0

Розчин треба профільтрувати, рН можна не встановлювати.

Середовище Фреда і Ваксмана

NH_4NO_3 , г	3,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Сліди
K_2HPO_4 , г	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г	1,0
Сахароза, г	50,0
Дистильована вода, мл	1000
Агар, г	15-20

Для виділення, кількісного обліку і вивчення *актиноміцетів* існує досить багато середовищ, що відрізняються за рецептурою і рН. Найпростіше з них – картопляний агар.

Картопляний агар

Картопля, г	200
Водопровідна вода, мл	1000
Агар, г	20

Картоплю треба очистити, дрібно нарізати і варити протягом 30 хв. Рідину профільтрувати через вату з марлею, додати до неї агар і нагрівати до повного його розплавлення. Потім установити рН 7,0, розлити в стерильний посуд і стерилізувати 1 год. при тиску $9 \cdot 10^4$ Па.

Цукровий агар Ваксмана з нітратами

NaNO ₃ , г	2,0
K ₂ HPO ₄ , г	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O, г	0,5
KCl, г	0,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O, г	0,05
Сахароза, г	30,0
Агар, г	15,0
Водопровідна вода, мл	1000

Крохмало-аміачний агар

Розчинний крохмаль, г	10,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ Г	1,0
K ₂ HPO ₄ , г	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O, г	1,0
NaCl, г	1,0
CaCO ₃ , г	3,0
Агар, г	15,0
Водопровідна вода, мл	1000

Агар Чапека

Глюкоза або гліцерин, г	30,0
NaNO ₃ , г	2,0
K ₂ HPO ₄ , г	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O, г	0,5
KCl, г	0,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O, г	0,01
Агар, г	15,0
Крейда, г	3,0
Дистильована вода, мл	1000

Крохмальний агар

Розчинний картопляний крохмаль, г	10,0
K ₂ HPO ₄ , г	0,3
MgCO ₃ , г	1,0
NaCl, г	0,5
NaNO ₃ , г	1,0
Агар, г	15,0
Дистильована вода, мл	1000

Аспарагіново-крохмальний агар

Розчинний картопляний крохмаль, г	2,0
Аспарагін, г	0,05
K ₂ HPO ₄ , г	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O, г	0,25
CaCl ₂ ·6H ₂ O, г	0,05

ДОДАТКИ

NaNO ₃ , г	0,05
Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·9H ₂ O, г	Сліди
Вилужений агар, г	20,0
Дистильована вода, мл	1000

Картопляний агар (рН 7,0)

Очищена картопля, г	500
Пептон, г	10
М'ясний екстракт, г	10
Агар, г	15
Водопровідна вода, мл	1000

Картопляно-глюкозний агар (рН 6,8-7,2)

Очищена картопля, г	300
Глюкоза, г	5
Агар, г	20
Водопровідна вода, мл	1000

При приготуванні середовища картоплю треба дрібно нарізати, залити 350 мл води і варити протягом 45 хв. Екстракт пропустити крізь тонку бавовняну тканину.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Основна

1. Безбородов А.М. Биотехнология продуктов микробного синтеза: Ферментативный катализ, как альтернатива органического синтеза / А.М. Безбородов - М.: Агропромиздат, 1991. – 238 с.
2. Бекер М.Е. Биотехнология / Бекер М.Е., Лиепиньш Г.К., Райпулис Е.П.– М.: Агропромиздат, 1990. – 334 с.
3. Биотехнология микробных ферментов / [Лобанок А.Г., Астапович Н.И., Михайлова Р.В., Безбородов А.М.] – Минск: Наука и техника, 1989. – 204 с.
4. Биотехнология. Принципы и применение / [Бич Г., Бест Д., Брайерли К. и др.] Пер. с англ. ; под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988. – 480 с.
5. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии / Бирюков В. В. — М.: КолосС, 2004. — 296 с.
6. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология: учеб.пособие / Воробьева Л.И. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 294 с.
7. Диланян З.Х. Сыроделие/ З.Х. Диланян - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 280 с.
8. Егоров Н.С. Биотехнология: микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов: учеб. пособие для вузов / Н.С. Егоров, В.Д. Самуилов. - М.: Высшая школа, 1997. – 143 с. – (в 8 кн., кн.6).
9. Машины и аппараты пищевых производств: учебник для вузов/ [Антипов С.Т., Кретов И.Т., Остриков А.Н. и др.]; под ред. В.А. Панфилова. - М.: Высшая школа, 2001. - 704 с. – (в 2 кн., кн.1).
10. Пирог Т.П. Загальна біотехнологія: підручник / Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
11. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: підручник / Пирог Т.П. — К.: НУХТ, 2004. — 471 с.
12. Промышленная микробиология: учеб. пособие для вузов / [Аркадьева З.А., Безбородов А.М., Блохина И.Н. и др.]; под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 688 с.
13. Сельскохозяйственная биотехнология / [Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Кочиева Е.З. и др.]; под ред. В.С. Шевелухи. – [3-е изд., перераб. и доп.] – М.: Высшая школа, 2008. – 710 с.
14. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты : учебник для студентов высших учебных заведений/ С.А. Гудков и др. под ред. С.А. Гудкова – М.: ДеЛи принт, 2003. – 800с.

Додаткова

1. Антипова Л.В. Прикладная биотехнология: Учеб. пособие для вузов / Антипова Л.В., Глотова И.А., Жаринов А.И. - Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад., 2000.- 283 с.
2. Брюханов А.Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И. Молекулярная микробиология: Учебник для вузов. – М.: Издательство Московского университета, 2012. – 480 с.
3. Витол И.С. Экологические проблемы производства и потребления пищевых продуктов: учеб. пособие. / Витол И.С. - М.: МГУПП, 2003. – 93 с.
4. Голубев В.Н. Пищевая биотехнология / В.Н. Голубев, И.Н. Жиганов. – М.: Делипринт, 2001.– 123 с.
5. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов/ К.К. Горбатова – СПб.: ГИОРД, 2000. – 320с.
6. Елинов Н.П. Основы биотехнологии: Для студентов институтов / Елинов Н.П. – СПб: Наука, 1995. – 600 с.
7. Кавецкий Г.Д., Васильев Б.В. Процессы и аппараты пищевой технологи / Г.Д. Кавецкий, Б.В. Васильев. - М.: Колос, 2000.- 551 с.
8. Крусь Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов/ Под общ. редакцией А.М. Шалыгиной. – М.: КолосС, 2002.- 368 с.
9. Микробиология / [Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М.] — М.: Медицина. — 1998. — 336 с.
10. Научно-технические основы биотехнологии молочных продуктов нового поколения. Учеб. пособие / А.Г. Храмцов, Б.М. Синельников, И.А. Евдокимов, В.В. Костина, С.А. Рябцева. – Ставрополь: СевКавГТУ, 2002. – 118 с.
11. Неверова О.А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения/ О.А. Неверова, Г.А. Гореликова, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб.унив.изд-во, 2007. – 415 с.
12. Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. И. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. — М.: Мир, 2005. — Т. 1. — 654 с.
13. Татарченко И.И., Мохначев И.Г., Касьянов Г.И. Технология субтропических и пищевкусковых продуктов. – М.: Издательский центр "Академия", 2004. – 384 с.
14. Твердохлеб Г.В., Раманаускас Р.И. Химия и физика молока и молочных продуктов. – М.: ДеЛи принт, 2006. – 360 с.

М.Д.Мельничук, О.Л.Кляченко,
В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць

ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Підписано до друку 03.12.14.
Формат 84х60/16. Папір офсетний.
Друк офсетний. Гарнітура Cambria.
Умов. друк. арк. 15,62. Обл.-вид. арк. 14,53.
Наклад 100 прим. Зам. № 5783.

Віддруковано з оригіналів замовника.
ФОП Корзун Д.Ю.
21027, а/с 8825, м. Вінниця, вул. 600-річчя, 21.
Тел.: (0432) 69-67-69, 603-000.
e-mail: info@tvoru.com.ua, <http://www.tvoru.com.ua>