

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
«ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»

М.Г. Зінченко

# БІОХІМІЧНІ І МІКРОБІОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ХАРЧОВОЇ ТА БРОДИЛЬНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ

*Рекомендовано Міністерством освіти і науки України  
як навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів,  
у тому числі іноземних студентів*

Харків  
НТУ «ХП»  
2009

ББК 36-1 я 7

З-63

УДК 663.11: 579.

Рецензенти: *Зайцев О. І.*, д-р фарм. наук, проф., НФУ (м. Харків)

*Богомолов О. В.*, д-р техн. наук, проф., НТУСГ (м. Харків)

*Клещев М. Ф.*, д-р техн., наук, проф., НТУ«ХП» (м. Харків)

Гриф наданий Міністерством освіти і науки України,  
лист № 1.4/18-Г-1229 від 20.07.07 р.

**Зінченко М.Г.**

З-63 Біохімічні і мікробіологічні основи харчової та бродильної технології : навч. посібник / М. Г. Зінченко. – Харків : НТУ «ХП», 2009 – 188 с.

ISBN

Наведено характеристики мікроорганізмів, що беруть участь у процесах перетворення сировини в харчові продукти; розглянуті основні біохімічні процеси харчових виробництв, питання інженерної реалізації процесів біосинтезу.

Призначено для студентів спеціальності «Обладнання переробних і харчових виробництв» всіх форм навчання та іноземних студентів.

Іл.50. Табл. 3. Бібліогр.: 16 назв.

ISBN

ББК 36-1 я 7

© М.Г. Зінченко, 2009

## ПЕРЕДМОВА

В останні роки в Україні намітився ріст виробництва в експортно-орієнтованих галузях промисловості, до яких належить і харчова промисловість. За обсягами виробництва харчова промисловість з 2002 року посідає друге місце після чорної металургії; при цьому попит на вітчизняні продукти неухильно росте, і через торговельну мережу реалізується 95 % продовольчих товарів вітчизняного виробництва. Підвищення конкурентоздатності на ринку української продукції пов'язано, крім іншого, з удосконалюванням традиційних і розробкою новітніх технологій переробки сировини, до яких у першу чергу відносяться біологічні технології, основані на принципах керованого мікробного синтезу. Досягнення біотехнології дозволяють прискореними темпами розвивати мікробіологічну промисловість, зокрема, виробництво харчового білка, органічних кислот, вітамінів, ферментів, пива, спирту, напоїв та ін.

Для студентів, що спеціалізуються у галузі обладнання й технології харчових виробництв, важливо оволодіти знаннями з біохімії, промислової мікробіології, біоінженерії, детально ознайомитися із промисловими процесами, що базуються на використанні мікроорганізмів, мати уявлення про перспективи їхнього розвитку.

Завданням цього навчального посібника є викласти основні розділи сучасної промислової мікробіології, дати уявлення про процеси, на яких базуються харчові біотехнологічні виробництва, і розглянути найважливіші з них.

Навчальний посібник починається зі вступу, у якому стисло описано історію виникнення й розвитку промислової мікробіології. Весь викладений у книзі матеріал, розділено на шість розділів.

У *першому* розділі розглядаються властивості мікроорганізмів, що мають особливе значення для практичного використання у виробництві

харчових продуктів, а також особливості взаємодії мікроорганізмів з навколишнім середовищем.

*Другий* розділ присвячений питанням культивування мікроорганізмів. Тут розглянуті закономірності росту й розвитку мікробів, наведено математичний опис кінетики росту клітин.

У *третьому* розділі розповідається про основні принципи інженерної реалізації біотехнології харчових продуктів, у тому числі продуктів бродіння. Матеріал викладається відповідно до етапів здійснення біотехнологічного виробництва: підготовка біологічного об'єкта, готування й стерилізація рідких живильних середовищ культивування мікроорганізмів, виділення й очищення цільових продуктів. Описано методи іммобілізації клітин і ферментів.

У *четвертому* розділі розглянуто найважливіші біохімічні процеси (перетворення безазотистих й азотовмісних субстратів), що використовуються у харчових виробництвах, а також деякі питання спеціальної мікробіології: загальні принципи мікробіологічного й санітарно-гігієнічного контролю харчових виробництв, дезінфекція в харчовій промисловості.

У *п'ятому й шостому* розділах наведено приклади промислової реалізації процесів мікробного синтезу. У *п'ятому* розділі розглянута технологія одержання мікробної біомаси на прикладі виробництва хлібопекарських дріжджів; у *шостому* – одержання продуктів бродіння на прикладі виробництва пива. Процеси розглянуті в технологічному аспекті з короткою характеристикою біохімії й мікробіології кожного виробництва.

Посібник відповідає навчальній програмі дисципліни «Біохімічні і мікробіологічні основи харчової та бродильної технології» спеціальності «Обладнання переробних і харчових виробництв» напрямку підготовки «Інженерна механіка» і призначений для всіх форм навчання студентів.

Дотепер аналогічний навчальний посібник з цього напрямку в Україні не видавалося.

## ВСТУП

Харчова галузь – одна з найстаріших галузей господарської діяльності людини. По суті, харчова технологія була однією з перших, а млин був першим харчовим підприємством.

Особливістю харчової технології є переробка сировини рослинного й тваринного походження. В основі методів такої переробки закладені закономірності фізики, хімії, біології, тому що кожен технологічний процес є сукупністю фізичних, хімічних, біологічних впливів на сировину й напівфабрикати. У зв'язку з різноманіттям способів виробництва харчових продуктів їх доцільно розділити на групи, що базуються на спільності основних процесів обробки сировини й напівфабрикатів, а саме:

- *група виробництв, основаних на процесах бродіння.* До неї відносяться виробництво пива, спирту, вина, кисломолочних продуктів, випічка хліба. Особливістю цих виробництв є використання в технології мікроорганізмів, що викликають зброджування вуглеводів;

- *група виробництв, основаних на фізико-хімічних процесах.* Це виробництво цукру, крохмалю, рослинних олій і ін. Загальним для них є фізичні способи витягу із сировини корисних речовин (дифузійний або екстракційний витяг соку із плодів, олії з насіння) і хімічні методи їхньої подальшої обробки;

- *група механіко-теплофізичних виробництв.* Вона містить у собі мукомельно-круп'яне, макаронне, кондитерське, консервне виробництва. В основі виробництва продуктів цієї групи лежать механічні процеси змішування, поділу, сепарування, дроблення, здрібнювання й різні теплофізичні процеси (випічка, сушіння, обжарювання, стерилізація);

- *хімічні виробництва.* Це одержання патоки, харчової глюкози, жирових продуктів (маргарину, майонезу) шляхом переробки сировини хімічними методами.

У сучасній харчовій промисловості особливе місце займають виробництва першої групи, що базуються на життєдіяльності мікроорганізмів, так звані біотехнологічні виробництва. Інтенсивний розвиток біотехнології, у тому числі біотехнології харчових виробництв, в останні десятиріччя обумовлений не тільки успіхами біології, але й кризою традиційної технології, пов'язаною з подорожчанням або повним вичерпанням природних сировинних ресурсів.

Харчові мікробіологічні виробництва мають багатостадійний характер і включають, разом з мікробіологічними стадіями, ряд інших (нагрівання, дозування, фільтрування й ін.), які забезпечують здійснення основних мікробіологічних процесів, і від якості яких залежить одержання кінцевого результату.

Основними компонентами біотехнологічного процесу є: біологічний агент (культура мікроорганізмів), субстрат, цільовий продукт, апаратура й сукупність методів керування процесом. Розробка оптимальної біотехнології певного виду продукції – складне науково-технічне завдання, для вирішення якого необхідно:

- вибрати або селекціонувати культуру мікроорганізмів, здатну з максимально можливою швидкістю синтезувати біомасу або необхідний метаболіт;
- вибрати сировину, що містить речовини, необхідні для росту обраної культури;
- вибрати або сконструювати апарат (ферментер), придатний для вирощування цієї культури, оснащений відповідними комунікаціями й допоміжним обладнанням;
- підібрати обладнання й розробити технологію виділення й очищення цільового продукту.

Таким чином, виробництво продуктів мікробного синтезу, у тому числі харчових – це технологічний комплекс, біотехнологічна система, створювана з типових процесів (підсистем), у кожному з яких здійснюються відповідні фізичні, хімічні й біологічні перетворення. Такий системний підхід покладений в основу розрахунку й керування окремими процесами й технологічними лініями, дотримання вимог національних і

міжнародних стандартів якості харчових продуктів, проектування машин й апаратів харчових виробництв.

Біотехнологія є втіленням результатів фундаментальних досліджень фізіології, біохімії, генетики мікроорганізмів, проведених у рамках одного з найважливіших розділів мікробіології – промислової (технічної) мікробіології.

У сучасному розумінні промислова мікробіологія – це наука про найважливіші мікробіологічні процеси та їхнє практичне застосування для одержання індустріальним способом цінних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів. Частиною промислової мікробіології є мікробіологія харчових виробництв, що розробляє методи одержання харчових продуктів за допомогою різних мікроорганізмів, а також способи запобігання псування харчових продуктів, викликаного мікроорганізмами.

Сучасна промислова мікробіологія – відносно молода наука, що виникла приблизно 300 років тому. Однак вона має глибоке історичне коріння.

### *Загальні відомості про розвиток промислової мікробіології*

Людина з прадавніх часів почала використовувати діяльність мікроорганізмів, не підозрюючи про їхнє існування. Наприклад, хлібні напої, що нагадували сучасне пиво, виготовляли ще за 7000 років до н.е. Технологія приготування пива була добре розвинена у Вавилоні, звідки вона була запозичена Єгиптом, Персією, Грецією та іншими країнами. У Німеччині пивоварством почали займатися одночасно із землеробством. У Вірменії в IV ст. до н.е. вміли готувати міцне пиво. З IX ст. пиво набуло широке розповсюдження в Росії.

Як п'янкий напій багато давніх народів використовували також виноградний сік, що перебродив, – вино. У пірамідах Єгипту збереглися малюнки, що зображують технологію готування вина. Близько двох тисяч років тому почало розвиватися виноробство у Франції, а потім і в інших країнах Європейського континенту. На території колишнього Радянського Союзу (у Грузії, Вірменії, на узбережжі Азовського моря) вина також стали виготовляти з давніх часів. Бродильні напої в стародавності готува-

ли не тільки з винограду, але й з інших ягід (малини, ожини, кизилу). Азіатські степові народи зброджували в шкіряних мішках кобиляче молоко, перетворюючи його на кумис, японці готували саке – алкогольний напій з рису.

Процеси бродіння використовувалися й при готуванні тіста, хоча хлібопечення було «винайдене» пізніше пивоварства. У пірамідах Єгипту, побудованих близько 6000 років тому, знаходили короваї хліба. Єгиптяни для виробництва хліба використовували осад збродженого пивного сусла. З незапам'ятних часів хлібні коржі готували в Середній Азії й інших регіонах.

Історія залишила мало документів про час виникнення технології виготовлення кисломолочних продуктів. Однак можна стверджувати, що їх приготування було відоме вже на початку розвитку тваринництва. Дотепер збереглися народні способи приготування різних національних продуктів, що одержують на основі молочнокислого й спиртового бродіння: кисле молоко, кефір, кумис, мацоні, аеран й ін.

Значно пізніше навчилися одержувати етиловий спирт. Спочатку його застосовували лише в медицині під назвою «Aquata vitae» – вода життя. Горілка ввійшла в побут пізніше. В Європі заводи, що виробляють винний спирт, з'явилися в середині VII ст. Отримання етилового спирту описано у В'ятському літописі XII ст.

З розвитком скотарства й землеробства, а також появою в результаті цього деяких надлишків їжі виникла необхідність розробки методів зберігання продуктів. Використовували сушіння, заморожування, соління, квашення, а також виключали доступ повітря для зупинки аеробних процесів розкладання (наприклад, м'ясо заливали жиром). Цікаво відзначити, що багато практичних прийомів, що використовувалися для готування їжі, напоїв і для їхнього зберігання, розроблені в різних країнах, були ідентичні.

У другій половині XV ст. починається розвиток сучасного природознавства. На становлення й розвиток біології істотно вплинули успіхи хімії, яка в цей період з описової перетворюється на аналітичну. Сталася зрушення у вивченні суті процесів бродіння, з'явився термін «ферментація», а сам процес бродіння стали пов'язувати з наявністю в середовищі

дріжджів або ферментів. У XVI-XVII ст. спочатку у Франції, а потім повсюдно для розпушення тіста почали використовувати пивні дріжджі; пізніше, зі зміною й удосконаленням технології пивоварства, для цих цілей стали застосовувати дріжджі спиртових виробництв.

У цей же період вдалося вперше побачити мікроорганізми. Їх виявив голландський натураліст А. Левенгук за допомогою сконструйованого ним однолінзового мікроскопа, що дає збільшення у 280 разів. Створення до середини XVIII ст. досить сильних оптичних приладів дозволило описати велику кількість мікроорганізмів. Це, як відзначав К.А. Тімірязев, був блискучий дебют мікроскопа.

У цей же час була доведена здатність однієї речовини розкладати іншу, що послужило початком експериментального вивчення унікальної здатності ферментів до каталізу специфічних хімічних реакцій. Таким чином, розвиток описової мікробіології й вивчення хімічних перетворень стали важливою передумовою для становлення мікробіології й біохімії.

Плідні дослідження в напрямку вивчення мікроорганізмів були початі у 40-х роках XIX ст. Французький ботанік Ш. Каньяр-де-Латур (1837 р.) висловив припущення, що бродіння викликають дріжджі, які, на його думку, мають рослинне походження. Одночасно такою ж висновку дійшли німецькі вчені Т. Шванн і Ф. Кютцінг. Однак теорія про біологічну природу бродіння піддалася атаці з боку високоавторитетних хіміків – Ю. Лібіха, Ф. Велера, І. Я. Берцеліуса. Загальноприйнятим була думка Лібіха про те, що бродіння – це хімічне явище, що викликається в різноманітних тілах білковими речовинами, які розкладаються.

Формування мікробіології як науки пов'язане з роботами видатного французького вченого Луї Пастера (1822–1895). В історії світової науки важко знайти іншого дослідника, чії роботи мали б таке велике теоретичне значення й разом з тим дали б такий значний практичний ефект. На думку К. А. Тімірязєва, Пастер здійснив такий вплив на практичні сторони людської діяльності, якого не робила жодна людина за всю історію цивілізації. Працюючи у галузі прикладної мікробіології, Пастер зробив ряд найбільших фундаментальних відкриттів, які заклали основи сучасної промислової мікробіології. Пастер незаперечно довів, що хвороби, псування продуктів, бродіння й гниття викликаються мікроорганізмами, і

створив теорію про екзогенність потрапляння цих організмів у середовище. Цим була доведена неспроможність існуючої в той час теорії самозародження мікроорганізмів. Роботи Пастера заклали наукові основи виноробства, пивоварства, виробництва спирту й оцту, боротьби з інфекційними хворобами. Багато рекомендацій Пастера, зокрема, прогрівання до температур, що знищують шкідливі мікроорганізми, але не впливають на якість продукту (згодом цей процес одержав назву пастеризації), широко застосовуються й зараз у виноробній, молочній й інших галузях харчової промисловості. У ХІХ ст. із розвитком хімічних наук були закладені основи органічної хімії. У цей період були відкриті багато органічних кислот, гліцерин, холестерин, глюкоза, перші амінокислоти. Було закладено наукові основи біологічної обробки й знезараження стоків. Відомі із часів Давньої Індії й Римської імперії, очисні споруди, що прийшли в занепад у середні віки, у зв'язку з бурхливим розвитком промисловості на рубежі ХІХ–ХХ ст. знову стали об'єктом пильних досліджень. У цей період почала розвиватися ензимологія.

Величезний внесок у розвиток мікробіології зробили російські і радянські вчені: Д. І. Іванівський, М. Ф. Гамалія, Д. К. Заболотний, Л. С. Ценковський та ін. Значна роль у розвитку технічної мікробіології належить С. П. Костичеву, С. Л. Іванову й А. І. Лебедеву, які вивчили хімізм процесу спиртового бродіння, що викликають дріжджі.

На початку ХХ ст. у харчовій промисловості почалося перетворення з кустарних виробництв у великі. Це вимагало проведення процесів за задалегідь установленими технологічними схемами. На теоретичну розробку біохімічних і мікробіологічних процесів, на яких базуються технології готування харчових продуктів, були спрямовані зусилля ряду вчених. В. Л. Омелянський, В. А. Ніколаєв, Г. Л. Селібер й інші дослідники вивчали мікроорганізми хлібопекарського виробництва й розробляли наукові основи бродіння тіста. Роботи С. А. Корольова, А. Ф. Войткевича та інших учених по мікробіології молока й молочних продуктів сприяли розвитку цієї галузі виробництва.

Для підйому сільського господарства проводили дослідження з бактеріальних добрив і силосування кормів.

Розвивалися й нові мікробіологічні виробництва. На основі досліджень В.Н. Шапошнікова і його співробітників у 20-х роках було розроблено мікробіологічне виробництво молочної й масляної кислот, а в 30-х роках – ацетону й бутилового спирту. Дослідження хімізму утворення лимонної кислоти грибами, проведені під керівництвом В.С. Буткевича й С.П. Костичева, дозволили організувати у 1933 р. її перше промислове виробництво в колишньому СРСР. Велике значення мали роботи з використання целюлозної сировини для одержання спирту, фурфуролу, кормових дріжджів й інших продуктів. У 30-ті роки в СРСР було організоване виробництво технічних препаратів деяких ферментів і вітамінів (ергостерин – провітамін В<sub>2</sub>) мікробіологічним способом.

Пріоритетним досягненням було відкриття радянськими вченими Г. А. Надсоном і Г. С. Філіпповим (1925) мутагенної дії рентгенівського випромінювання на мікроорганізми. З початку 40-х років у різних країнах мікроорганізми стали об'єктом інтенсивних генетичних досліджень. На початку ХХ ст. було введено терміни «мутація», «ген», виникла гіпотеза про те, що хромосоми є матеріальними носіями спадкоємних ознак. Російський цитолог С. Г. Навашин розкрив особливості структури хромосом і заклав основи хромосомної теорії спадковості.

Таким чином, на початку цього періоду (40-і роки ХХ ст.) відбувалося в основному вдосконалювання технології існуючих виробництв, а потім, завдяки успіхам мікробіології, біохімії й інших наук, у результаті застосування прогресивної апаратури й технологій виникла основа для організації нових виробництв. У цей період стали випускати нові екологічно чисті біодобрива й біологічні препарати для боротьби зі шкідниками й хворобами сільськогосподарських рослин, виникли виробництва органічних розчинників, спиртів, почалося промислове випробування біотехнологічних процесів переробки й використання рослинних відходів.

Револьюційним моментом цього періоду була промислова реалізація технології виробництва антибіотиків, застосування яких мало величезне значення в лікуванні інфекційних хвороб. Необхідність розробки апаратури для організації виробництва антибіотиків зумовила значне підвищення ролі технічних наук у мікробіологічній промисловості.

Досвід виробництва антибіотиків мав також принциповий вплив на розвиток інших галузей мікробіологічної промисловості. Ферменти мікроорганізмів (бактерій і грибів) стали поступово витіснити ферменти рослинного й тваринного походження. У 1948 р. було показано, що за допомогою мікроорганізмів можна одержувати вітамін В<sub>12</sub>, який ні рослини, ні тварини не синтезують.

Після Другої світової війни в ході інтенсивного розвитку промислових біотехнологій були організовані виробництва амінокислот, білка одноклітинних, перетворення стероїдів, освоєно культивування клітин тварин і рослин. Різко розширилися дослідження із селекції й генетики мікроорганізмів. Використання фізичних і хімічних мутагенів дозволило значно збільшити продуктивність вихідних штамів, а отже, й продуктивність підприємств.

Важливим досягненням промислової мікробіології була розробка теорії й широке практичне впровадження безперервного культивування мікроорганізмів. Емпірично розроблені напівбезперервні системи культивування, при яких через певні проміжки часу відбирається частина середовища й додається еквівалентна кількість свіжого середовища, застосовувалися давно. Наприклад, так одержували оцет за методом, запропонованим у 1823 р. німецьким ученим Шюценбахом. Безперервне спиртове бродіння в батареях апаратів було розроблено на початку століття С. В. Лебедевим. Однак широке промислове впровадження методу безперервного культивування почалося лише в другій половині ХХ ст. після розробки математичної основи теорії цього процесу, вивчення основ регуляції росту й розвитку мікроорганізмів, способів впливу на їх обмін речовин і створення апаратури для строгого контролю параметрів культивування.

Неухильно зростає кількість видів сировини, що використовується для мікробіологічного синтезу. Поряд із традиційними джерелами вуглецевої сировини – вуглеводами, застосовують рідкі й газоподібні вуглеводні (н-парафіни, природний газ і т.д.) та їхні окислені похідні (метанол, етанол); проводяться роботи з використання молекулярного водню. Велика увага приділяється застосуванню різних відходів промисловості, сільського й лісового господарства.

Останнім часом значно розширилися сфери застосування продукції, отриманої мікробіологічним синтезом. Мікробіологія впровадилася в такі традиційно небіологічні виробництва, як одержання енергетичної сировини (біогаз), видобуток нафти, металів.

Ера новітніх біотехнологічних процесів, що виникла протягом останніх 25–30 років, пов'язана з використанням іммобілізованих ферментів. Бурхливий розвиток в цей час генетичної та клітинної інженерії сприяє тому, що біотехнології поступово завойовують все нові й нові галузі виробництва й рішуче впроваджуються у різноманітні сфери діяльності людини.

Впровадження новітніх методів біотехнології дозволяє інтенсифікувати екологічно чисті технології відтворення їжі й кормових препаратів, вирішувати завдання забезпечення людства матеріальними й енергетичними ресурсами, а також проблеми охорони навколишнього середовища.

## РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ ПРО МІКРООРГАНІЗМИ

Керувати мікробіологічними процесами, що використовуються у виробництві харчових продуктів, підсилювати й інтенсифікувати корисну діяльність мікроорганізмів і ліквідувати їхні шкідливі впливи неможливо без знання основ мікробіології.

*Мікробіологія* (від грец. *micros* – малий, *bios* – життя, *logos* – навчання) – частина загальної науки біології; вона вивчає зовнішню форму, внутрішню будову, закономірності росту й розвитку, життєдіяльність мікроорганізмів. Мікроорганізмами прийнято називати дрібні живі істоти, розміри яких менше роздільної здатності людського ока (0,2 мм) або трохи перевищують її.

### 1.1. Місце мікроорганізмів у системі живого світу. Особливості мікроорганізмів

Ще на ранніх етапах розвитку біології світ живих організмів вчені поділяли на два царства: царство рослин і царство тварин. З відкриттям мікроорганізмів були спроби розподілити їх між цими царствами. Однак поступове нагромадження знань про мікроорганізми, їхня надзвичайна розмаїтість зробила неможливим віднесення деяких видів до певного царства. Виявилось, що клітини одних мікробів за своєю структурою нагадують клітини тварин, а ув інших – вони подібні до рослинних, треті – можуть об'єднувати ознаки тих й інших або істотно відрізнятися від них.

У 1866 р. німецький біолог Е. Геккель запропонував виділити мікроорганізми в третє царство живої природи й назвав його «царство протистів». Основу будови всіх клітин протистів, як і клітин вищих тварин і рослин, становлять цитоплазма і ядро. Однак розвиток електронної мікроскопії дозволив виявити принципово важливі відмінності у внутрішній структурі кліток протистів. Виявилось, що незважаючи на подібність структурної, біохімічної й фізіологічної організації, властивої всім живим організмам, царство протистів можна чітко розділити на дві великі групи: еукаріотів і прокаріотів.

До *еукаріотних* мікроорганізмів відносяться багато водорослій, гриби й найпростіші. За будовою клітин вони принципово не відрізняються від макроорганізмів, сюди включають вищі рослини й тварин, які також є еукаріотами. Для всіх еукаріотів характерною є наявність у клітинах ядра, оточеного мембраною. В ядрі міститься набір хромосом, що є носіями ДНК, в якій закодovано основну генетичну інформацію. У частини еукаріотних мікроорганізмів, разом із вегетативним і безстатевим розмноженням, виявлена здатність до статевого процесу.

*Прокаріоти*, або бактерії, поєднують тільки мікроформи. Організація їх клітин більш проста, ніж в еукаріотів. Ядро прокаріотів – *нуклеоїд* – не оточено мембраною й представлено однією молекулою ДНК кільцевого характеру. Мітохондрії й інші відособлені органели, властиві еукаріотам, у прокаріотів відсутні, а їх функції виконують клітинна мембрана й (або) внутрішньоклітинні мембрани, які зазвичай з неї утворюються. Розмноження бактерій найчастіше відбувається шляхом бінарного розподілу, рідше брунькуванням, утворенням екзоспор або іншими безстатевими способами.

Іноді до мікроорганізмів відносять і віруси. Але частіше їх розглядають як особливу категорію біологічних об'єктів, оскільки вони не мають клітинної будови, містять на відміну від еукаріотів і прокаріотів лише один тип нуклеїнових кислот (ДНК або РНК) і розмножуються тільки в клітинах хазяїна, якими можуть бути різні організми, у тому числі бактерії.

Таким чином, границя, що розділяє всі клітинні форми життя на дві групи, які відповідають двом типам клітинної організації, проходить через царство протистів.

Наука про розподіл живих організмів за окремими групами – таксонами – називається *систематикою*. *Класифікація й номенклатура* – дві основні області систематики. Основна одиниця в системі живих організмів – вид. Під *видом* мають на увазі сукупність організмів, що мають загальне походження та характеризуються загальними морфологічними й фізіологічними ознаками й пристосовані до існування в певних умовах зовнішнього середовища. Види об'єднують у таксони більш високого рангу – роди. *Роди* у свою чергу групують у *сімейства*, *сімейства* – у по-

рядки, порядки – у класи й т.д. Вищим рівнем таксонометричної ієрархії є царство.

Для найменування виду прийнята бінарна номенклатура. Видова назва складається із двох слів. Перше позначає рід і пишеться із прописної літери, друге – вид, до якого належить організм, – пишеться з малої літери.

*Приклад:* дріжджі роду *Candida* можуть відноситися до видів *utilic*, *scottii*, *tropicalis* й ін.

Відмітні ознаки мікроорганізмів – мізерно малі розміри й простота біологічної організації. Величина мікробів вимірюється мікро- або нанометрами й коливається в значному інтервалі для організмів різних систематичних груп. Основна маса навіть найбільших представників мікросвіту за розміром не перевищує 100 мкм. Дрібні мікроорганізми (ультрамікроби) мають розміри 0,016–0,26 мкм. Завдяки невеликим розмірам мікроорганізми легко переміщуються з потоками повітря, по воді й іншими способами. Тому вони швидко поширюються й зустрічаються в самих різних місцях, включаючи й ті, де інші форми життя відсутні.

Мікроорганізмам належить важлива роль у природних процесах, а також у практичній діяльності людини. Пояснюється це рядом причин.

Важливою властивістю мікроорганізмів є їхня здатність до швидкого розмноження. Відомі бактерії, які діляться кожні 30–60 хв. і навіть через 8–10 хв. У результаті з однієї клітини масою близько  $2,5 \cdot 10^{-12}$  г за 2–4 доби в умовах, що забезпечують активний ріст, могла б утворитися біомаса вагою близько  $10^{10}$  т й більше. Насправді цього не відбувається, тому що діють різні обмежуючі фактори. Але здатність мікроорганізмів до швидкого розмноження набагато перевищує здатність до цього рослин та тварин.

Ще одна важлива особливість мікроорганізмів – здатність пристосовуватися до мінливих умов навколишнього середовища. Виняткова пластичність обмінних процесів дозволяє мікробам з більшою або меншою легкістю адаптуватися до найрізноманітніших фізичних і хімічних факторів навколишнього середовища.

Третє, що характеризує мікроорганізми, – це розмаїтість фізіологічних і біохімічних властивостей. У результаті деякі з них можуть розвива-

тися у так званих екстремальних умовах, які для більшості інших організмів несприятливі або взагалі не підтримують ріст.

## 1.2. Морфологічна характеристика мікроорганізмів

Морфологія мікроорганізмів вивчає форму й особливості будови клітин, їхню здатність рухатися, способи розмноження й ін.

Основними об'єктами мікробіології харчових виробництв є гриби, дріжджі й бактерії – найбільш важливі для народного господарства мікроорганізми. Різноманітні функції, які здійснюють мікроорганізми в процесі життєдіяльності, обумовлені високим ступенем організації клітин та їхньою складною структурою.

### 1.2.1. Структура еукаріотичної клітини

До мікроорганізмів-еукаріотів належать гриби й дріжджі. Гриби становлять велику групу організмів зовсім особливої біологічної організації (рис. 1.1 *а, б*). Тіло більшості грибів складається з тонких ниток – *гіф*, які утворюють розгалужену структуру, що називається *міцелієм*. Гіфи являють собою тверді трубочки, заповнені багатоядровою цитоплазмою. Гриби харчуються, поглинаючи всією поверхнею тіла різноманітні органічні речовини. Основне місце обитання грибів – ґрунт, але деякі види живуть й у водному середовищі. Серед грибів є багато форм, що паразитують у живих організмах, у тому числі в організмі людини, і викликають їхні захворювання.

В основу систематики грибів покладені способи розмноження. Типи безстатевого розмноження дуже різноманітні: за допомогою спор, шляхом брунькування, обривками гіфів. Безстатеве розмноження чергується зі статевим, яке, як й у всіх еукаріотів, полягає у злитті двох ядер. Розрізняють нижчі й вищі гриби. Нижчі, або примітивні, гриби відносяться до класу фікоміцетів. Міцелій фікоміцетів несептований, тобто гіфи не мають поперечних перегородок. Спори утворюються усередині спеціальних структур.

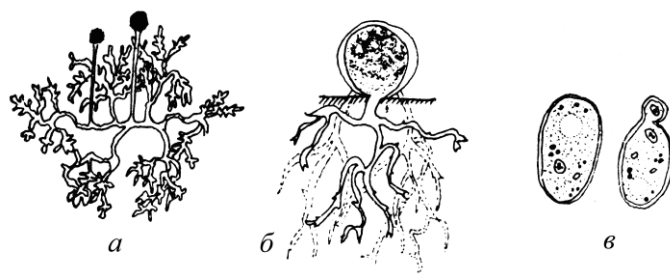


Рисунок 1.1 – Гриби: *a* – *Mucor mucedo*; *б* – водний фікоміцет;  
*в* – дріжджі

Вищі гриби мають септований міцелій. У гіфах цих грибів через певні проміжки утворюються поперечні перегородки. Багато вищих грибів широко використовуються в харчовій промисловості. Наприклад, окремі види грибів роду *Aspergillus* застосовують при виробництві лимонної кислоти, ферментних препаратів, а гриби роду *Penicillium* використовують у фармацевтичній промисловості й для готування сиру.

Окрему групу грибів становлять дріжджі. Це одноклітинні мікроорганізми, що не утворюють міцелію (рис. 1.1, *в*). Застосування дріжджів у промисловості пов'язане з їхньою здатністю перетворювати цукор в етиловий спирт. Дріжджі застосовують у хлібопеченні, пивоварстві, виноробстві, спиртовій промисловості. Схема будови дріжджової клітини представлена на рис. 1.2.

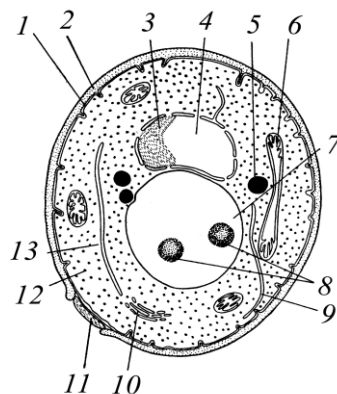


Рисунок 1.2 – Схема будови дріжджової клітини:  
1 – цитоплазматична мембрана; 2 – клітинна стінка; 3 – ядерець;  
4 – ядро; 5 – жирові краплі; 6 – мітохондрії; 7 – вакуоль; 8 – гранули поліфосфату; 9 – мембрани апарата Гольджи; 10 – диктіосоми;  
11 – бруньковий рубець; 12 – рибосоми; 13 – цитоплазма

Дріжджі можуть мати овальну, яйцеподібну або округлу форму. Розміри дріжджів варіюються в різних видів від 1,5 до 10 мкм завширшки й від 2 до 20 мкм (іноді до 50 мкм) у довжину. Клітини дріжджів, як і всіх еукаріотів, мають добре розвинутий мембранний апарат – цитоплазматичну мембрану, ендоплазматичну мережу, апарат Гольджи, мітохондрії.

У цитоплазмі є ядро, вакуолі, включення запасних поживних речовин: ліпідів, глікогену й ін. Клітинні структури виконують специфічні функції.

*Клітинна стінка* виконує функцію механічного бар'єра. Вона захищає клітину від впливу зовнішнього середовища, підтримує осмотичний тиск у ній, бере участь у транспортуванні живильних речовин і метаболітів. Завдяки пористості стінки, діаметр пор якої становить близько 3 нм, у клітину проникають в основному низькомолекулярні речовини (вода, солі, цукри, вуглеводні й ін.) і виводяться продукти метаболізму (діоксид вуглецю, амінокислоти, спирти, кислоти й ін.).

До складу клітинної стінки входять полісахариди (70 % сухої маси), ліпіди, білки й ін. Товщина її становить близько 400 нм.

*Цитоплазматична мембрана* – тонка (7–8 нм) мембрана, розташована під клітинною стінкою й відокремлює її від цитоплазми. Вона забезпечує вибіркоче транспортування поживних речовин з навколишнього середовища в клітину й виведення метаболітів із неї. Мембрана складається з бімолекулярного шару ліпідів, у який включені білкові молекули. Транспорт речовин через цитоплазматичну мембрану здійснюється шляхом звичайної молекулярної дифузії (за градієнтом концентрації) і за допомогою механізмів активного транспорту, у яких беруть участь специфічні ферменти. У цьому випадку речовини можуть проникати в клітину й проти градієнта концентрацій. Активний транспорт речовин пов'язаний з витратою енергії й здійснюється через дрібні отвори в цитоплазматичній мембрані – *пори*. Крізь них у клітину проникають іони й молекули. Наприклад, амінокислоти легко проникають із середовища в клітину, навіть якщо їхня концентрація в цитоплазмі в 100–200 разів вище, ніж у навколишньому середовищі.

*Цитоплазма* – основна маса клітини. Вона міститься в оболонці клітки і являє собою колоїдний розчин амінокислот, ферментів, вуглеводів,

мінеральних солей і багатьох інших речовин у воді. У цитоплазмі знаходиться цілий ряд оформлених структур, що мають закономірні особливості будови й поведінку. Кожна із цих структур несе певну функцію. Звідси виникло їхнє зіставлення з органами цілого організму, у зв'язку з чим вони одержали назву *органойди* або *органели*. Це – мітохондрії, апарат Гольджи, рибосоми, ендоплазматична мережа й т.д.

*Рибосоми* виконують у клітині функцію синтезу білка. Вони являють собою сферичні частки діаметром 15–35 нм, що складаються із двох субодиниць нерівних розмірів й містять приблизно рівну кількість білків і РНК.

В одній клітині містяться тисячі рибосом. Синтез білка здійснюється групою, що включає до декількох десятків об'єднаних рибосом. Таку групу рибосом називають полісомою (рис. 1.3).

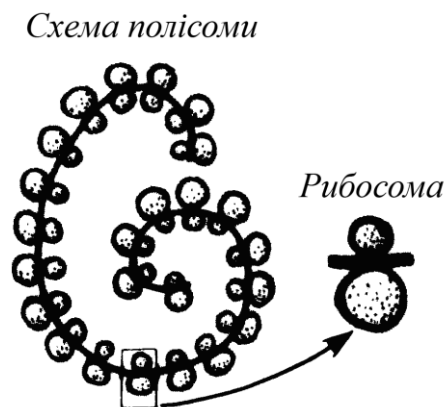


Рисунок 1.3 – Схема полісоми й рибосоми

Синтезовані білки спочатку накопичуються в каналах *ендоплазматичної мережі*, а потім транспортуються до органойдів і ділянок клітини, де вони споживаються. Ендоплазматична мережа й рибосоми являють собою єдиний апарат біосинтезу й транспортування білків.

*Ендоплазматична мережа* – це мембранна система, що складається з каналців, пухирців, які не мають строго певної локалізації, а розташовуються або по периферії клітини, або пронизують всю цитоплазму. На них розміщені різні ферменти, відповідальні за синтез ліпідів, вуглеводів, за транспорт речовин усередині клітини.

*Апарат Гольджі* – система мембран, пов’язаних з ядерною мембраною й мембранами ендоплазматичної мережі. Він розташований на ділянці цитоплазми, де немає рибосом. В апараті Гольджі відбувається синтез матеріалу клітинної стінки й нових мембран, з його допомогою також здійснюється транспортування речовин, синтезованих в ендоплазматичній мережі, і видалення із клітини продуктів обміну.

*Мітохондрії* являють собою органели паличкоподібної форми, покриті оболонкою із двох мембран (рис. 1.4). Мітохондріальні мембрани складаються з білків (80 %) і ліпідів (20 %).

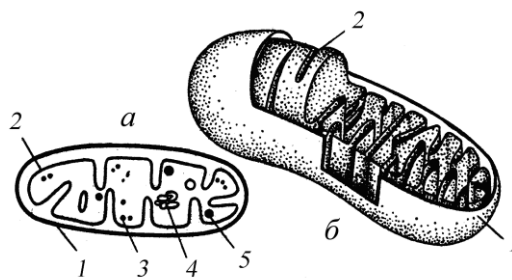


Рисунок 1.4 – Схема будови мітохондрії:

*a* – поздовжній розріз; *б* – тривимірна схема організації мітохондрії:  
*1* – зовнішня мембрана; *2* – внутрішня мембрана; *3* – рибосома; *4* – кільцева молекула ДНК; *5* – гранула-включення

Мітохондрії розмножуються самостійно; здатність до розмноження зумовлена присутністю в них молекули ДНК.

Основна функція мітохондрій – синтез універсального джерела енергії – АТФ (аденозинтрифосфат). При розпаді АТФ виділяється велика кількість енергії, використовуваної клітиною при синтезі різних речовин, виробленні тепла, необхідного при русі й інших фізіологічних процесах.

*Ядро* – найважливіша складова частина клітини, що забезпечує зберігання й передачу спадкоємної інформації. Воно містить ядерну оболонку, ядерний сік, ядрце, хромосоми (молекули ДНК і пов’язані з нею білки). *Ядерна оболонка* відокремлює ядро від цитоплазми й складається із двох мембран – зовнішньої і внутрішньої, простір між якими заповнено напіврідкою речовиною. В оболонці знаходиться безліч дрібних пор, крізь які з ядра в цитоплазму й назад надходять білки, вуглеводи, жири, вода, тобто здійснюється безперервний обмін речовин між ядром і прото-

плазмою. *Ядерний сік* – напіврідка речовина, що перебуває під ядерною оболонкою і являє собою внутрішнє середовище ядра. У ядерному соку знаходиться ядрце й хромосоми.

*Ядрце* являє собою щільне округле тільце; у ньому синтезуються й накопичуються попередники рибосом, які потім транспортуються крізь пори ядра в цитоплазму. *Хромосоми* мають форму найтонших ниток, кожна з яких являє собою одну молекулу ДНК у з'єднанні з білком. Хромосоми передають генетичну інформацію.

### 1.2.2. Будова прокаріотичної клітини

Клітини нижчих протистів мають у структурній організації ряд принципових особливостей у порівнянні із клітинами вищих протистів.

Різна будова ядерного апарата – не єдина ознака, що відрізняє прокаріотичну клітину від еукаріотичної. Крім розходження в генетичній організації клітини, найважливішими особливостями прокаріотів є:

- 1) відсутність системи мембран, що формують ендоплазматичну мережу;
- 2) відсутність структурно оформлених органел, таких, як мітохондрії, комплекс Гольджи.

Особливості структурної організації зумовлюють і ряд функціональних відмінностей клітин прокаріотів від клітин еукаріотів. Клітини величезної більшості прокаріотів значно менше еукаріотичних клітин, тому величина відношення поверхні до об'єму в них більше, а отже, і обмін речовин з навколишнім середовищем більш інтенсивний. Кількість форм клітин прокаріотів невелика. Найчастіше вони мають сферичну форму або вигляд прямих і вигнутих паличок.

Однак фізіологічні особливості цієї групи мікробів і процеси, здійснювані ними, вражають своєю надзвичайною розмаїтістю.

Велику групу прокаріотів становлять бактерії. У клітині бактерій (рис. 1.5) розрізняють поверхневі структури й протопласт. Протопласт складається із цитоплазми й нуклеоїда, оточених цитоплазматичною мембраною. У цитоплазмі бактеріальної клітини виявляється від 5 до 50 тис. рибосом, більш дрібних, ніж рибосоми еукаріотів. Величезна кількість рибосом надає цитоплазмі вигляду зернистої маси. Цитоплазматич-

на мембрана має тришарову структуру, при цьому зовнішні шари – білкові, а внутрішній – складається з ліпідів.

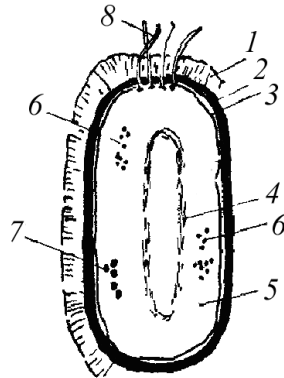


Рисунок 1.5 – Схема будови бактеріальної клітини:

1 – слизиста капсула; 2 – клітинна стінка; 3 – цитоплазматична мембрана; 4 – нуклеоїд; 5 – цитоплазма; 6 – рибосоми; 7 – запасні речовини; 8 – джгутики

Функції цитоплазматичної мембрани різноманітні. Маючи вибіркочу проникність, тобто здатністю пропускати певні сполуки, мембрана виконує функцію органели, що концентрує необхідні речовини усередині клітини й сприяє виведенню назовні продуктів життєдіяльності. Цитоплазматична мембрана служить місцем локалізації різноманітних ферментів, на її поверхні відбувається синтез речовин зовнішніх структур клітини. У цитоплазмі бактерій виявлені різноманітні включення. Одні являють собою запасні речовини, що відкладаються клітиною в період рясного харчування, інші – продукти життєдіяльності клітини, що не виділяються назовні. Різні види бактерій як запасні речовини відкладають полісахариди (глікоген, крохмаль), ліпіди (гранули й крапельки жиру). Один з найважливіших структурних елементів бактеріальної клітини – клітинна стінка. Вона служить якби кістяком клітини, надаючи їй певної форми, захищає її від впливу зовнішнього середовища, забезпечує необхідну механічну міцність. У деяких видів бактерій на поверхні клітини утворюється слизиста капсула. Вона служить додатковим осмотичним бар'єром, що охороняє клітину від висихання й механічних ушкоджень.

У бактерій виділяють три основні форми клітини: сферичну, циліндричну й звиту.

Сферичні, або кулясті, бактерії називаються *коками* (від грец. *coccus* – ягода). У різних видів бактерій закономірність розташування клітин після розподілу неоднакова (рис. 1.6).

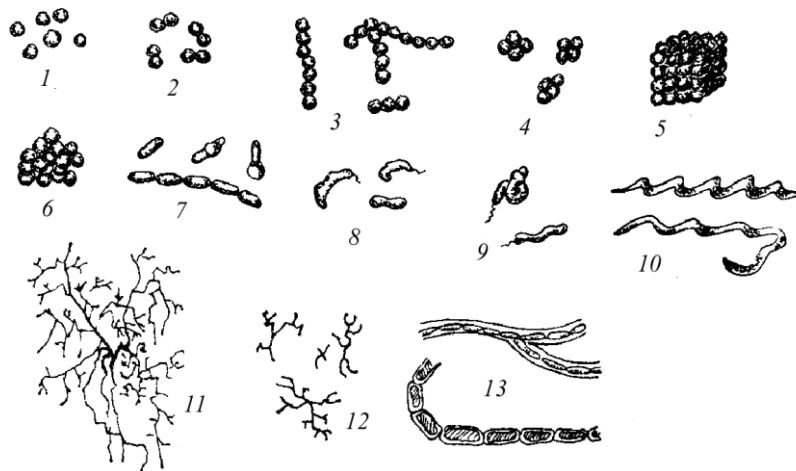


Рисунок 1.6 – Морфологічні типи бактерій:

1 – монококи; 2 – диплококи; 3 – стрептококи; 4 – тетракоки; 5 – сарцини; 6 – стафілококи; 7 – палички; 8 – вібріони; 9 – спірили; 10 – спірохети; 11 – актиноміцети; 12 – мікобактерії; 13 – нитчасті бактерії

Залежно від цього розрізняють:

- 1) *монококи* – одиночні клітини;
- 2) *диплококи*, що групуються попарно, тому що розподіл клітин відбувається в одній площині;
- 3) *стрептококи*, клітини яких також діляться в одній площині, але особини не відокремлюються одна від одної й формують довгі ланцюжки;
- 4) *тетракоки*, що утворюють групи із чотирьох клітин, що обумовлено розподілом клітини у двох взаємно перпендикулярних площинах;
- 5) *сарцини*, що мають вигляд скупчень кубічної форми в результаті розподілу в трьох взаємно перпендикулярних площинах;
- 6) *стафілококи*, що діляться неправильно в декількох площинах, скупчення яких нагадують гроно винограду.

Діаметр кулястих бактерій не перевищує 1–2 мкм. Циліндричні, або паличкоподібні, бактерії, як і коки, можуть бути одиночними, з'єднува-

тися попарно або в довгий ланцюжок по три і більше клітин. Середня довжина палочкоподібних бактерій становить 2–7 мкм при діаметрі 0,5–1 мкм. Однак є як значно більші форми, так і дуже дрібні, величина яких перебуває на грані видимості у звичайні світлові мікроскопи (0,1–0,2 мкм).

Звиті форми бактерій залежно від ступеня зігнутості підрозділяють на вібріони, спірили й спірохети. Самі дрібні з них – *вібріони* – мають вигляд коми. Довжина клітин вібріонів не перевищує 1–3 мкм. Клітини *спірил* довжиною від 5 до 30 мкм мають один або кілька завитків. Характерна риса *спірохет* – у край малий діаметр клітини (0,1–0,6 мкм) при відносно великій (5–500 мкм) довжині тіла. Клітини спірохет мають вигляд штопора, покриті еластичною оболонкою, що дозволяє їм гвинтоподібно згинати тіло.

Трохи окремо стоять нитчасті бактерії, що представляють собою довгі нитки зі з'єднаних разом палочкоподібних клітин, покритих спільною тонкою оболонкою – *чохлом*.

Нитчасті бактерії – типові водні організми. Нитки їх мають товщину в середньому 1–7 мкм. Нитчасті бактерії відносяться до найбільш великих, деякі з них видимі навіть неозброєним оком. Серед нитчастих бактерій найбільш відома *Sphaerotilus natans*, що живе в стічних водах, у забрудненій проточній воді. Вона утворює у воді нитки й пластівці. Бурхливий розвиток цих бактерій може привести до заростання труб.

Кожному виду бактерій властиві певні форма й розмір, на які значний вплив мають умови росту.

*Спороутворення*. Деякі види бактерій, головним чином палочкоподібні, здатні утворювати спори. Як правило, спороутворення індуціюється несприятливими умовами середовища: зниженням вмісту вологи, відсутністю поживних речовин, зміною рН і т.д. Спороутворення – складний процес, у результаті якого в клітині формується ендоспора, що відрізняється від вегетативної клітини структурою й хімічним складом (рис. 1.7).

Процес починається зі зневоднювання й ущільнення цитоплазми в ядерній зоні й відокремлення цієї зони із ДНК за допомогою перегородки, що утворюється із цитоплазматичної мембрани. Потім на відсіченій ділянці цитоплазми формується двошарова мембрана – зовнішня й внутрішня –

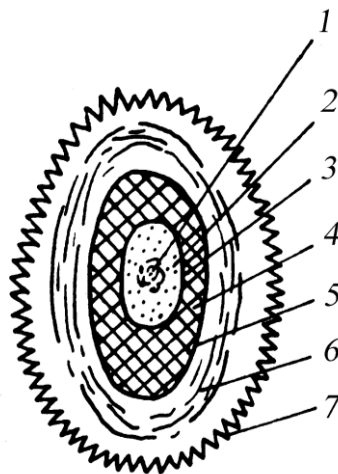


Рисунок 1.7 – Схема будови бактеріальної спори:

1 – нуклеоїд; 2 – цитоплазма; 3 – внутрішня мембрана; 4 – кортекс;  
5 – зовнішня мембрана; 6 – багатошарові покриви; 7 – екзоспориум

між якими розташовується *кортекс* (кора), подібний за хімічним складом до клітинної стінки вегетативної клітини та виконує захисну функцію. Поверх зовнішньої мембрани утворюються багатошарові покриви спори, що складаються в основному з білків. Процес утворення спори протікає кілька годин. Коли спора сформується, оболонка й інші частини клітини руйнуються, і спора звільняється. Особливість бактеріальних спор – їхня висока термостійкість. Наприклад, спори збудника важкого харчового отруєння – ботулізму – витримують нагрівання до 100 °С протягом 5–6 годин. Спори переносять висушування, вплив ультрафіолетових променів, отруйних речовин та ін. Стійкість спор пов'язана з тим, що їхні покриви важкопроникні, у них міститься багато ліпідів і кальцію. Активність ферментів у них подавлена. Висока термостійкість спор обумовлена низьким вмістом у них води, що захищає білки від денатурації при високих температурах.

Спори бактерій можуть зберігати життєздатність десятки й навіть сотні років. Потрапляючи в сприятливі умови, спора проростає. Процес перетворення спори в зростаючу (вегетативну) клітину починається з поглинання нею води й набрякання. При цьому відбуваються глибокі фізіологічні зміни: підсилюється дихання, активізуються ферменти, під дією

яких розчиняються оболонки, і спора проростає у вегетативну клітину. У цей же період спори втрачають свою термостійкість.

Псування харчових продуктів викликають лише вегетативні клітини бактерій. Тому необхідно знати умови, що сприяють утворенню спор і їхньому проростанню у вегетативні клітини, щоб правильно вибрати спосіб обробки харчових продуктів з метою запобігання їхнього псування під впливом бактерій.

### 1.2.3. Ультрамікроби

Ультрамікроби – єдині представники живого світу, що не мають клітинної будови. До них відносяться віруси – внутрішньоклітинні паразити, що вражають клітини тварин, рослин і мікроорганізмів. Вони були відкриті у 1892 р. російським ботаніком Д. І. Іванівським при вивченні хвороби тютюну – тютюнової мозаїки. Це дрібні організми, які вдалося побачити тільки в електронний мікроскоп. Розміри вірусів коливаються від 10–12 нм (віруси ящура, поліомієліту) до 200–250 нм (віруси віспи, герпеса). Особливість паразитизму вірусів полягає в тому, що вони діють на генетичному рівні. Не володіючи властивою будь-якій клітині здатністю до синтезу білка, вони впроваджують у клітину свій генетичний матеріал, у результаті чого клітина починає синтезувати вірусні частки.

Поза клітиною віруси існують у вигляді *віріонів* – вірусних часток, що перебувають у спочиваючому стані. Віріони виявляються в повітрі, ґрунті, природній і стічній воді. Розмір, форма й хімічний склад віріонів дуже різноманітні. У вірусній частці розрізняють дві основні структури: білкову оболонку й генетичний матеріал вірусу, представлений однією молекулою ДНК або РНК.

Віруси можуть бути паразитами не тільки для людини, тварин, рослин, але й для мікроорганізмів – грибів, бактерій. Такі віруси одержали назву *фагів* (буквально фаг – пожирач). Віруси бактерій називаються *бактеріофаги* (пожирач бактерій), грибів – *мікофаги*. Розміри фагів коливаються від 40 до 140 нм. На рис. 1.8 показана будова бактеріофага.

Фаг має голівку 1, усередині якої укладена ДНК, порожній стрижень 2, покритий чохлам 3, базальну пластинку із шипами 4 і відростки 5. Відростки сприяють адсорбції фагової частки на поверхні клітини. Чохол

бактеріофага здатний скорочуватися. При його скороченні стрижень проходить через клітинну стінку й мембрану, і фаг, діючи як шприц, впроркує свою ДНК усередину клітини. Фагова ДНК так перебудовує механізм обміну бактерії, що в ній починають синтезуватися частки фага. Через певний час весь вміст клітини перетворюється в зрілі фагові частки, оболонка клітини розчиняється, і фаги виходять назовні.

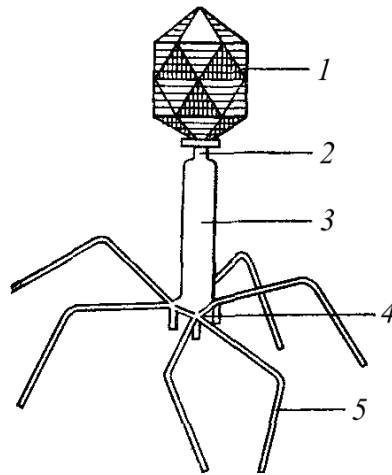


Рисунок 1.8 – Схема будови бактеріофага

Бактеріофаги завдають великої шкоди виробництву молочних продуктів (сиру, сметани), маргарину. Вони вражають в основному молочнокислі стрептококи заквасок, використовуваних для одержання цих продуктів. Під впливом бактеріофага клітини стрептококів лізуються (розчиняються) і гинуть.

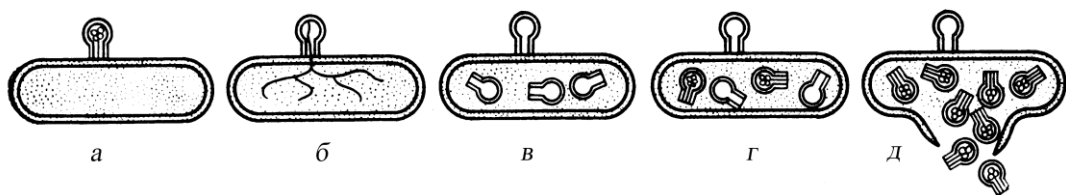


Рисунок 1.9 – Схема розвитку фага в бактеріальній клітці:  
*а* – адсорбція; *б* – перехід ДНК у клітку; *в* – перебудова обміну речовин у клітці; *г* – утворення нових часток бактеріофага; *д* – розчинення клітинної стінки

## 1.3. Хімічний склад клітин мікроорганізмів

### 1.3.1. Елементний склад клітини

На всіх рівнях будови живих організмів у їхній склад обов'язково входять 16 найважливіших елементів: С, О, N, H, P, S, Fe, Cu, Na, K, Ca, Mg, Co, Cl, I, Mn. Їх називають елементами життя. У клітинах деяких організмів виявлені й інші елементи, такі як Zn, Al, Mo, Si, V, B.

Вуглець, кисень, азот і водень – основні органогени, частка яких у загальній масі клітки може досягати 92–98 %. Всі чотири елементи володіють рядом загальних властивостей, з яких найважливіша – їхня здатність утворювати ковалентні зв'язки. Незліченна безліч різноманітних хімічних сполук виникає завдяки здатності атомів С, Н, О, N легко реагувати один з одним, утворювати одинарні й подвійні зв'язки між вуглецем, киснем й азотом. Нарешті, найважливіша особливість вуглецю – його здатність створювати стабільні молекули із тривимірною структурою різноманітної просторової конфігурації.

Серед зольних елементів клітини важлива роль належить фосфору. Він входить до складу нуклеїнових кислот, цілого ряду ферментів, бере участь у реакціях енергетичного обміну.

Вміст металів у клітині відносно невеликий, але функції їх надзвичайно важливі. У цитоплазмі метали присутні у вигляді комплексів з органічними молекулами. Основна функція більшості металів – посилення каталітичної активності ферментів.

Кількісні співвідношення елементів у клітинах різних мікроорганізмів коливаються в досить широких межах. Наприклад, деякі види бактерій здатні накопичувати усередині клітин залізо або сірку, в інших спостерігається підвищений вміст кальцію. Знаючи склад біомаси клітини за основними компонентами, можна вивести емпіричну формулу для різних видів мікроорганізмів.

*Приклад визначення емпіричної формули біомаси деяких мікроорганізмів*

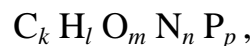
Відомо, що основними компонентами, що формують клітинну речовину, є вуглець, азот, кисень, водень і фосфор.

Вміст цих елементів у різних мікроорганізмах практично постійний (табл. 1.1):

Таблиця 1.1 – Вміст основних компонентів у клітинах, %

Мікроорганізми	Вуглець	Азот	Кисень	Водень	Фосфор
Дріжджі	47,8	10,4	31,1	6,5	4,5
Бактерії	50,4	12,3	30,5	6,8	4,0
Гриби	47,9	5,2	40,2	6,7	3,5

Наведений елементний склад біомаси мікроорганізмів (за основними компонентами) дозволяє записати її спрощену емпіричну формулу у вигляді:



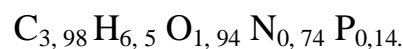
де чисельні коефіцієнти  $k, l, m, n, p$  одержують у результаті розподілу масової частки елемента в біомасі на атомну масу цього елемента.

Наприклад, для дріжджів маємо

$$C = \frac{47,8}{12} = 3,98; \quad H = \frac{6,5}{1} = 6,5; \quad O = \frac{31,1}{16} = 1,94;$$

$$N = \frac{10,4}{14} = 0,74; \quad P = \frac{4,5}{31} = 0,14.$$

Тоді спрощена емпірична формула дріжджів буде мати вигляд



Аналогічно для бактерій маємо:  $C_{4,2} H_{6,8} O_{1,9} N_{0,88} P_{0,13}$ ;

для грибів:  $C_{3,99} H_{6,7} O_{2,5} N_{0,37} P_{0,11}$ .

### 1.3.2. Вода

Вода відіграє важливу роль у житті будь-якого організму. На її частку припадає основна частина маси клітки.

Бактеріальні клітини містять 75–90 % води. На одну білкову молекулу в них доводиться близько 10 тис. молекул води. У клітинах цвілевих

грибів 85–88 % води, у деяких найпростіших ця величина досягає 95 %. Чим молодша клітина, тим більше води вона містить. У спорах бактерій води значно менше, ніж у зростаючих (вегетативних) клітинах. Частина води в клітині пов'язана з колоїдами й входить до складу внутрішньоклітинних органел (рибосоми, мітохондрії й т.д.), будучи, таким чином, структурним елементом клітини.

Полярна природа молекул води зумовлює її здатність розчиняти й диспергувати найрізноманітніші речовини. Вода – дисперсійне середовище для колоїдів цитоплазми й розчинник ряду органічних і мінеральних речовин. Вона служить не тільки середовищем для численних і різноманітних біохімічних процесів, але й сама бере участь у таких реакціях, як гідроліз, окислювання й т.д.

При низькій в'язкості й здатності розчиняти різні речовини вода виконує й транспортні функції – забезпечує надходження поживних речовин усередину клітини й виведення продуктів життєдіяльності з неї.

Внаслідок високої теплоємності клітинна вода здатна певною мірою підтримувати сталість температури клітини при зміні температури навколишнього середовища.

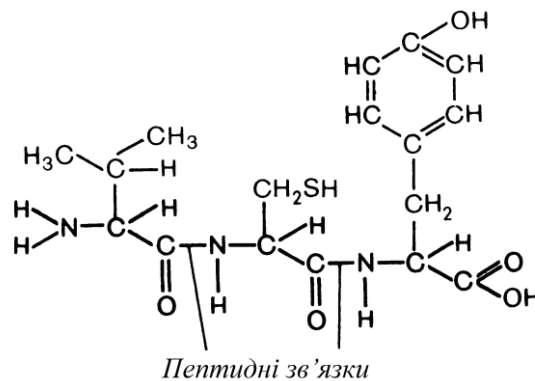
### 1.3.3. Органічні компоненти клітини

Суха речовина клітини на 85–97 % складається з органічних речовин, інші 3–15 % припадають на частку зольних елементів. Органічна або беззольна речовина клітини складається із чотирьох основних компонентів: білків, нуклеїнових кислот, вуглеводів і ліпідів. Молекулярна маса цих сполук досягає  $10^3$ – $10^9$ . Виняток становлять ліпіди, однак і вони здатні утворювати структури з високою молекулярною масою.

*Білки.* Вміст білків у клітці становить 50–80 % від сухої речовини. Білки – основний компонент всіх клітинних структур, основа життя. На відміну від інших органічних сполук білки володіють рядом особливостей. Насамперед, їм властива величезна молекулярна маса. Наприклад, молекулярна маса альбуміну становить 36000, гемоглобіну – 152000. Для порівняння: молекулярна маса етилового спирту – 46; оцтової кислоти – 60. Серед органічних сполук білки самі складні, вони відносяться до біологічних *полімерів*. Молекула полімеру являє собою довгий ланцюг, у

якому багато разів повторюється та сама, порівняно проста структура – *мономер*. Якщо позначити мономер буквою А, то структуру полімеру можна зобразити в такий спосіб: А-А-А-А-А. Мономерами білків є амінокислоти. Молекула амінокислоти складається із двох частин. Одна частина у всіх амінокислот однакова – це група  $\text{H}-\text{C}-\text{NH}_2$ . Вона складається з аміногрупи ( $\text{NH}_2$ ) й карбоксильної групи ( $\text{COOH}$ ), що знаходиться поруч. Інша частина молекули у всіх амінокислот різна. Ця частина називається радикалом – R. Перша амінокислота була виділена із соку спаржі в 1806 р. З того часу було отримано більше 150 амінокислот. Однак як мономери будь-яких природних білків можуть служити тільки двадцять із них. Їх називають *білковими* або *протеїногенними* (протеїни (*грец.*) – прості білки). Той факт, що білки всіх організмів побудовані з тих самих амінокислот, служить ще одним доказом єдності живого світу на Землі.

Первинна структура білка утвориться в результаті послідовного поєднання аміногрупи однієї кислоти й карбоксильної групи іншої з виділенням води; за рахунок валентних зв'язків, що звільнилися, залишки амінокислот з'єднуються. Між амінокислотами виникає міцний ковалентний зв'язок  $\text{NH}-\text{CO}$ , що називається *пептидним* зв'язком:



Сполука, що утворилася з амінокислот, *називається* пептидом. Пептид із двох амінокислот називається дипептидом, із трьох амінокислот – трипептидом, з багатьох амінокислот – поліпептидом. Білки являють собою поліпептиди, тобто ланцюги з багатьох десятків і сотень амінокислотних ланок.

Кожному типу білка відповідає певна послідовність амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюзі. Ця послідовність є формулою білка

й визначає його первинну структуру. Найчастіше поліпептидний ланцюг закручується у спіраль. Це вторинна структура білка. При подальшому укладанні спіраль згортається в конфігурацію, певну для кожного білка, утворюючи третинну структуру. Третинна структура не є вищою формою структурної організації білка. У живій клітині виявлено багато інших, більш складних форм, наприклад, четвертинні.

Під впливом високої температури, екстремальних значень рН й інших факторів можуть руйнуватися вторинна, третинна (але не первинна) структури білка, і поліпептидний ланцюг розкручується. Такий процес називається *денатурацією*. У результаті денатурації властивості білка змінюються. Він втрачає розчинність, стає доступним дії травних ферментів, губить свою біологічну активність. Прикладом денатурації білків може служити перетворення рідкого вмісту яйця після нагрівання в щільну, непрозору масу. Процес денатурації оборотний, тобто розгорнутий поліпептидний зв'язок здатний мимовільно закрутитися в спіраль, а спіраль – мимовільно укластися в третинну структуру. Це значить, що всі особливості будови білка визначаються його первинною структурою, тобто складом і порядком чергування амінокислот у поліпептидному ланцюзі.

*Нуклеїнові кислоти.* На частку нуклеїнових кислот у клітинах різних мікроорганізмів припадає 5–30 % маси сухої речовини. Значення нуклеїнових кислот дуже велике. Вони забезпечують зберігання й передачу у спадковість інформації про структуру білкових молекул, які синтезуються в кожній клітині. Білки ж обумовлюють більшість властивостей й ознак клітин. Існують два види нуклеїнових кислот – дезоксирибонуклеїнова (ДНК) і рибонуклеїнова (РНК).

*Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК).* Їй належить роль охоронця спадкоємної інформації у всіх клітинах. Молекула ДНК являє собою дві нитки, спіральні закручені одна навколо іншої. Молекулярна маса ДНК винятково велика – вона досягає десятків і навіть сотень мільйонів. Кожна нитка ДНК являє собою полімер, мономерами якого є *нуклеотиди*. Нуклеотид – це хімічна сполука залишків трьох речовин: азотистої основи, вуглеводу (моносахариду – дезоксирибози) і фосфорної кислоти. ДНК усього органічного світу утворені сполуками чотирьох видів нуклеотидів.

Нуклеотиди з'єднуються в строго певній послідовності. Саме цією послідовністю визначається зміст генетичної інформації, що передається від материнської клітини до дочірньої. ДНК міститься в ядрі клітини; вона входить до складу хромосом, де перебуває у з'єднанні з білками.

*Рибонуклеїнова кислота (РНК).* Структура РНК подібна зі структурою ДНК. Вона також є полінуклеотидом, але, на відміну від ДНК, молекула РНК – одноланцюгова. Так само, як і ДНК, структура РНК створюється чергуванням чотирьох типів нуклеотидів, але склад нуклеотидів РНК трохи відрізняється від нуклеотидів ДНК, зокрема, вуглевод РНК – не дезоксирибоза, а рибоза, звідси назва – рибонуклеїнова кислота.

У клітині є кілька видів РНК. Всі вони беруть участь у синтезі білка. Перший вид – транспортні РНК (т-РНК). Вони транспортують амінокислоти до місця синтезу білка. Другий вид – інформаційні РНК (і-РНК або м-РНК від *англ.* messenger–вісник). Їхня функція полягає у переносі інформації про структуру білка (тобто про послідовність розташування амінокислот у молекулі білка) від ДНК до місця синтезу білка. Третій вид – рибосомні РНК (р-РНК) – входять до складу рибосом і беруть участь у процесах синтезу білка.

*Передача генетичної інформації. Біосинтез білків.* У клітині міститься кілька тисяч різних білків, причому кожна клітина має специфічні білки, властиві тільки цьому виду клітин. Здатність синтезувати саме свої білки передається у спадковість від клітини до клітини й зберігається протягом всього життя. Всі клітини протягом життя синтезують білки, тому що в ході нормальної життєдіяльності білки поступово денатуруються, їхня структура й функції порушуються. Такі молекули білків видаляються із клітини й замінюються новими повноцінними молекулами. Завдяки цьому життєдіяльність клітини зберігається.

*Код ДНК.* Інформація про первинну структуру білків цієї клітини укладена в ДНК. Відрізок молекули ДНК, що містить інформацію про первинну структуру одного певного білка, називається *геном*. У молекулі ДНК міститься кілька сотень генів, що відбивають структуру всіх білків, синтезованих цією клітиною.

Синтез білка протікає на рибосомах. До них інформація про структуру білка, зашифрована в ДНК, передається за допомогою і-РНК, які син-

тезуються в одному з ланцюгів ділянки молекули ДНК – гена, і в точності повторюють його структуру. Таким шляхом інформація, що міститься в гені, як би записується на і-РНК. Цей процес називається *транскрипцією*. Довжина і-РНК дорівнює довжині гена. Потім молекули і-РНК направляються до місця синтезу білка, тобто до рибосом і прикріплюються до них. Туди ж із цитоплазми за допомогою т-РНК доставляються ті амінокислоти, з яких необхідно побудувати білок.

Рибосоми «прокочуються» уздовж і-РНК, зчитуючи код і з'єднуючи амінокислоти в потрібній послідовності, утворюючи відповідний білок. Загальна схема біосинтезу білка представлена на рис. 1.10.

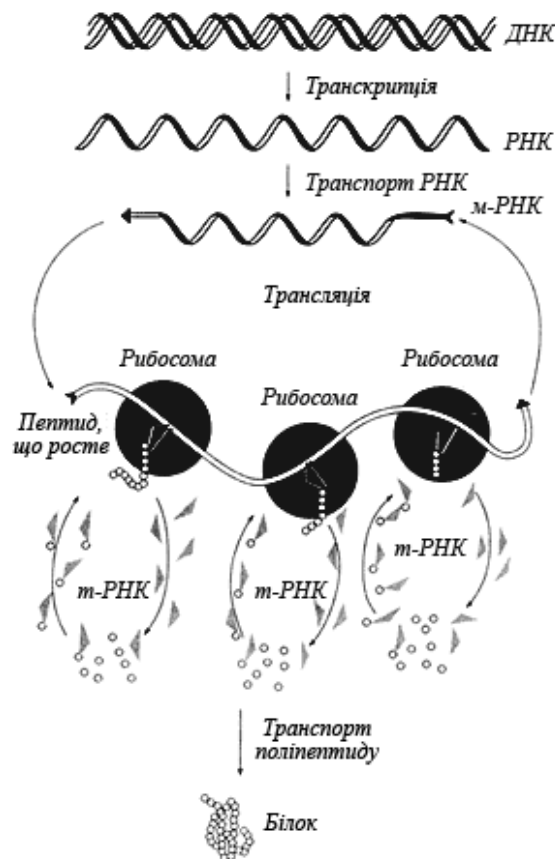


Рисунок 1.10 – Загальна схема біосинтезу білка

*Ліпіди.* Ліпіди (жири й жироподібні речовини) – органічні сполуки, не розчинні у воді, але розчинні в органічних неполярних розчинниках, таких, як ефір, бензол, хлороформ. Ліпіди в клітинах більшості мікроорганізмів становлять 2–15 % сухої маси. Лише в кислотостійких бактерій

та у деяких видів грибів і дріжджів кількість жирів може досягати 40 %. У зв'язаному стані жири перебувають у цитоплазматичній мембрані. У вільному стані жири виконують функцію запасних речовин і служать джерелами енергії. У ході розщеплення жиру звільняється у два рази більше енергії, ніж при розщепленні вуглеводів. Справжні жири являють собою складні ефіри гліцерину й вищих жирних кислот.

Найважливішими жироподібними речовинами є фосфо- і гліколіпіди. Фосфоліпіди, або гліцерофосфати, що володіють великою фізіологічною активністю, відрізняються від справжніх жирів тим, що один із залишків жирних кислот замінений у них фосфорною кислотою, з'єднаною ефірним зв'язком з яким-небудь спиртом. Гліколіпіди містять у своєму складі вуглеводи. До неоміляємих жирів, що містяться у клітинах мікроорганізмів, відносяться стероїди, жиророзчинні вітаміни й деякі пігменти, наприклад каротиноїди.

*Вуглеводи.* У клітинах бактерій на частку вуглеводів припадає 12–30 % сухої речовини, у клітинах грибів – до 40–60 %. Вуглеводи беруть участь у синтезі білків і жирів, входять до складу структурних компонентів клітини, служать джерелом енергії в ній.

Емпірична формула вуглеводів  $(\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n)$ . Вуглеводи діляться на прості цукри, олігосахариди й полісахариди. Із простих цукрів найбільше значення для живих організмів мають гексози (зокрема, глюкоза) і пентози (наприклад, рибоза й дезоксирибоза). Серед олігосахаридів найбільш важливі дисахариди (що складаються із двох молекул простих цукрів): сахароза, мальтоза, лактоза.

Більшість вуглеводів, що зустрічаються в природі, існує у формі високомолекулярних полісахаридів. За хімічним складом полісахариди підрозділяють на пентозани (мономер пентоза), гексозани (мономер гексоза) і змішані полісахариди, що мають у своєму складі різні цукри. До пентозанів відносяться геміцелюлози; до гексозанів – декстрини, що складаються із залишків глюкози й часто зустрічаються в клітинах дріжджів і бактерій, а також целюлоза, крохмаль і глікоген. Полісахариди входять до складу капсул бактерій і виділяються мікроорганізмами у вигляді слизу. До основних резервних полісахаридів відносяться крохмаль, глікоген і декстрини.

## 1.4. Ферменти

### 1.4.1. Природа ферментів й особливості ферментативного каталізу

Ферменти, або ензими, становлять самий великий і найбільш високо-спеціалізований клас білкових молекул. Ферменти синтезуються самою клітиною й виконують у ній функції каталізаторів біохімічних реакцій.

*Історична довідка.* Ферменти були відкриті в 1897 р. великим німецьким хіміком Едуардом Бухнером. У той час уже було відомо, що процес бродіння, у результаті якого глюкоза перетворюється в спирт і діоксид вуглецю, відбувається тільки в присутності кліток дріжджів. Бухнер вирішив з'ясувати, чи можливо бродіння при відсутності *живих* клітин дріжджів. Для цього він провів експеримент: розтирав клітини дріжджів, перемішані із кварцовим піском, доти, поки під мікроскопом не можна було виявити ні однієї цілої дріжджової клітини. Потім він відфільтрував отриману суспензію й одержав прозору рідину, до якої додав розчин глюкози. Через якийсь час у рідині з'явилися пухирці газу – діоксиду вуглецю, тобто бродіння все-таки відбувалося. Це означало, що бродіння викликається не самими клітинами дріжджів, а речовинами, що містилися у них, які були названі *ензимами* (від грец. *en zyme* – у дріжджах), або ферментами.

Каталізаторами називаються речовини, які, беручи участь у реакції, змінюють її швидкість, але самі до кінця реакції залишаються хімічно незміненими. Хімічна взаємодія молекул відбувається тільки в результаті їхнього зіткнення за умови, що в цей момент вони мають деякий надлишок вільної енергії  $G$ , достатній для їхнього переходу в активований (перехідний) стан. Швидкість реакції пропорційна концентрації активованих молекул. Сутність дії каталізатора полягає в тому, що він, зв'язуючи реагуючі речовини, приводить до появи нового перехідного стану, для якого вільна енергія активації  $G$  істотно нижче, ніж у реакції без каталізатора. Слід зазначити, що введення каталізатора не відбивається на сумарному енергетичному ефекті реакції  $\Delta G$  і не змінює стани рівноваги в реагуючій системі (рис. 1.11).

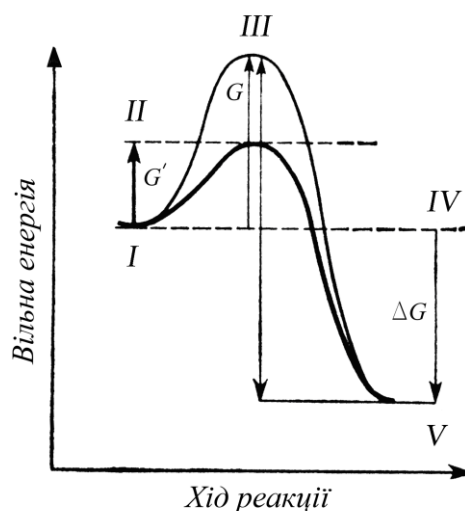


Рисунок 1.11 – Енергетична схема реакцій з каталізатором та без: I – початковий стан; II – вільна енергія активації реакції з каталізатором; III – те ж, для реакції без каталізатора; IV – повна зміна вільної енергії в ході реакції; V – кінцевий стан

Каталіз називають *гомогенним*, якщо каталізатор і реагуючі речовини перебувають в одній фазі, і *гетерогенним*, якщо вони утворюють дві фази.

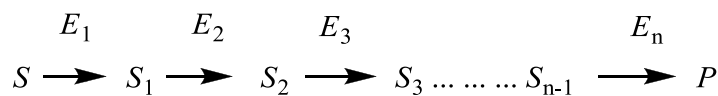
Ферментативний каталіз зазвичай розглядають як каталіз гетерогенний, що відбувається на поверхні гігантських білкових молекул ферментів.

Підпорядковуючись загальним закономірностям каталітичних процесів, ферментативний каталіз має ряд істотних відмінностей від хімічного. Насамперед, ферментативний каталіз протікає у живій клітині в обмеженому діапазоні температур, значень рН і тиску.

У більшості випадків умови, у яких ферменти здійснюють каталіз, виявляються досить «м'якими». Одна з найважливіших особливостей ферментативного каталізу – суворі специфічність їхньої дії. Під специфічністю розуміють здатність ферменту реагувати тільки з однією речовиною (абсолютна специфічність); із групою речовин, що володіють загальними структурними ознаками (групова специфічність); діяти на певний хімічний зв'язок (відносна специфічність).

Багато ферментів утворюють у клітині так звані мультиферментні системи. Процес перетворення речовини за участю системи ферментів являє собою серію послідовних реакцій, кожен з яких каталізує певний

фермент. При цьому продукт першої реакції служить субстратом для другої, продукт другої реакції – субстратом для третьої і т.д. Перетворення субстрату  $S$  у продукт  $P$  у найпростішій мультиферментній системі ( $E_1$ – $E_n$ ) ілюструється такою схемою:



Прикладом «роботи» такої мультиферментної системи є перетворення глюкози в спирт: щоб зробити це перетворення, дріжджова клітина виробляє 12 ферментів.

Така кооперативність і чітка послідовність у дії ферментів визначає їх найбільш істотну відмінність від каталізаторів іншої природи. Кожна клітина має регуляторні механізми, що дозволяють їй залежно від потреб змінювати швидкість окремих біохімічних реакцій у результаті регуляції синтезу певних ферментів або їхньої активності. Здатність підпорядкуватися такої регуляції – вкрай важлива особливість ферментів як каталізаторів.

Ферментативна реакція проходить через ряд послідовних стадій. У початковий момент фермент  $E$  утворює із молекулою субстрату  $S$  проміжну сполуку – фермент-субстратний комплекс  $ES$ . На наступних стадіях фермент активізує субстрат, тобто змінює його таким чином, що субстрат може вступити у відповідну хімічну реакцію. Цьому моменту відповідає утворення каталітично активного комплексу  $ES'$ . Далі відбувається власне реакція на молекулі ферменту, результатом якої є фермент-продуктний комплекс  $EP$ . Процес закінчується виділенням продукту реакції  $P$  і регенерацією ферменту  $E$



Такий механізм дії ферментів підтверджений експериментально. Каталітична активність ферментів надзвичайно висока. Хімічна реакція розкладання пероксиду водню каталізується іонами заліза. У живій клітині під впливом ферменту каталази, що містить залізо, ця реакція протікає в  $10^{10}$  разів швидше, ніж з неорганічним каталізатором.

### 1.4.2. Структура, механізм дії й властивості ферментів

За своєю природою всі ферменти є білковими сполуками й мають високу молекулярну масу, що досягає сотень тисяч і мільйонів. На поверхні їхніх гігантських молекул і протікають каталітичні реакції.

У більшості випадків ферменти каталізують перетворення речовин, розміри молекул яких у порівнянні з розмірами макромолекули ферменту дуже малі. Наприклад, фермент каталаза має молекулярну масу 250 000, а пероксид водню ( $H_2O_2$ ), розпад якого каталізує каталаза, усього 34.

Таке співвідношення між розмірами ферменту й речовиною, на яку він діє, показує, що каталітична активність ферменту визначається не всією його молекулою, а тільки невеликою її ділянкою – активним центром ферменту. Як відомо, реакція між речовинами відбувається за умови тісного зближення їхніх молекул. Це зближення досягається завдяки геометричній відповідності структур активного центру ферменту й молекули речовини. Вони мають підходити один одному, як «ключ» до «замка». При денатурації ферменту його каталітична активність зникає, тому що порушується структура активного центру. Механізм дії ферментів показаний на рис. 1.12.

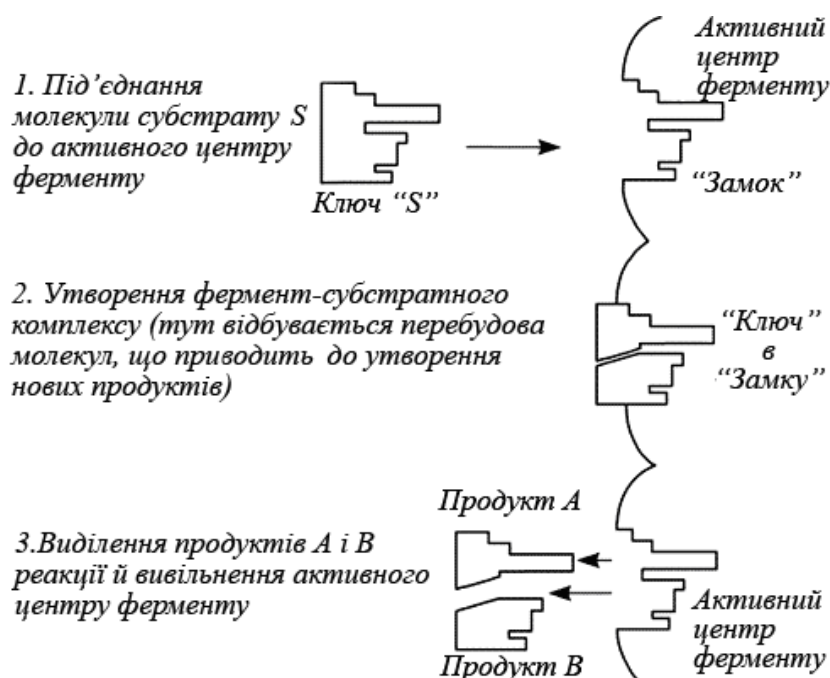


Рисунок 1.12 – Схема механізму ферментативного розщеплення

Білкова природа ферментів зумовлює їхню лабільність, що виражається в тому, що ферменти втрачають активність під впливом деяких факторів. Найважливіші з них – температура й реакція середовища.

Залежність активності ферментів від температури носить складний характер (рис. 1.13). З підвищенням температури активність збільшується, але в досить вузьких межах. Максимальна активність досягається у зоні оптимальної температури, після чого починається падіння активності, пов'язане з денатурацією білкової частини ферменту при підвищених температурах і втратою в результаті цього каталітичної активності. Оптимальна температура, як і температура, що викликає інактивацію, для різних ферментів неоднакова. Одні ферменти починають втрачати активність уже при 40 °С, інші – тільки при 70 °С. Майже всі ферменти беззворотно руйнуються при 80 °С. Більшість ферментів мають максимальну активність у нейтральному середовищі, але для деяких оптимум рН може перебувати в кислій або лужній зоні значень.

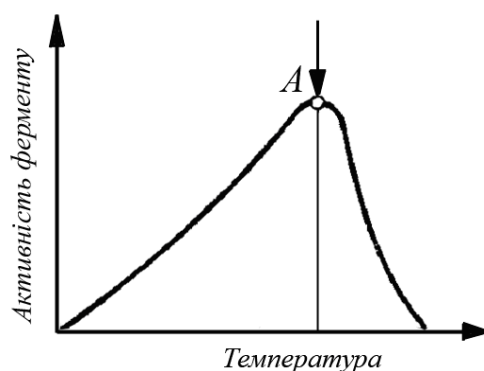


Рисунок 1.13 – Вплив температури на активність ферментів  
(точка *A* – оптимальна температура)

Активність ферментів залежить і від присутності в середовищі деяких хімічних сполук.

Одні підвищують активність ферментів і називаються *активаторами*. До них відносяться вітаміни й деякі катіони: Ca, Mg, Mn. Інші хімічні сполуки – *інгібітори* – блокують активні центри й різко знижують активність ферменту. Це солі важких металів (Pb, Cr), синильна кислота (HCN), антибіотики.

Клітини кожного виду мікроорганізмів мають певний набір ферментів, характерний для цього виду (*конститутивні ферменти*). У деяких випадках у клітині під впливом зовнішніх факторів, наприклад, при зміні харчування синтезуються ферменти, не властиві цього виду у звичайних умовах. Таке явище називається *адаптацією*, а синтезовані ферменти – *адаптивними*. За місцем дії ферменти підрозділяються на внутрішньоклітинні (*ендоферменти*) і ферменти, які клітина виділяє в зовнішнє середовище (*екзоферменти*).

### **1.5. Метаболізм мікроорганізмів. Загальні поняття про обмін речовин та енергії**

Будь-який організм може існувати тільки за умови постійного надходження поживних речовин із зовнішнього середовища й виділення в нього продуктів життєдіяльності. Сукупність процесів перетворення матерії в живому організмі, що супроводжуються постійним її відновленням, називається *обміном речовин, або метаболізмом*.

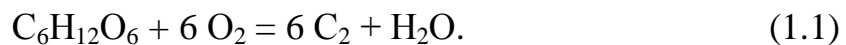
Поживні речовини, що поглинаються клітиною, у результаті складних біохімічних реакцій перетворюються в специфічні клітинні компоненти. Сукупність біохімічних процесів поглинання, засвоєння поживних речовин і створення за їхній рахунок структурних елементів клітини, називається *конструктивним обміном, або асиміляцією*. Конструктивні процеси проходять із поглинанням енергії.

Друга функція обміну речовин – забезпечення клітини енергією. Вона забезпечується за рахунок енергії хімічних реакцій, яка звільняється в результаті розщеплення речовин, що надійшли. Ця енергія перетворюється в інші види енергії (рухову, теплову). Сукупність реакцій, що забезпечують клітини енергією, називається *енергетичним обміном, або дисиміляцією*.

Конструктивні й енергетичні процеси метаболізму становлять єдине ціле. В остаточному підсумку енергія поживних речовин перетворюється в енергію, споживану організмом у процесі росту, розвитку, розмноження, в енергію руху. Погодженість і швидкість всіх хімічних реакцій у клітині зумовлюється наявністю в ній ферментів.

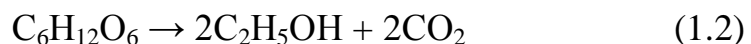
Процеси дисиміляції – біологічного окислювання складних органічних субстратів – називаються ще *диханням*. Дихання може відбуватися як у присутності кисню, так і без нього. Якщо дихання відбувається тільки в присутності кисню, воно називається *аеробним*, а мікроорганізми, здатні тільки до такого дихання, називаються *строгими (облігатними) аеробами*. До них відносяться багато видів бактерій, гриби, водорості, більшість найпростіших. Анаероби не потребують для свого розвитку присутності молекулярного кисню. Серед них розрізняють факультативні й облігатні мікроорганізми.

*Факультативні, або умовні анаероби* можуть розвиватися як у присутності кисню, так і без нього. Вони використовують у процесі дихання внутрішньомолекулярний кисень, а як кисневмісні речовини – нітрати. До них відносяться бактерії кишкової групи, молочнокислі бактерії, більшість дріжджів. Факультативні мікроорганізми мають дві ферментні системи, що дозволяють їм переключатися з аеробного дихання на анаеробне й, навпаки – залежно від умов. Наприклад, дріжджі роду *Saccharomyces* (сахароміцети) в аеробних умовах одержують енергію шляхом повного окислювання моно- і дисахаридів до  $C_2$  і  $H_2O$



Цей процес лежить в основі виробництва хлібопекарських дріжджів, де необхідно, щоб цукор споживався, головним чином, на розмноження дріжджів, у результаті чого накопичувалася б значна біомаса.

В анаеробних умовах необхідну для життєдіяльності енергію дріжджі одержують шляхом зброджування моно- і дисахаридів за сумарним рівнянням:



Цей процес лежить в основі виробництва етилового спирту.

*Облігатні анаероби* не переносять навіть незначних кількостей кисню в середовищі й швидко гинуть. Це пов'язано з тим, що при розчиненні кисню в живильних середовищах, що містять, як правило, молекулярний водень, відбувається утворення пероксиду водню ( $H_2O_2$ ) – найсильнішої отрути для цих мікроорганізмів. Для аеробних мікроорганізмів утворення

пероксиду водню не небезпечно, тому що вони здатні виробляти фермент каталазу, що розкладає  $\text{H}_2\text{O}_2$  на нейтральні сполуки – воду й молекулярний кисень:



Анаеробні мікроорганізми такою здатністю не володіють.

## **1.6. Взаємозв'язок мікроорганізмів і навколишнього середовища**

Життя мікроорганізмів нерозривно пов'язано з навколишнім середовищем. З одного боку, діяльність мікробів значно змінює навколишнє середовище в результаті видалення з нього поживних речовин і виділення продуктів обміну; з іншого боку, інтенсивність обмінних процесів усередині клітини багато в чому залежить від умов навколишнього середовища.

Фактори навколишнього середовища, що впливають на життєдіяльність мікроорганізмів, підрозділяють на *абіотичні* (фізичні й хімічні) і *біотичні* (пов'язані із впливом з боку інших живих організмів). Однак багато таких факторів тісно взаємозалежні, так що зміна одного з них часто змінює реакцію організму на дію інших факторів.

### **1.6.1. Абіотичні фактори зовнішнього середовища**

1.6.1.1. Вплив фізичних факторів зовнішнього середовища на мікроорганізми. До найважливіших фізичних факторів, що зумовлюють активність мікроорганізмів, відносяться температура й світло.

*Температура.* Активна життєдіяльність мікроорганізмів обмежується температурами, що лежать в зоні від  $-2\text{ }^\circ\text{C}$  (або нижче в середовищах з високим осмотичним тиском) і приблизно до  $+80\text{ }^\circ\text{C}$ . У цьому температурному інтервалі вода перебуває у краплинно-рідкому стані, тобто в доступній для мікроорганізмів формі. Ріст кожного виду мікроорганізмів може відбуватися в певному температурному інтервалі, обмеженому мінімальною та максимальною для даного виду температурами.

*Мінімальна* – це температура, при якій мікроорганізми не ростуть, але й не гинуть; при температурі нижче мінімальної мікроби переходять у

стан *анабіозу* (стан крайнього вповільнення процесів життєдіяльності), з якого знову виходять при підвищенні температури.

*Максимальна* – це найвища температура, при якій ще можливий ріст і розвиток мікроорганізмів; при подальшому підвищенні температури мікроби гинуть через коагуляцію білків.

*Оптимальна* – найбільш сприятлива температура для життєдіяльності мікробів у цьому інтервалі. Це температура максимальної активності ферментів, при якій найбільш повно проявляються всі функції мікроорганізмів. Для кожного мікроорганізму оптимальна температура визначається сумарним впливом температури на безліч ферментативних реакцій, що відбуваються у клітині цього мікроорганізму.

Відносно температури мікроорганізми діляться на три групи:

1) *Психрофіли* або холодолюбні (від грец. *psychria* – холод, *phileo* – люблю). Серед них є облігатні форми, що ростуть у діапазоні температур від  $-2$  до  $20$  °C з оптимумом  $5-15$  °C, і факультативні психрофіли, що розвиваються в більш широкому температурному інтервалі – від мінусових температур до  $30-35$  °C. Для них оптимальною є температура  $20-25$  °C. Здатність психрофілів інтенсивно розвиватися при низьких температурах зумовлюється низьким температурним оптимумом дії їхніх ферментів. Живуть такі мікроби в північних морях (морські бактерії), у ґрунтах холодних країн, у холодильних установках.

2) *Термофіли* – теплолюбні мікроорганізми (від грец. *therme* – тепло). Температурний діапазон розвитку облігатних термофілів від  $30$  до  $80$  °C з оптимумом  $50-60$  °C. Факультативні термофіли здатні до росту й при  $25$  °C, і при  $60-65$  °C. Для них оптимальна температура близько  $55$  °C. Особливість факультативних термофілів полягає в їхній здатності до метаболізму мезофільного й термофільного типів. Ендо- і екзоферменти, а також усі білки термофілів володіють незвичайною термостійкістю. Термофіли досить широко поширені в природі. Вони можуть жити в гарячих джерелах, у ґрунтах і водоймах жарких країн, у кишковикі людини й тварин. Термофіли зустрічаються в продуктах, що пройшли теплову обробку (у консервних, цукровому й ін. виробництвах). До термофілів і психрофілів відносяться в основному бактерії.

3) *Мезофіли* (від грец. *mesos* – середній). Ці мікроорганізми розвиваються в інтервалі температур від 10 до 50 °С. Оптимальна температура для них 25–37 °С. До мезофільних мікроорганізмів відноситься більшість бактерій, найпростіших, грибів. У цю ж групу включені й всі патогенні для людини й теплокровних тваринні організми. Збудниками псування харчових продуктів, харчових отруєнь і захворювань в основному є мезофіли.

Здатність розвиватися при певній температурі необхідно відрізнити від здатності переносити ту або іншу температуру. Так, багато мікроорганізмів при температурі нижче нуля зберігають життєздатність тривалий час, але їхня активна життєдіяльність припиняється. Спори багатьох бактерій не гинуть навіть при температурі кипіння рідкого водню (–252 °С).

Значно менш стійкі мікроорганізми до дії високих температур. Більшість бактерій гине при температурі 70 °С протягом 10–15 хв., при 100 °С – протягом 1 хв. Дріжджі й гриби гинуть уже при 50–60 °С. Більш стійкими до нагрівання є термофіли, що володіють підвищеною термостійкістю.

*Термостійкість* – це здатність мікроорганізмів витримувати тривале нагрівання при температурах, що перевищують температурний максимум їхнього розвитку. Спори мікроорганізмів більш термостійкі, ніж цілі клітини. Наприклад, спори бактерій у вологому середовищі гинуть при 120–130 °С через 20–30 хв., а в сухому стані – при 160–170 °С – через 1–2 год. Спори більшості дріжджів і грибів гинуть досить швидко – при 65–80 °С.

Згубна дія високих температур пов'язане з денатурацією білків. На температуру денатурації білка значно впливає вміст у ньому води. Чим менше води в білку, тим більш високі температури необхідні для його згортання. Тому молоді вегетативні клітини, багаті вільною водою, гинуть при нагріванні швидше, ніж старі, частково збезводнені. Висока термостійкість спор також обумовлена малим вмістом у них вільної води, тому що більша частина води перебуває в спорах у зв'язаному стані. Охороняє спори й багатошарова важкопроникна оболонка.

На згубній дії високих температур основані різні методи знищення мікроорганізмів у харчових продуктах. Це – кип'ятіння, варіння, бланшування, обжарювання, а також пастеризація й стерилізація.

*Пастеризація або часткова стерилізація* – це процес знищення клітин бактерій шляхом нагрівання: до 50–60 °С протягом 15–30 хв. або до 70–80 °С протягом 5–10 хв. При пастеризації спори бактерій і деяких термофільних бактерій не гинуть. Пастеризацію застосовують для збереження молока, пива, вина, ікри осетрових риб, фруктових соків.

*Стерилізація* – це процес повного знищення мікроорганізмів, у тому числі й спороутворюючих, під дією високих температур. Стерилізація буває двох видів – волога й суха. Волога стерилізація здійснюється насиченою водяною парою під тиском 0,05–0,1 МПа в спеціальних приладах – *автоклавах* – протягом 20–60 хв. при температурі 112–120 °С. Суху стерилізацію проводять у сушильних шафах сухим гарячим повітрям протягом 1,5–2 год. при температурі 160–170 °С. Більш високий стерилізуючий ефект водяної пари в порівнянні із сухим повітрям зумовлюється тим, що пара не тільки нагріває, але й додатково зволожує клітини й спори, що приводить до зниження їх термостійкості. Практична реалізація термічної стерилізації залежить від об'єкта, що стерилізується. Так, порожні апарати, комунікації, живильні середовища частіше всього стерилізують насиченою водяною парою. Сухе гаряче повітря використовують для стерилізації матеріалів, які можуть бути зіпсовані при обробці парою (безводні жири, масла, порошки та ін.).

*Світло*. Більшість мікроорганізмів добре росте в темряві. Виняток становлять фотосинтезуючі мікроорганізми, що використовують енергію сонця для синтезу органічних речовин із CO<sub>2</sub>. Пряме сонячне світло згубне для мікроорганізмів. *Мікробоцидна* (вбивча) його дія обумовлена головним чином ультрафіолетовою (УФ) частиною спектра. Адсорбція ультрафіолетових променів білками й нуклеїновими кислотами клітини приводить до необоротних хімічних змін. Найбільш чутливі до дії світла вегетативні клітини. Згубні ультрафіолетові промені й для більшості патогенних мікробів. Однак є мікроорганізми, що витримують високі дози ультрафіолетового й іонізуючого випромінювання. Вони виділені на атомних реакторах.

Опромінення ультрафіолетовими променями застосовують для знезараження повітря у виробничих приміщеннях, у холодильних камерах, для знезараження виробничого устаткування, пакувальних матеріалів,

тари. Однак застосування УФ-опромінення з метою стерилізації харчових продуктів обмежено внаслідок їх невисокої проникної здатності, що дозволяє знепліднювати тільки поверхню продуктів (наприклад, поверхня впакованого хліба), а в таких продуктів, як вершкове масло й молоко, при УФ-опроміненні погіршуються смакові якості й поживні властивості. Уф-промені успішно застосовуються для дезінфекції питної води.

1.6.1.2. Вплив хімічних факторів зовнішнього середовища на мікроорганізми. Життєдіяльність мікроорганізмів й інтенсивність обмінних процесів залежать і від хімічного складу середовища перебування. До найважливіших хімічних факторів відносяться рН, сумарна концентрація органічних і неорганічних речовин, наявність токсичних сполук.

*Концентрація водневих іонів (рН)* істотно впливає на розвиток мікроорганізмів. Більшість бактерій віддає перевагу середовищу зі значенням рН, близьким до нейтрального (6,5–7,5). Однак деякі види бактерій добре ростуть у лужному або більш кислому середовищі. Спори бактерій більше стійкі до змін рН, ніж вегетативні клітини. У більшості еукаріотів (гриби і дріжджі) оптимальне значення рН 4–6. Мінімум рН для дріжджів становить 3, для грибів – 1,5; максимум для дріжджів – 8,5, для грибів – 10, тобто гриби можуть розвиватися в більш широкому діапазоні значень рН, ніж дріжджі.

Якщо рН не відповідає оптимальній величині, то мікроорганізми не можуть нормально розвиватися навіть при наявності всіх необхідних поживних речовин, тому що рН значно впливає на активність ферментів клітини й проникність її стінок. Для бактерій кисле середовище більше небезпечне, ніж лужне. Особливо несприятливе кисле середовище для розвитку гнільних бактерій, оптимальне значення рН яких лежить до слаболужної області 7,5–7,7. Ця обставина використовується при консервуванні продуктів шляхом маринування або квашення. При маринуванні до продукту додають оцтову кислоту, при квашенні створюють умови для розвитку молочнокислих бактерій, що утворюють кислоту й тим самим перешкоджають розвитку гнільних бактерій.

*Токсичні сполуки.* Багато хімічних сполук мають антимікробну дію; при цьому одні тільки затримують розвиток мікробів (*мікробостатична*

дія), інші – володіють *мікробоцидними* (викликають загибель мікробів) властивостями. Такі сполуки, як правило, називають отрутами. Однак абсолютних отрут не існує, і ступінь їхнього впливу на мікроорганізми залежить від концентрації, тривалості контакту й виду мікробів. Багато отрут у дуже малих концентраціях мають навіть стимулюючу дію, підвищуючи біохімічну активність мікроорганізмів. Серед неорганічних речовин мікробоцидним ефектом володіють солі важких металів і такі окислювачі, як хлор, озон, бром, йод. Сполуки срібла, ртуті й міді навіть у мізерно малих концентраціях проявляють мікробоцидну дію. Серед токсичних металів є метали, необхідні для нормальної життєдіяльності мікроорганізмів. Наприклад, мідь при концентрації більше 0,5 мг/л токсична для більшості мікроорганізмів, але як мікроелемент необхідна їм. Кобальт і залізо також постійні компоненти живої матерії, але концентрація кобальту більше 1 мг/л вважається токсичною.

Мікробні отрути використовують для знезаражування різних матеріалів, пригнічення небажаних біохімічних процесів. Мікробоцидна дія сильних окислювачів (хлорне вапно, озон) лежить в основі широко застосовуваних методів знезаражування питних і стічних вод (хлорування, озонування).

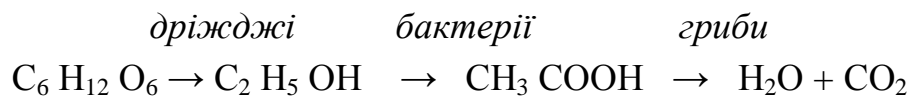
Сильними отрутами для мікробів є й деякі органічні сполуки: феноли, спирти, формалін і т.д. Механізм дії антимікробних сполук неоднаковий: одні (окислювачі, феноли, ПАР, іони водню) впливають на функцію приграничних структур клітини, викликаючи її ушкодження; інші (важкі метали, ціаніди, деякі окислювачі, спирти) порушують структуру й функції білків, у тому числі ферментів; треті, проникаючи в клітину, здатні реагувати з ДНК (азотиста кислота, деякі антибіотики, окис етилену).

### **1.6.2. Біотичні фактори зовнішнього середовища**

Різні види організмів утворюють складні співтовариства – *біоценози*, що представляють собою не випадкове скупчення організмів, а організовану систему. Склад і характер біоценозу визначаються властивостями навколишнього середовища й взаємовідносинами, що існують між представниками окремих видів. Типи взаємовідносин між мікроорганізмами різноманітні.

*Симбіотичні відносини* приносять взаємну вигоду симбіонтам. Спільний ріст таких організмів іде краще, ніж окремо. Широко розповсюджений приклад симбіотичних відносин – симбіоз зелених водоростей та інфузорій. Водорість, поселяючись усередині тіла інфузорії, використовує енергію світла для перетворення  $\text{CO}_2$  в органічні речовини, виділяючи при цьому кисень. Інфузорія споживає кисень для окислювання органічних речовин у процесі дихання, утворюючи у результаті  $\text{CO}_2$ .

Широко розповсюджений *метабіоз* – тип відносин, при якому життєдіяльність одних мікроорганізмів створює умови для розвитку інших. Метабіоз зумовлює послідовність перетворень одних речовин в інші й лежить в основі круговороту речовин у природі. Прикладом таких відносин може служити процес псування цукровмісних субстратів (соків, плодів, ягід): спочатку на них починають розвиватися дріжджі, що перетворюють цукор у спирт, потім спирт під дією оцтовокислих бактерій перетворюється в оцтову кислоту, і нарешті, міцеліальні гриби окисляють оцтову кислоту до води й діоксиду вуглецю.



Серед мікроорганізмів широко поширені *антагоністичні* (ворожі) відносини. До них відносяться:

- 1) *хижацтво* (пожирання бактерій найпростішими);
- 2) *паразитизм* (знищення бактерій бактеріофагами);
- 3) *конкуренція за джерела харчування* (при спільному перебуванні двох родинних видів у боротьбі за їжу перемагає той вид, що швидше розмножується);
- 4) *виділення в середовище метаболітів*, що знижують життєдіяльність інших організмів або вбивають їх. Так, продукт метаболізму гриба *Penicillium* – пеніцилін – є антибіотиком, що володіє бактерицидною дією й перешкоджає розвитку гнильних бактерій.

Простір, займаний біоценозом, називається *біотопом*. Біоценоз і біотоп нерозривно пов'язані, впливають один на одного й утворюють екологічну систему (*екосистему*). Приклади природних екосистем – різні во-

дойми або їхні ділянки. До числа штучних екосистем можуть бути віднесені всі споруди біологічного очищення стічних вод.

Будь-яка екосистема є відкритою системою, для якої характерний постійний обмін речовин й енергії як поза, так й усередині її. Природні екосистеми здатні до саморегуляції й певними мірою можуть протистояти змінам навколишнього середовища. Проте умови середовища істотно впливають на формування екосистем й інтенсивність обмінних процесів усередині біоценозу.

### ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Розкожіть про положення мікроорганізмів у системі живого світу й принципи їхньої систематики.

2. Назвіть основні внутрішньоклітинні структури еукаріотів і прокаріотів. Які їхні функції?

3. Назвіть основні молекулярні компоненти клітини і їхню роль у життєдіяльності мікроорганізмів.

4. Яка функція ферментів у клітині?

5. Які типи обміну речовин існують у мікроорганізмів?

6. На які групи діляться мікроорганізми стосовно температури?

7. Як впливає рН живильного середовища на життєдіяльність мікроорганізмів?

8. Які фактори зовнішнього середовища відносяться до біотичних? Наведіть приклади біотичних взаємодій мікроорганізмів.

## РОЗДІЛ 2. КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

### 2.1. Загальні відомості про ріст і розвиток мікроорганізмів

Процеси промислової біотехнології розділяють на дві великі групи за ознакою цільового продукту:

- виробництво біомаси мікроорганізмів (наприклад, харчових дріжджів);
- одержання продуктів метаболізму клітин (продуктів бродіння, ферментів і т.д.).

Незалежно від кінцевого виду цільового продукту в процесі виробництва необхідно накопичити певну масу клітин мікроорганізмів. Це досягається в процесі росту клітин, коли в результаті обміну речовин спочатку збільшуються біомаса й розміри клітин до певних розмірів, а потім відбувається їхнє розмноження. Таким чином, під *ростом культури мікроорганізмів* зазвичай мають на увазі не тільки ріст окремої клітини, але й збільшення загальної кількості клітин у результаті розмноження.

Процес росту клітин підпорядковується певним закономірностям, які вивчає *біокінетика* – найважливіший розділ мікробіології. Біокінетика є науковою базою керованого кількісного біосинтезу.

#### *Основні терміни й визначення біокінетики*

При вивченні властивостей мікроорганізмів через їхні малі розміри й масу, як правило, мають справу не з однією, а з більшою кількістю особин. Таким чином, ураховуються властивості не окремих клітин, а певної їхньої кількості.

Сукупність особин *певного виду* мікроорганізмів називається *чистою культурою*, або *популяцією*. Культура, у якій утримується більш ніж один вид мікробів, називається *змішаною*, або *гетерогенною*. Всі природні мікробіальні явища й біологічні процеси здійснюються гетерогенними культурами.

Величина популяції виражається чисельністю особин або сумарною біомасою окремих особин.

*Чисельність* особин у популяції в лабораторному або промисловому ферментаторі можна визначити прямим підрахунком у певному об'ємі під мікроскопом або за кількістю колоній у чашці Петрі з наступним перерахуванням на робочий об'єм ферментатора.

*Біомасу* популяції у ферментаторі можна визначити зважуванням біомаси клітин, виділеної шляхом фільтрації або центрифугування з одиниці об'єму мікробної суспензії, з наступним перерахуванням на робочий об'єм ферментатора.

Щільність популяції характеризується кількістю особин в одиниці об'єму (млн/см<sup>3</sup>, млрд/см<sup>3</sup>) або концентрацією біомаси особин в одиниці об'єму (г/л, кг/м<sup>3</sup>).

Ріст клітин характеризується декількома параметрами, з яких найважливіші – швидкість росту, фізіологічна активність й економічний коефіцієнт.

Кожна популяція збільшує або зменшує свою щільність (біомасу) з певною швидкістю. Розрізняють загальну швидкість росту  $V_+$  і відмирання  $V_-$  та відносну (питому) швидкість росту  $\mu$  і відмирання  $\epsilon$ .

При періодичному культивуванні швидкість росту популяції неперіодична і частіше визначається середня швидкість росту  $V_{+ \text{ серед.}}$ .

Позначимо біомасу через  $X$ , час росту клітин – через  $t$ . Концентрацію біомаси в початковий момент часу розмноження клітин  $t_0$  позначимо як  $X_0$ , концентрацію біомаси через проміжок часу  $t_1$  – як  $X_1$ . Середня швидкість росту клітин визначиться як

$$V_{+ \text{ ср}} = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}, \quad (2.1)$$

де  $X_1 - X_0$  – приріст біомаси, г, визначений експериментально;  $t_1 - t_0$  – час приросту біомаси з  $X_0$  до  $X_1$ , (хв).

*Загальна швидкість росту* біомаси  $V_+$  пропорційна її кількості

$$V_+ = \frac{dX}{dt}, \quad (2.2)$$

де  $dX$  – приріст біомаси  $X$  за нескінченно малий проміжок часу  $dt$ .

*Питома швидкість росту* виражає приріст одиниці біомаси популяції в одиницю часу

$$V_+ = \mu X, \quad (2.3)$$

$$\mu = \frac{V_+}{X} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}. \quad (2.4)$$

Тут  $\mu$  – питома швидкість росту, має розмірність  $t^{-1}$ . Величина  $\mu$  – основний параметр, що характеризує ріст.

*Загальна швидкість відмирання* особин дорівнює відношенню зниження біомаси популяції за час, за який відбулося це зниження:

$$V_- = -\frac{dX}{dt}. \quad (2.5)$$

Питома швидкість відмирання  $\varepsilon$  виражає зниження кожної одиниці біомаси популяції в одиницю часу:

$$\varepsilon = \frac{V_-}{X} = -\frac{1}{X} \frac{dX}{dt}, \quad (2.6)$$

де  $\varepsilon$  має розмірність  $t^{-1}$ .

Біомаса, що утворюється в перерахуванні на одиницю спожитого субстрату  $S$ , називається *економічним коефіцієнтом*  $Y$  або коефіцієнтом приросту біомаси

$$Y = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_1 - X_0}{S_0 - S} \quad (2.7)$$

або більш строго

$$Y = -\frac{dX}{dS}, \quad (2.8)$$

тому що  $Y$  – межа, до якої прямує відношення  $\frac{\Delta X}{\Delta S}$  при  $\Delta S \rightarrow 0$ .

Оскільки біомаса  $X$  зростає, а концентрація субстрату  $S$  зменшується, вводиться знак « $-$ ». Значення  $Y$  змінюється в широких межах залежно від природи субстрату, видів мікроорганізмів й умов навколишнього середовища.

Поживні речовини, споживані клітиною, крім конструктивного обміну, витрачаються й для енергетичних цілей. З урахуванням витрати поживних речовин на метаболізм у цілому швидкість споживання субстрату можна виразити в такий спосіб:  $dS/dt = qX$ , де  $q$  – метаболічний коефіцієнт, або питома швидкість метаболізму (фізіологічна активність).

Величини  $\mu, Y, q$  пов'язані між собою таким відношенням

$$q = \mu / Y. \quad (2.9)$$

Вираз (2.9) використовують для визначення потреби в субстраті при різних швидкостях росту.

## 2.2. Способи культивування мікроорганізмів

Для вирощування (культивування) мікроорганізмів застосовують два способи – поверхневий і глибинний, які реалізуються переважно в аеробних умовах. Вибір способу залежить від кінцевої мети культивування: це або нагромадження біомаси, або одержання певного продукту життєдіяльності мікроорганізму (метаболіту).

Технологія вирощування мікроорганізмів *поверхневим способом* досить проста. Вона полягає в тому, що мікроорганізми культивують на поверхні твердих або рідких живильних середовищ. Як тверді живильні середовища використовують агаризовані середовища або сипучі субстрати (пшоно, ячмінь, пшеничні висівки і ін.). Агаризовані живильні середовища стерильно розливають по пробірках, чашках Петрі, скляних флаконах. Після засіву культури на стерильне живильне середовище пробірки або чашки Петрі поміщають у термостат, де при певній температурі відбувається ріст і розвиток мікроорганізмів. Сипучі субстрати рівномірно розподіляють шаром у спеціальні кювети, які після засіву посівного матеріалу поміщають у ростильні камери. Вирощування мікроорганізмів при

оптимальних умовах триває протягом декількох днів. Після завершення процесу вирощування мікроорганізмів виділяють кінцевий продукт. Процес вирощування мікроорганізмів поверхневим способом закінчується за певний період часу й тому є періодичним.

Вирощування мікроорганізмів *глибинним способом* відбувається в повному обсязі рідкого живильного середовища у спеціальному апараті – *ферментаторі* (рис. 2.1). Вирощування мікроорганізмів глибинним способом може бути періодичним і безперервним (проточним).

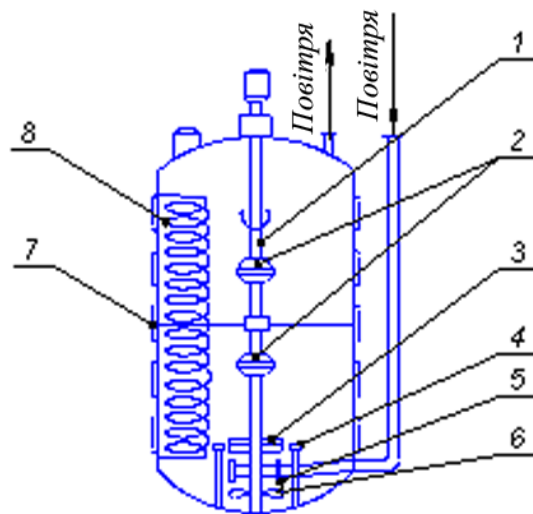


Рисунок 2.1 – Будова ферментатора:

1 – вал; 2, 3, 6 – мішалки; 4 – статор; 5 – барботер, 7 – сорочка,  
8 – змійовик

При періодичному способі глибинного культивування у ферментатор завантажують відразу весь обсяг живильного середовища і вносять посівний матеріал. Суміш живильного середовища й зростаючих у ньому мікроорганізмів називають *культуральною рідиною*. Тому що мікроорганізми можуть утилізувати тільки розчинений у воді кисень, а розчинність кисню у воді невелика, то для забезпечення росту аеробних мікроорганізмів їх необхідно постачати киснем. Процес підведення кисню вглиб рідкого середовища називається аерацією. Аерація здійснюється продуванням стерильного повітря через культуральне рідину. Для інтенсифікації процесу розчинення повітря його пропускають через *барботери*, розташовані на днищі реактора.

Примусову аерацію у ферментаторах, як правило, проводять із перемішуванням середовища за допомогою мішалок. Це забезпечує максимальний контакт клітин з киснем повітря, поживними речовинами, різко збільшує поверхню зіткнення клітин і дозволяє підтримувати максимальну швидкість виходу метаболітів із клітин.

Вирощування мікроорганізмів проводять в оптимальних умовах протягом певного часу, після чого процес зупиняють, зливають вміст ферментатора й виділяють цільовий продукт.

При безперервному способі глибинного культивування живильне середовище безупинно подається у ферментатор, у якому створюють оптимальні умови для росту мікроорганізмів, а з ферментатора також безупинно випливає культуральна рідина разом з мікроорганізмами.

Ясно, що умови для росту мікроорганізмів при періодичному й безперервному процесі істотно відрізняються. При періодичному процесі концентрація поживних речовин у середовищі із часом зменшується, а зміст продуктів метаболізму збільшується, що несприятливо впливає на життєдіяльність мікроорганізмів. При безперервному процесі ці два показники підтримують на постійному рівні, що створює найбільш сприятливі умови для росту мікроорганізмів.

На ріст і розмноження мікроорганізмів істотний вплив мають склад й якість живильного середовища. Живильні середовища, використовувані для культивування мікроорганізмів, повинні містити речовини, що задовольняють їхні потреби в структурних елементах й енергії. Основні хімічні елементи, необхідні для всіх без винятку мікроорганізмів і споживані у відносно великих кількостях, – вуглець, азот, кисень і водень. Крім того, мікроорганізми мають потребу у фосфорі, калії, сірці, натрії, магнії й інших елементах.

Зазначені елементи можуть бути присутні у живильному середовищі в різних формах і сполуках.

Роль джерел вуглецю, азоту й фосфору в процесах мікробіологічного синтезу є першорядною. Від інших компонентів мінерального живильного середовища ці речовини відрізняє порівняно висока швидкість їхнього споживання мікроорганізмами й необхідність підтримки в середовищі високих «фонових» концентрацій.

Особливістю процесів мікробіологічного синтезу є залежність стехіометричних коефіцієнтів споживання основних поживних речовин від фізіологічної активності клітин. При розрахунку цих коефіцієнтів загальні витрати поживних речовин (субстрату) можна розділити на витрати, пов'язані із процесами побудови біомаси, і на витрати, пов'язані із процесами метаболізму мікроорганізмів.

Витрати субстрату на приріст біомаси

$$\frac{dS}{dt} = \alpha_1^S \frac{dX}{dt}. \quad (2.10)$$

Витрати субстрату на основний обмін (метаболізм)

$$\frac{dS}{dt} = \alpha_2^S X. \quad (2.11)$$

Тоді загальні витрати субстрату на процес мікробного синтезу будуть дорівнювати сумі зазначених витрат

$$\frac{dS}{dt} = \alpha_1^S \frac{dX}{dt} + \alpha_2^S X, \quad (2.12)$$

де  $S$ ,  $X$  – концентрація субстрату й біомаси;  $\frac{dS}{dt}$ ;  $\frac{dX}{dt}$  – швидкість споживання субстрату й росту біомаси відповідно. Уведемо позначення  $\alpha_1^S = a$ ;  $\alpha_2^S = b$  і перетворимо вираз (2.12)

$$\frac{dS}{dt} = \left[ a \frac{dX}{dt} + bX \right], \quad (2.13)$$

розділивши обидві частини рівняння на  $\frac{dX}{dt}$ , одержимо

$$\frac{dS}{dX} = a + b \frac{Xdt}{dX},$$

де  $\frac{dS}{dX} = \alpha^S$  – стехіометричний коефіцієнт перетворення субстрату в біомасу; звідки

$$\alpha^S = a + \frac{b}{\mu}. \quad (2.14)$$

Формула (2.14) дозволяє розрахувати питому витрату субстрату, окремих компонентів субстрату й продуктів метаболізму в процесі біосинтезу клітинної маси.

*Приклад.* Розрахувати питому витрату субстрату, кисню, виділення вуглекислого газу, метаболічної води й тепла в процесі безперервного вирощування дріжджів на *n*-парафінах при питомій швидкості росту  $\mu = 0,18 \text{ г}^{-1}$ .

Середні значення коефіцієнтів *a* й *b* для розрахунку стехіометричних співвідношень  $\alpha^{O_2}$ ,  $\alpha^S$ ,  $\alpha^{CO_2}$ ,  $\alpha^{H_2O}$  при вирощуванні дріжджів на *n*-парафінах становлять

для вуглеводнів:  $a = 0,85 \text{ кг/кг}$ ;  $b = 0,038 \text{ кг/кг} \cdot \text{г}$ ;

для кисню:  $a = 1,35 \text{ кг/кг}$ ;  $b = 0,13 \text{ кг/кг} \cdot \text{г}$ ;

для діоксида вуглецю:  $a = 0,90 \text{ кг/кг}$ ;  $b = 0,10 \text{ кг/кг} \cdot \text{г}$ ;

для метаболічної води:  $a = 0,61 \text{ кг/кг}$ ;  $b = 0,045 \text{ кг/кг} \cdot \text{г}$ .

- Використовуючи загальну залежність вигляду  $\alpha^S = a + \frac{b}{\mu}$ , а та-

кож співвідношення, що визначає кількість тепла, яке виділяється в процесі біосинтезу при споживанні 1 г кисню (у середньому 14,2 кДж/г), одержимо для субстрату (вуглеводнів):  $\alpha^S = 0,85 \text{ кг/кг} + 0,038 \text{ кг/кг} \cdot \text{г} / 0,18 \text{ г}^{-1} = 1,06 \text{ кг субстрату на 1 кг біомаси}$ ;

- для кисню:  $\alpha^{O_2} = 1,35 \text{ кг/кг} + 1,35 \text{ кг/кг} \cdot \text{г} / 0,18 \text{ г}^{-1} = 2,08 \text{ кг кисню на 1 кг біомаси}$ ;

- для діоксиду вуглецю:  $\alpha^{CO_2} = 0,90 \text{ кг/кг} + 0,10 \text{ кг/кг} \cdot \text{г} / 0,18 \text{ г}^{-1} = 1,46 \text{ кг діоксиду вуглецю на 1 кг біомаси}$ ;

- для метаболічної води:  $\alpha^{H_2O} = 0,61 \text{ кг/кг} + 0,045 \text{ кг/кг} \cdot \text{г} / 0,18 \text{ г}^{-1} = 0,86 \text{ кг метаболічної води на 1 кг біомаси}$ .

Виділення тепла в процесі біосинтезу в перерахуванні на 2,08 кг (2080 г) поглинутого кисню складе:

$$\alpha^Q = 14,2 \text{ кДж/г} \cdot 2080 \text{ г} = 29,5 \text{ тис. кДж на 1 кг біомаси.}$$

### 2.3. Закономірності росту періодичної культури мікроорганізмів

Ріст культури в часі підпорядковується певній закономірності. Для виявлення цієї закономірності в живильне середовище вносять деяку кількість культури мікроорганізмів і через рівні інтервали часу відзначають приріст клітин. Протягом експерименту поживні речовини в середовище не додають і продукти обміну клітин не видаляють. Така культура називається *статичною*. Ріст статичної культури в часі описується кривою 1 на рис. 2.2.

Цю криву називають *S-подібною* або *кривою росту мікроорганізмів*. Вона являє собою узагальнений опис численних експериментальних спостережень, у результаті яких було встановлено, що закономірності росту й розвитку чистої культури справедливі й для складних гетерогенних культур.

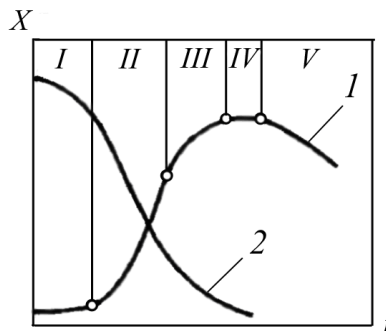


Рисунок 2.2 – Закономірності росту статичної культури:  
1 – ріст культури в часі, 2 – крива споживання субстрату

Для опису закономірностей мікробного росту в гетерогенній культурі протягом дослідження оцінюють зміну концентрації біомаси  $X$  за сухою речовиною (у мг/л). Крива 2 на тому ж рисунку характеризує процес споживання клітинами субстрату  $S$ . На кривій росту виділяють кілька

ділянок (фаз розвитку), кожна з яких характеризується індивідуальними умовами існування культури. У кожній фазі клітинам властиві свої швидкість розмноження, розміри й біохімічна активність.

Фаза *I* – фаза затримки росту – називається лаг-фаза (від англ. *Lag* – відставання). У лаг-фазі можна виділити два періоди. У першому періоді клітини пристосовуються до умов навколишнього середовища, інтенсивно синтезуючи адаптивні ферменти.

Клітини не розмножуються ( $\mu = 0$ ). У цей період може спостерігатися дуже невеликий приріст біомаси за рахунок збільшення розмірів клітин. У другому періоді лаг-фазы питома швидкість росту  $\mu$  збільшується, досягаючи до кінця фази максимального значення.

За лаг-фазою слідує *II* фаза росту – *логарифмічна* або *експонентна*. Клітини починають розмножуватися з постійною, максимально можливою в даних умовах питомою швидкістю ( $\mu = \mu_{\max}$ ). Експонентний ріст популяції описує рівняння

$$X = X_0 e^{\mu_{\max} \tau}, \quad (2.15)$$

де  $X_0$  – кількість біомаси або число кліток у початковий момент часу;  $e$  – основа натурального логарифма.

При логарифмуванні цього рівняння одержуємо

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\max} \tau, \quad (2.16)$$

звідки видно, що логарифм кількості біомаси або числа клітин збільшується з постійною швидкістю. Тому цю фазу й називають логарифмічною.

Тривалість цієї фази залежить від запасу поживних речовин у середовищі, умов аерації, перемішування й інших факторів. У міру росту культури в середовищі поступово споживаються поживні речовини, накопичуються продукти обміну, утрудняється транспорт поживних речовин (у першу чергу кисню) і метаболітів внаслідок збільшення щільності популяції.

Сукупність цих факторів або один з них зумовлюють зниження питомої швидкості росту культури й перехід до третьої фази розвитку по-

пуляції – фази *уповільненого росту*. Інтенсивність розподілу клітин падає, тому що змінюються умови існування культури, зменшується кількість поживних речовин, накопичуються токсичні продукти обміну. Подальше споживання субстрату й виділення метаболітів приводять до повного припинення росту й переходу культури в четверту, *стаціонарну* фазу. Ріст під час стаціонарної фази відбувається, але кількість й маса клітин не зростають, тому що одночасно відбувається загибель частини клітин й автоліз біомаси ( $\mu = \epsilon$ ). Плато на кривій росту відповідає нижній точці на кривій видалення субстрату. П'ята фаза росту – експонентна фаза загибелі клітин ( $\epsilon = \max$ ), *фаза відмирання*. До початку цієї фази значна частина клітин ще жива й використовує як джерело вуглецю ендогенні субстрати. Такий процес називається *ендогенним диханням*. Спочатку клітини окисляють запасні речовини, потім клітинні ліпіди, вуглеводи й, нарешті, білки. Самоокислення клітинної речовини приводить до зменшення біомаси. У цій фазі клітини більш дрібні, але вони стійкіші до фізичних і хімічних впливів навколишнього середовища.

Характер кривої на рис. 2.2 показує, що необмежений ріст клітин у статичній культурі неможливий. Основні причини цього – вичерпання джерел харчування, зміни в навколишньому середовищі в результаті виділення токсичних продуктів обміну, нестача життєвого простору.

Періодичний спосіб вирощування мікроорганізмів використовується на стадії одержання посівного матеріалу для багатьох виробництв незалежно від того, безперервною або періодичною буде головна стадія – ферментація. Незважаючи на переваги безперервного культивування, багато промислових процесів продовжують носити періодичний характер через труднощі, пов'язані із властивостями мікроорганізмів – продуцентів, і т.ін. Тому знання стадій розвитку популяції має величезне значення для успішного проведення всього технологічного процесу.

При періодичному культивуванні не використовується повною мірою здатність мікроорганізмів до максимального розмноження. Період самої активної життєдіяльності – логарифмічна фаза – займає лише невелику частину виробничого циклу, а значна частина часу йде на лаг-фазу й період уповільненого росту.

При періодичному культивуванні клітини увесь час перебувають в умовах, що змінюються. На початковому етапі в живильному середовищі в надлишку є всі поживні речовини, а потім поступово виникає дефіцит харчування й нагромадження продуктів життєдіяльності мікроорганізмів, що уповільнюють ріст клітин. Однак існують методи, що дозволяють збільшити час перебування популяції на одній з фаз розвитку. До них відносяться:

- метод *дробового дозування субстрату*, коли поживні речовини вводять у культуральне середовище протягом усього періоду росту культури через певні проміжки часу або безупинно по краплях;
- метод *від'ємно-доливного* культивування, коли частина культури періодично віддаляється з апарата при одночасному додаванні еквівалентної кількості свіжого живильного середовища. Це дозволяє знизити концентрацію продуктів життєдіяльності мікроорганізмів у середовищі й зберегти постійним його обсяг.

Однак ці методи не можуть забезпечити стабільний фізіологічний стан клітин.

Періодичний спосіб культивування мікроорганізмів знаходить широке застосування в мікробіологічних виробництвах при одержанні амінокислот, антибіотиків, ферментних препаратів й інших продуктів мікробного синтезу. Цьому способу властиві недоліки: нестабільний рівень фізіологічного стану культури, змінність режимів, циклічність операцій, низька продуктивність устаткування, складність автоматизації й регулювання процесів. Однак на сучасному етапі в ряді виробництв від цього методу не можна відмовитися через складність і дорожнечу апаратурного оформлення безперервного процесу, що забезпечує підтримку чистоти виробничої культури.

#### **2.4. Безперервне культивування мікроорганізмів**

Безперервний спосіб культивування мікроорганізмів широко використовується в мікробіологічних виробництвах при одержанні кормових дріжджів, спиртів і при біологічному очищенні стічних вод.

Умовою безперервного глибинного культивування мікробної популяції є безперервне надходження живильного середовища в ферментатор з одночасним відбором з апарата культуральної рідини разом з біомасою, яка приросла, й розчиненими продуктами метаболізму. При цьому обсяг ферментаційного середовища в апараті, концентрація біомаси, субстратів і продуктів метаболізму в ній повинні бути постійними величинами.

Періодичну культуру можна перевести в режим безперервного культивування практично в будь-якій точці висхідної *S-подібної* кривої. Однак у промисловості економічно виправданими є процеси росту популяції, стабілізовані у фазі уповільненого росту. При цьому можна досягти високого ступеня утилізації субстрату мікробною популяцією й стійкої самостабілізації системи при швидкостях росту, близьких до максимальних.

Безперервне культивування полягає в безперервній подачі поживних речовин у ферментатор у такому кількісному і якісному співвідношенні, яке необхідне для підтримки мікроорганізмів в експонентній фазі розвитку. У цих умовах досягається рухливо-врівноважений стан, при якому клітини розмножуються зі швидкістю, що відповідає припливу поживних речовин. Одночасно частина культурального середовища разом зі завислими в ньому клітинами з тією ж швидкістю безупинно випливає з ферментатора, однак кількість мікроорганізмів, що підтримують безперервний процес, залишається у ферментаторі постійною.

Однією з важливих характеристик безперервного культивування є *швидкість розведення середовища* в апараті (або швидкість обміну живильного середовища в апараті) потоком живильного середовища,  $\text{г}^{-1}$ . Якщо позначити корисний (робочий) об'єм ферментатора  $V_p$  ( $\text{м}^3$ ), а швидкість надходження середовища – швидкість протікання –  $F$  ( $\text{м}^3/\text{г}$ ), то швидкість розведення  $D$  ( $\text{г}^{-1}$ ) буде дорівнювати:

$$D = F / V_p. \quad (2.17)$$

Виходячи зі співвідношення для питомої швидкості росту мікроорганізмів

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt},$$

миттєвий приріст біомаси можна виразити як

$$\frac{dX}{dt} = \mu X . \quad (2.18)$$

В умовах безперервного культивування миттєвий приріст біомаси  $\mu X$  компенсується її винесенням з середовищем  $DX$ . Процеси приросту біомаси й винесення біомаси, що приросла, з культуральною рідиною з ферментатора описуються рівнянням

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX . \quad (2.19)$$

Оскільки при безперервному культивуванні концентрація біомаси  $X$  у біореакторі є величиною постійною й, отже, миттєвий приріст біомаси  $\frac{dX}{dt} = 0$ , то в рівнянні (2.19) різниця

$$(\mu X - DX) \text{ дорівнює } 0, \text{ тобто } \mu X = DX.$$

Таким чином,

$$\mu = D. \quad (2.20)$$

Рівність (2.20) є основною умовою підтримки сталої рівноваги при безперервному культивуванні мікроорганізмів. У цьому випадку всі технологічні й фізіологічні показники зберігаються постійними. До технологічних показників відноситься концентрація компонентів культуральної рідини, а до фізіологічних – швидкість росту клітин й їх морфологічні й біохімічні особливості.

Сталий режим при безперервному культивуванні, коли швидкість розведення перебуває в рівновазі з питомою швидкістю росту, необхідно контролювати й підтримувати припливом живильного середовища. Однак система безперервного культивування мікроорганізмів має здатність саморегулювання.

Якщо сталий режим буде порушений зміною швидкості розведення, тобто відбудеться зміна швидкості подачі живильного середовища, то

система вийде з рівноваги й виникне ряд пов'язаних із цим змін її параметрів.

Припустимо, що швидкість розведення стала менше питомої швидкості росту мікроорганізмів, тобто  $D < \mu$ . Це значить, що приплив живильного середовища в реактор  $F$  зменшився. У зв'язку з цим час перебування середовища у ферментаторі збільшується, і концентрація біомаси  $X$  починає підвищуватися, що приводить до надлишку поживних речовин і нагромадження продуктів обміну. Все це несприятливо відбивається на швидкості росту, і вона починає падати. Внаслідок цього різниця  $(\mu - D)$  прямує до нуля, а система – до встановлення нової рухливої рівноваги. При цьому концентрація біомаси стабілізується на новому, більш високому рівні у порівнянні з первинним.

Якщо швидкість розведення стане вище питомої швидкості росту ( $D > \mu$ ), то, навпаки, збільшиться  $F$ , концентрація поживних речовин зросте, що позитивно вплине на питому швидкість росту – вона збільшиться. У результаті система прийде до нового стійкого режиму, що відповідає більш високій концентрації поживних речовин і більш низькій концентрації біомаси.

Таким чином, змінюючи вхідні дані (швидкість потоку або склад живильного середовища), можна переводити систему клітина – середовище з одного рухливо-рівноваженого стану в інший. Із цього слідує, що безперервні процеси мають саморегулюючу здатність у межах  $(\mu - \mu_{\max})$ , тобто до досягнення максимальної питомої швидкості росту. Коли швидкість розведення перевищить максимальну питому швидкість росту ( $D > \mu_{\max}$ ), то через певний строк всі мікроорганізми будуть вимиті з ферментатора.

Одним з важливих показників безперервного культивування є *продуктивність*, що визначається добутком швидкості розведення на концентрацію біомаси

$$P = DX. \quad (2.21)$$

Максимум продуктивності досягається при максимальній швидкості розведення, що називається критичною  $D_{\text{кр}}$ . При такій швидкості біомаса вимивається з ферментатора.

## 2.5. Математичний опис процесів безперервного культивування мікроорганізмів

Для процесів безперервного культивування клітин існують певні кількісні залежності між концентрацією біомаси  $X$ , концентрацією субстрату  $S$  і питомою швидкістю росту  $\mu$ .

Математичну модель процесу біосинтезу, як правило, складають у вигляді системи диференціальних рівнянь матеріального балансу, що описують динаміку зміни концентрацій біомаси, субстратів й основних продуктів метаболізму.

Характерна риса росту популяції мікроорганізмів – залежність питомої швидкості росту від концентрації субстрату. Ця залежність описується гіперболічною функцією, так званим *рівнянням Моно*

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}, \quad (2.22)$$

де  $\mu_{\max}$  – межа, до якої прагне  $\mu$  при підвищенні концентрації субстрату  $S$  у культуральній рідині, що впливає з ферментатора.

Ця залежність ураховує експериментально спостережуване явище насичення, коли при високих концентраціях субстрату питома швидкість росту практично не залежить від  $S$  і дорівнює константі  $\mu_{\max}$ . Параметр  $K_s$  – *константа насичення*, або *константа Моно*, чисельно рівна концентрації субстрату, при якій питома швидкість росту відповідає половині максимальної, тобто при  $S = K_s$   $\mu = 0,5 \mu_{\max}$ .

Значення  $K_s$  для багатьох мікроорганізмів невелике. Так, при культивуванні *Candida quilliermondij* на середовищах з рідкими парафінами  $K_s = 1,1 \text{ кг/м}^3$ . Це означає, що при залишковій концентрації парафінів  $1,1 \text{ кг/м}^3$  питома швидкість росту становить 50 % максимальної.

З формули Моно (2.22) слідує, що  $\mu_{\max}$  – чисто математична межа швидкості росту популяції, що практично досягти неможливо.

Культивування в промислових ферментаторах, як правило, проводять при  $\mu = 80 - 90 \% \mu_{\max}$ .

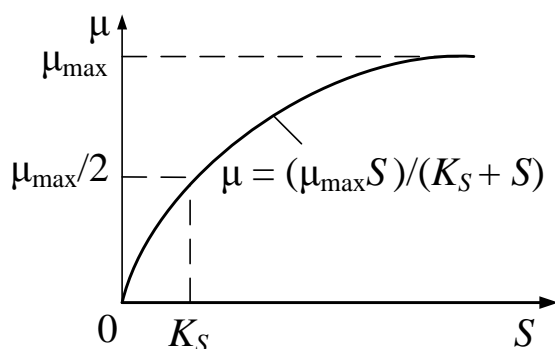


Рисунок 2.3 – Залежність питомої швидкості росту від концентрації субстрату

Підставивши значення  $\mu$  з (2.22) у формулу (2.19), одержимо перетворене математичне рівняння, що виражає ріст популяції й вимивання біомаси, що приросла, з ферментатора

$$\frac{dX}{dt} = X \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} - DX. \quad (2.23)$$

При безперервному культивуванні мікроорганізмів субстрат надходить у ферментатор, споживається популяцією, і частина його виноситься з культуральною рідиною. Цей процес описується математичним виразом

$$\frac{dS}{dt} = DS_0 - DS - \frac{X}{Y} \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}, \quad (2.24)$$

де  $DS_0$  й  $DS$  – приплив і відтік субстрату;  $\frac{X}{Y} \cdot \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}$  – спожитий субстрат;

$S_0$  – концентрація субстрату в припливному живильному середовищі (глюкоза, парафіни й т.д.);  $S$  – фактична концентрація субстрату, що виходить, в культуральній рідині;  $Y$  – економічний коефіцієнт, що виражає врожайність популяцій і дорівнює відношенню біомаси, що утворилася, до витраченого на синтез цієї біомаси субстрату.

Математична модель росту популяції при безперервному одноступінчастому культивуванні описується системою рівнянь (2.22), (2.23), (2.24).

При сталому режимі безперервного культивування (стаціонарному стані культури) виконується умова

$$\frac{dX}{dt} = \frac{dS}{dt} = 0.$$

У цьому випадку система рівнянь набуває вигляду

$$\begin{aligned}\mu &= \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}; \\ D &= \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S};\end{aligned}\tag{2.25}$$

$$X = Y(S_0 - S).$$

Залишкову концентрацію субстрату у ферментаторі в стаціонарному стані культури можна визначити, використовуючи друге рівняння системи (2.25) і вирішуючи його відносно  $S$ :

$$S = \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D}.\tag{2.26}$$

Підставивши (2.26) в останнє рівняння системи (2.25), одержимо вираз для визначення концентрації біомаси у ферментаторі в стаціонарному стані:

$$X = Y(S_0 - S) = Y\left[S_0 - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D}\right].\tag{2.27}$$

З рівнянь системи (2.25) слідує, що для керування безперервною культурою необхідно знати  $\mu_{\max}$ ,  $K_S$  й  $Y$ . Ці показники знаходять експериментально в лабораторних умовах при періодичному або безперервному культивуванні з наступним використанням у виробництві. При цьому лабораторні живильні середовища повинні відповідати виробничим.

На основі отриманих кінетичних залежностей можна визначити такі параметри роботи ферментатора безперервної дії, як швидкість протікання середовища  $D$  при заданому робочому об'ємі апарата  $V_p$ , концентрацію біомаси  $X$  і субстрату  $S$ , продуктивність апарата  $P$ , вихід біомаси з одиниці спожитого субстрату  $Y$ .

*Приклад.* Визначити значення параметрів процесу вирощування дріжджів на вуглеводневому субстраті при таких значеннях коефіцієнтів моделі:  $\mu_{\max} = 0,55 \text{ г}^{-1}$ ;  $K_S = 0,4 \text{ кг/кг}$ ;  $\alpha^S = 1,03 \text{ кг/кг}$ ;  $a = 0,8 \text{ кг/кг}$ ;  $b = 0,035 \text{ кг/кг}\cdot\text{г}$ ;  $S_0 = 20 \text{ кг/м}^3$ .

Використовуючи залежності вигляду  $\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}$ ;  $\alpha^S = a + \frac{b}{\mu}$ ;

$\frac{dS}{dX} = \alpha^S = \frac{1}{Y}$  одержимо після відповідних перетворень

$$\mu = \frac{b}{\alpha^S - a} = \frac{0,035}{1,03 - 0,8} = 0,152 \text{ г}^{-1};$$

$$S = \frac{\mu K_S}{\mu_{\max} - \mu} = \frac{0,152 \cdot 0,4}{0,55 - 0,152} = 0,151 \text{ кг/м}^3;$$

$$(S_0 - S) = \alpha^S X; \text{ звідси } X = \frac{S_0 - S}{\alpha^S} = \frac{20 - 0,151}{1,03} = 19,27 \text{ кг/м}^3;$$

$$Y = \frac{X}{S_0 - S} = \frac{19,27}{20 - 0,151} = 0,97 \text{ або } Y = \frac{1}{\alpha^S} = \frac{1}{1,03} = 0,97;$$

$$P = DX; \text{ тому що } \mu = D, \text{ тоді } P = 0,152 \cdot 19,27 = 29,29 \text{ кг/м}^3 \cdot \text{г}$$

Ступінь використання субстрату знайдемо за формулою

$$\varphi = \frac{S_0 - S}{S_0} \cdot 100 \%,$$

$$\varphi = \frac{20,0 - 0,152}{20,0} \cdot 100 = 99,24 \%.$$

При відомій годинній продуктивності підприємства по готовому продукту  $A$  (кг/г) можна визначити робочий об'єм ферментатора ( $m^3$ ), виходячи зі співвідношення

$$V_p = \frac{A_p}{D_p}.$$

### ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Якими параметрами характеризується ріст клітин мікроорганізмів?
2. Охарактеризуйте основні способи культивування мікроорганізмів.
3. Як розрахувати питому витрату субстрату і його окремих компонентів у процесі вирощування клітин?
4. Що показує характер *S-подібної* кривої росту культури в статичних умовах?
5. У чому полягає механізм саморегулювання швидкості росту культури в режимі безперервного культивування?
6. Які рівняння матеріального балансу для процесу росту культури в безперервному режимі ви знаєте?
7. Розкажіть методику розрахунку основних параметрів росту культури в безперервному режимі з використанням математичної моделі.

### РОЗДІЛ 3. ОСНОВНІ ПРИНЦИПИ ПРОМИСЛОВОГО ЗДІЙСНЕННЯ ПРОЦЕСІВ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Технологічні процеси, що базуються на мікробному синтезі, можна представити у вигляді певної послідовності стадій, причому більшість із них загальні для будь-якого мікробіологічного виробництва.

До цих стадій можна віднести такі п'ять технологічних операцій, які взаємозалежні, але відрізняються за цілями і принципами їхнього досягнення:

- *готування живильного середовища* – субстрату із заданими властивостями (рН, температура, концентрація поживних речовин) для вирощування клітин цільової культури мікроорганізмів;

- *отримання посівного матеріалу (інокулята)* – чистої культури мікроорганізмів, розмноженої до такої кількості, яка необхідна для внесення (посіву) у промисловий ферментатор, використовуваний на стадії ферментації. На цій же стадії здійснюється підтримка чистоти культури штаму, використовуваного у виробництві. Це ключове завдання будь-якого мікробіологічного виробництва, оскільки тільки чиста культура, без домішок інших штамів, може бути гарантією одержання цільового продукту із заданими властивостями й продуктивністю;

- *стадія ферментації* – основна стадія, на якій відбувається утворення цільового продукту (спирту, пива, біомаси дріжджів). Тут іде мікробіологічне перетворення компонентів живильного середовища спочатку в біомасу клітин, а потім, якщо це необхідно, у цільовий метаболіт;

- *стадія виділення й очищення цільових продуктів* – четверта стадія. Для промислових мікробіологічних процесів характерно, як правило, утворення дуже розведених водяних розчинів або суспензій, що містять, крім цільового, велику кількість речовин, що володіють близькими фізико-хімічними властивостями. Це робить досить специфічним й складним завдання виділення й очищення основних, з точки зору виробництва, продуктів;

- *готування товарних форм продуктів* – заключна стадія біотехнологічного виробництва. Тут також є свої особливості. Одна з них – необхідність випуску деяких продуктів (амінокислот, ферментів) у стерилі-

льній формі, що вимагає спеціальних рішень на стадії розфасування і укупорювання продукту. На рис. 3.1 наведено схему типового мікробіологічного виробництва.

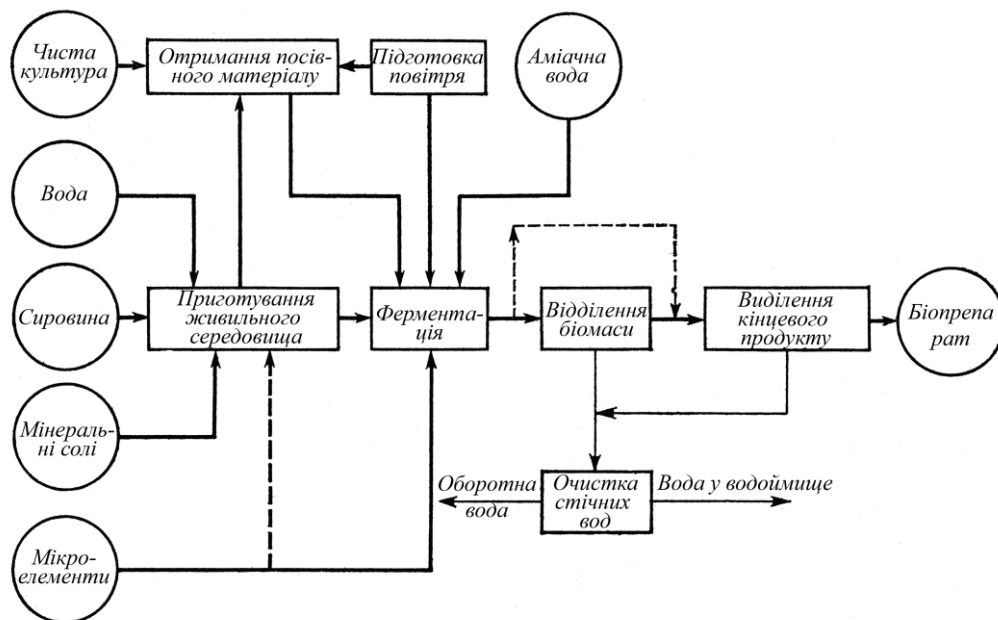


Рисунок 3.1 – Схема типового мікробіологічного виробництва

Загальною властивістю переважної більшості продуктів мікробіологічного синтезу є їхня недостатня стійкість до зберігання, оскільки самі ці продукти схильні до розкладання й представляють сприятливе середовище для розвитку сторонньої, найчастіше гнильної мікрофлори. Це вимагає вживання спеціальних заходів для підвищення схоронності продукції промислової біотехнології.

Нижче наводиться узагальнена характеристика кожної зі стадій промислового мікробіологічного синтезу, внутрішній взаємозв'язок яких робить кожне конкретне виробництво єдиним цілим.

### 3.1. Технологія готування живильних середовищ для вирощування мікроорганізмів

#### 3.1.1. Харчування мікроорганізмів

*Відношення мікроорганізмів до джерел харчування.* В основі життєдіяльності мікроорганізмів лежить обмін речовин, пов'язаний з надхо-

дженням поживних речовин у клітину й виділенням з неї продуктів життєдіяльності. Поживні речовини в мікробній клітині безупинно піддаються перетворенням, які приведуть до росту й розмноження клітини. Специфічність мікроорганізмів особливо проявляється в їхньому відношенні до джерел вуглецю й азоту. За цією ознакою вони умовно діляться на автотрофи й гетеротрофи.

*Автотрофи* (від грец. *auto* – сам, *trophe* – їжа) здатні одержувати вуглець із діоксиду вуглецю й карбонатів. До автотрофів, що представляють інтерес для мікробіологічної промисловості як джерела для одержання харчового й кормового білків, відносяться бактерії й деякі види водоростей.

*Гетеротрофи* (від грец. *heteros* – іншої) засвоюють в основному вуглець органічних сполук, наприклад, вуглеводів, парафінів, спиртів й ін. Більшість мікроорганізмів, використовуваних у мікробіологічній промисловості, відноситься до гетеротрофів. Серед них більшу групу становлять *сапрофіти*, що харчуються продуктами життєдіяльності інших організмів, або тканинами відмерлих рослин й тварин.

Для активного розвитку автотрофів і гетеротрофів поряд з вуглецем необхідні джерела азоту, фосфору, калію, натрію й інших компонентів.

Стосовно джерел азоту мікроорганізми ділять на автоаміноавтотрофи й гетероаміноавтотрофи. *Автоаміноавтотрофи* використовують азот мінеральних речовин. *Гетероаміноавтотрофи* використовують азот органічних сполук (амінокислот, білків й ін.).

### ***Загальні відомості про виробничі живильні середовища***

Живильні середовища повинні містити основні речовини, що забезпечують оптимальний ріст мікроорганізмів. Для здійснення біосинтезу, росту й розмноження клітина повинна одержувати ззовні в необхідних кількостях всі елементи, що містяться в ній.

За фізичним станом живильні середовища можна розділити на три групи: *тверді* (приготовлені на агар-агарі, желатині), *рідкі* й *сипучі* (звложені висівки, зерно).

За складом живильні середовища ділять на дві основні групи: натуральні й синтетичні.

*Натуральними* називають середовища невизначеного хімічного складу, які включають продукти тваринного або рослинного походження. Основою для натуральних середовищ є різні частини зелених рослин, тваринні тканини, солод, дріжджі, овочі, фрукти. Переважна їхня більшість використовується у вигляді екстрактів і настоїв. До складу виробничих середовищ входять речовини, багаті вуглеводами (кукурудзяне борошно, гідрол, патока, пшеничне борошно) і азотом (білкові продукти – соєве борошно, макуха, кукурудзяний екстракт).

Натуральні середовища непостійні за складом, тому що істотно залежать від сировини й умов готування, тому вони малозастосовувані для багатотоннажних виробництв.

*Синтетичні середовища* – це такі, до складу яких входять певні, хімічно чисті сполуки, узяті в точно зазначених концентраціях. Їх готують на дистильованій воді. Синтетичні середовища можуть бути досить простими, тобто складатися з невеликої кількості речовин, а можуть бути комплексними, тобто складеними з великої кількості різних компонентів. У цей час у розпорядженні фахівців є достатня кількість синтетичних середовищ, що не поступаються за своїми якостями складним натуральним середовищам.

### *Характеристика основних компонентів виробничих живильних середовищ*

Основою живильних середовищ для культивування мікроорганізмів є джерела вуглецю. Виняткове різноманіття мікроорганізмів робить кількість таких сполук майже безмежною, тому що, з одного боку, існують культури, здатні в процесі біосинтезу споживати вуглець тільки з високоорганізованих молекул, наприклад білків і пептидів, а з іншого – багато бактерій і частково дріжджі утилізують такі найпростіші вуглець-вмісні сполуки, як метанол і навіть діоксид вуглецю.

Крім вуглецю, клітини мікроорганізмів у процесі росту мають потребу у джерелах азоту, фосфору, макро- і мікроелементів. Всі речовини

цього роду перебувають у живильних середовищах у вигляді солей. У переважній більшості випадків у промислові середовища для культивування попередньо вносяться всі необхідні елементи харчування, крім кисню, і в деяких виробництвах – вуглецю, якщо останній уводиться у вигляді газоподібної сполуки ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  і т. ін.).

Нижче наводиться характеристика основних джерел поживних речовин, використовуваних мікроорганізмами.

*Джерела вуглецю в живильних середовищах:*

- *метиловий спирт*; одержують каталітичним синтезом з оксиду вуглецю й водню, із природного газу (метану) і при хімічній переробці деревини. Завдяки високій чистоті й необмеженій розчинності у воді метиловий спирт відноситься до перспективних джерел вуглець-вмісної сировини для багатотоннажних виробництв, наприклад, мікробного кормового й харчового білків;

- *етиловий спирт*; одержують мікробіологічним способом і хімічним шляхом – гідратацією етилену. Синтетичний етиловий спирт значно дешевше отриманого мікробіологічним способом й є джерелом вуглецю при виробництві мікробного кормового й харчового білків й інших продуктів мікробіологічного синтезу;

- *оцтова кислота*; є продуктом хімічного синтезу. Залежно від сорту містить від 80 до 99,5 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Оцтова кислота є перспективним видом сировини у виробництві амінокислоти (лізину);

- *деревинна сировина*; являє собою багаторічні рослинні тканини, що містять целюлозу, лігнін й інші речовини. Джерелом вуглецю в цій сировині можуть бути гексози, пентози, органічні кислоти. У сировині вони у вільному стані практично не зустрічаються, але можуть бути отримані в результаті спеціальної обробки – гідролізу при високих температурах у гідроліз-апаратах. Полісахариди деревини в процесі гідролізу перетворюються в розчинні у воді моносахариди, які легко засвоюються мікроорганізмами.

У промисловому виробництві використовується, як правило, не цілісна деревина, а відходи її переробки – обапіл, тріска, тирса. Крім відходів деревообробки, можуть використатися сільськогосподарські відходи: соняшникова лузга, кукурудзяні качани, рисова лушпайка, солома, а та-

кож *торф* що мало розклався, який, крім полісахаридів (50 %) містить азот і фосфор у доступній для мікроорганізмів формі. Розчин, одержуваний у процесі гідролізу деревини, називається *гідролізат*; якість його як субстрату для вирощування мікроорганізмів оцінюється за вмістом моносахаридів. Вміст цукрів у гідролізатах залежить від властивостей сировини, способу гідролізу й інших факторів;

- *меласа*; є відходом бурячно-цукрового й очеретяно-цукрового виробництва, що містить від 67 до 85 % сухих речовин. Основними компонентами меласи є сахароза (40–55 %) і зольні речовини (8–13 %). Крім того, вона містить комплекс вітамінів, амінокислот й інших факторів росту. Меласа є сировиною при виробництві харчових дріжджів й етилового спирту, амінокислот, антибіотиків й інших продуктів мікробного синтезу;

- *меласна барда*; є відходом меласно-спиртових заводів і містить 7–10 % сухих речовин. У сухі речовини входить близько 70–80 % органічних компонентів і до 20–30 % неорганічних сполук. Значну частину органічних компонентів становлять органічні кислоти, азотвмісні сполуки й невелику частину – вуглеводи;

- *молочна сироватка*; є побічним продуктом при виробництві сиру й казеїну та містить 5,3–6,9 % сухих речовин. У її склад входять 4–4,8 % молочного цукру, 0,5–1 % білку, 0,5–0,7 % зольних речовин, 0,05–0,4 % жиру й біологічно активні речовини. Молочна сироватка є перспективним живильним середовищем при виробництві різних продуктів мікробного синтезу;

- *кукурудзяне борошно*; містить 67–70 % крохмалю й близько 10 % інших вуглеводів, 10–12 % білку, до 4 % жиру, 0,8–1,0 % зольних елементів і біологічно активні речовини. Кукурудзяне борошно входить до складу живильних середовищ головним чином як джерело вуглеводів.

#### *Джерела азоту в живильних середовищах*

У складі мікроорганізмів азоту в 5–6 разів менше, ніж вуглецю, тому що значна частина споживаного мікроорганізмами вуглецю витрачається на енергетичні цілі. Тому вміст вуглецю в живильних середовищах повинен бути набагато більше, ніж азоту. Проте, навіть невелика нестача азоту в живильному середовищі приводить до «ожиріння» клітин, тобто під-

вищенню вмісту в них ліпідів за рахунок зменшення вмісту білків й амінокислот.

Джерелами азоту для більшості мікроорганізмів є складні органічні, а також неорганічні азотвміщені речовини:

- *кукурудзяний екстракт* – побічний продукт крохмале -патокового виробництва. При виробництві крохмалю кукурудзяне зерно замочують у воді, а потім випарюють замочні води до вмісту сухої речовини (48–50%). У процесі замочування зерна відбувається ферментативний гідроліз білків кукурудзи, внаслідок цього біля половини азотвмісних речовин екстракту являє собою суміш амінокислот, поліпептидів і білків. Крім того, екстракт містить вітаміни групи В (біотин), деякі ростові речовини і біостимулятори. Таким чином, цінність кукурудзяного екстракту як компонента живильного середовища визначається наявністю добре ассимільованих джерел органічного азоту, вуглецю й мікроелементів;

- *висівки пшеничні* – відходи зернопереробного виробництва. Вони містять (в %): азотисті речовини – 15,0, крохмаль – 22; пентозани – 24, а також сахарозу, жири, зольні елементи;

- *соєве борошно* одержують при розмелюванні соєвого зерна, а також соєвої макухи й шроту, що утворюються після витягу соєвого масла. Містить до 30 % азотвмісних речовин, головним чином, білків. Основним білком є гліцин, що містить майже всі амінокислоти. У соєвому борошні міститься до 25 % вуглеводів, (4,5–6,5 %) золи, вітаміни групи В, Д та А. До складу золи входить біля 45 % оксиду калію, 30 % фосфорного ангідриду й 7,0 % оксидів магнію й кальцію, а також ряд мікроелементів;

- *нітрат амонію* (аміачна селітра)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – безбарвні кристали, добре розчиняються у воді з поглинанням теплоти; водяні розчини мають кислу реакцію. Використовується як джерело азоту й для підкислення середовища;

- *сульфат амонію*  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – добре розчиняється у воді з поглинанням теплоти; вміст азоту (20–21) %;

- *карбамід* (сечовина)  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  – висококонцентроване (46,5 %) джерело азоту. При використанні потрібно враховувати, що карбамід при термічній стерилізації руйнується;

- *аміачна вода*  $\text{NH}_4\text{OH}$  – безбарвна рідина з різким специфічним запахом, легко випаровується, отруйна. Використовується як джерело азоту й регулятор рН середовища. Аміачна вода I сорту містить не менше 25 %, а II сорту – не менш 20 % азоту;

Крім перерахованих, як азотвміщуючої сировини використовують гідролізат мезги, екстракт солодових паростків, пивну дробину й т.д.

#### *Джерела фосфору в живильних середовищах*

Фосфор є дуже важливим елементом живильного середовища. Він забезпечує нормальне протікання енергетичного обміну в клітині, а також найголовніших біосинтетичних процесів (синтез білків і нуклеїнових кислот, гліколіз). Від концентрації фосфору в середовищі залежить швидкість росту культури. Джерелами фосфору є:

- *амофос*; являє собою суміш моноаммонійфосфатів  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  і диаммонійфосфатів  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , а також нерозчинних домішок (шламу), що становлять 6–7 % до маси сухої речовини. Амофос є джерелом не тільки фосфору, але й азоту;

- *ортофосфорна (фосфорна) кислота*  $\text{H}_3\text{PO}_4$  – використовується як джерело фосфору й для підкислення середовища. Вміст  $\text{P}_2\text{O}_5$  – 50,7 %.

#### *Джерела вітамінів, макро- і мікроелементів*

Обмін речовин у клітинах мікроорганізмів не може протікати без вітамінів, макро- і мікроелементів. Мікроорганізми, як правило, не здатні синтезувати вітаміни, тому необхідно їхнє введення до складу середовища. Найбільша потреба у мікробів існує в комплексі вітамінів групи В, куди входять тіамін, нікотинова, пантотеїнова кислоти, піридоксин, інозит і біотин. Найбільший недолік у мікроорганізмів виявляється в біотині. Вітаміни вносяться або із сировиною, у якому вони містяться, або окремо.

Макро- і мікроелементи входять до складу активних центрів ферментів, що забезпечують обмін речовин мікроорганізмів, що активують процеси дихання, окислювально-відновні реакції й інші процеси життєдіяльності клітини.

Найбільший вплив на ріст і розвиток мікроорганізмів роблять іони калію, заліза, міді, марганцю, цинку, бора, молібдену, кобальту й ряду інших елементів. Мікроорганізми, як правило, мають потребу в мікродо-

зах цих елементів. Підвищена концентрація цих елементів уповільнює ріст і розвиток мікроорганізмів.

Як джерела калію використовуються солі: карбонат калію  $K_2CO_3$ , сульфат калію  $K_2SO_4$ , хлорид калію  $KCl$ . Джерелами магнію, марганцю, заліза, цинку зазвичай є сульфати цих металів.

#### *Вода*

Вода необхідна для розвитку мікроорганізмів не менше, ніж поживні речовини. Вона є основою рідких живильних середовищ. Від якості води багато в чому залежить якість готового середовища, тому її склад, властивості, вміст домішок жорстко регламентовані.

Для готування живильних середовищ воду беруть із водопроводу, артезіанських скважин або відкритих водойм після відповідної обробки. Вода повинна бути біологічно чистою, безбарвною, без присмаку й запаху, не повинна давати осаду. Сухий залишок води не повинен перевищувати 1000 мг/л, загальна твердість не повинна бути більше 7 мг-екв/л. Занадто тверда вода сповільнює ріст мікроорганізмів.

Вміст шкідливих домішок у воді не повинен перевищувати таких значень, мг/л:

Свинець	0,1	Цинк	5,0
Миш'як	0,05	Мідь	3,0
Фтор	1,5		

Загальна кількість мікроорганізмів в 1 мл води не повинна перевищувати 100.

У мікробіологічній промисловості воду використовують не тільки для готування середовищ, але й для охолодження, для миття апаратів і т.д. Мікробіологічне виробництво вимагає великої кількості чистої води. Так, наприклад, у виробництві хлібопекарських дріжджів на одержання 1 т дріжджів витрачається 150–180 м<sup>3</sup> води.

#### *Принципи складання живильних середовищ*

Для нормального росту мікроорганізмів і біосинтезу цільових продуктів метаболізму недостатньо тільки присутності в живильному середовищі всіх необхідних компонентів. Необхідно також, щоб ці компоненти містилися у певних співвідношеннях. Крім того, з великої кількості дже-

рел того або іншого компонента потрібно вибрати найбільш відповідний фізіологічним потребам цієї культури.

З техніко-економічної точки зору живильне середовище – це сировина для одержання цільового продукту. Сировина повинна бути недефіцитною, недорогою, по можливості легко доступною. Можна застосовувати й дорогу сировину, але в цьому випадку прибуток від збуту продукту повинен компенсувати витрати на придбання сировини.

Для попереднього підбору кількості компонентів живильного середовища зазвичай використовують дані хімічного складу біомаси. Зрозуміло, живильне середовище, складене на основі зразкового балансу компонентів, навряд чи забезпечить оптимальні умови для росту культури. Воно є лише вихідною точкою для підбору оптимального складу середовища, який проводять експериментально, варіюючи в певних межах концентрації всіх компонентів середовища. При підборі складу середовищ часто використовують математичні методи планування й обробки експериментів, що різко скорочує трудомісткість і тривалість роботи.

#### *Технологія готування живильних середовищ*

У процесі готування живильного середовища окремі його компоненти розчиняються у воді, утворюючи справжні (мінеральні солі, цукри, спирти) або колоїдні (білки, ліпіди) розчини. Рідкі вуглеводні при внесенні у воду формують особливу фазу, що не змішується.

Кожен конкретний мікробіологічний процес має свої особливості на стадії готування живильних середовищ, і це, у першу чергу, пов'язане із застосуванням у цьому виробництві джерелом вуглецю.

Відділення готування живильного середовища в сучасному мікробіологічному виробництві являє собою, як правило, цех, обладнаний ємкостями для зберігання твердих і рідких речовин, засобами їхнього транспортування й апаратами із пристроями, що перемішують, для готування розчинів, суспензій або емульсій. При цьому поживні солі зберігаються зазвичай у твердому вигляді, а готування їхньої суміші із заданим співвідношенням компонентів виробляється в апаратах з мішалками, куди безпосередньо подаються тверді компоненти в необхідній кількості й далі проводиться їхнє розчинення. Технологічна схема цієї дільниці наведена на рис.3.2.

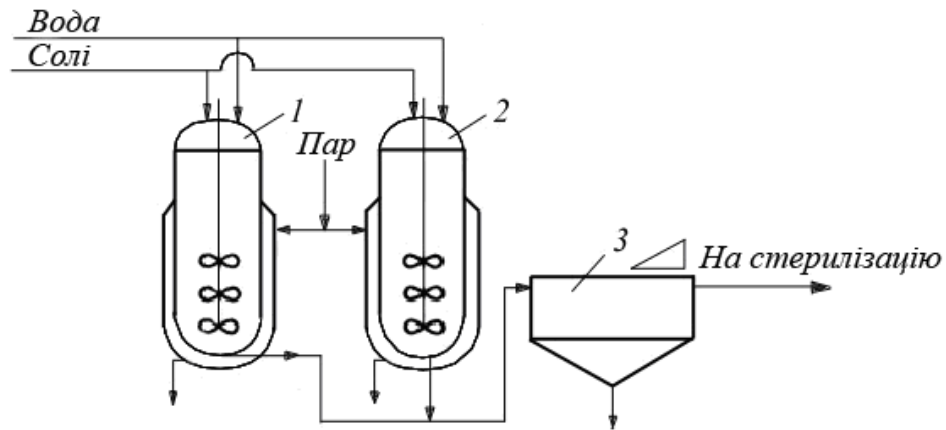


Рисунок 3.2 – Технологічна схема готування розчинів поживних солей і мікроелементів

Необхідні солі зі складу транспортером через дозувальні пристрої (ваги) подаються у заданій кількості в апарати 1 або 2, що працюють по черзі для забезпечення безперервної подачі розчинів солей на стадію ферментації. Апарат попередньо заповнюється водою на 50–60 % (по об'єму), потім включається пристрій, що перемішує, і по черзі подаються необхідні солі, які підбираються таким чином, щоб при їхньому спільному розчиненні не утворювався осад. Для підвищення швидкості розчинення ряду солей у сорочку апаратів 1 й 2 може подаватися пара, що гріє. Процес розчинення триває 20–30 хв, потім розчин надходить у відстійник 3, де видаляються нерозчинні домішки й осад, якщо він утворився при спільному розчиненні солей.

Освітлений розчин після відстійника 3 насосом перекачується в реактор-змішувач для змішування з іншими компонентами живильного середовища.

На рис. 3.3 наведена загальна технологічна схема готування живильного середовища. Розчинні джерела вуглецю (наприклад, цукри) попередньо розчиняють у воді, доводячи розчини до певної концентрації, у невеликих відкритих реакторах з мішалками, а потім подають у закритий реактор-змішувач.

Нерозчинні джерела вуглецю ретельно суспендують у воді в реакторі з мішалкою й переводять суспензію в реактор-змішувач. Сюди ж подають розчин мінеральних солей і мікроелементів.

У реакторі-змішувачі всі підведені в необхідних кількостях компоненти ретельно перемішуються, рН середовища доводиться до необхідного значення подачею аміачної води або кислоти.

Реактори для готування живильного середовища повинні бути обладнані досить потужними мішалками, а також перегородками-відбивачами, що не допускають завихрення й обертання рідини.

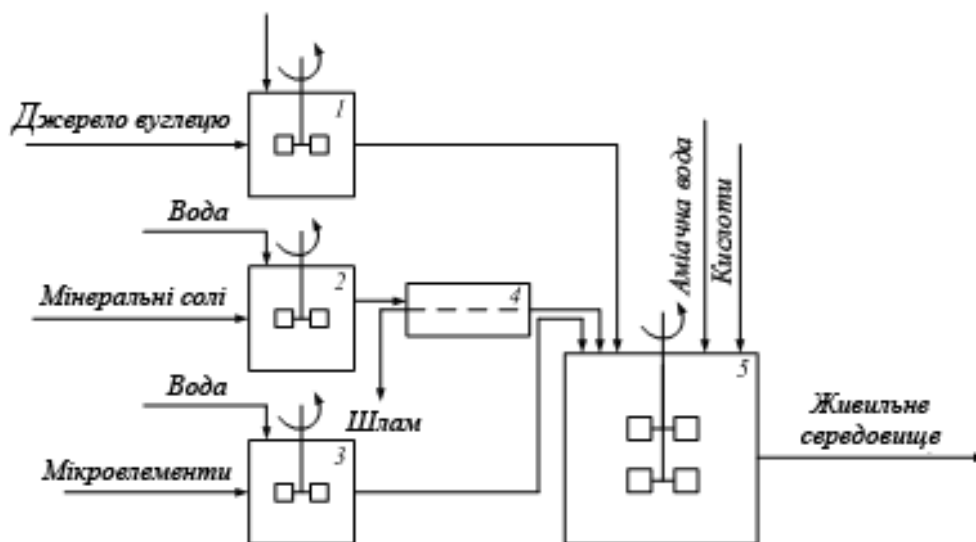


Рисунок 3.3 – Схема готування живильного середовища:

1–3 – реактори; 4 – відстійник; 5 – реактор-змішувач

Найважливішим елементом готування живильних середовищ є дотримання вимог асептики. У різних виробництвах висувають різні вимоги до стерильності середовищ. У багатотоннажних виробництвах, таких, як виробництво етилового спирту, харчових і кормових дріжджів, процес ферментації проводиться при нестрогих вимогах до стерильності. У цьому випадку досить створити певне значення рН середовища, при якому добре розвивається основна культура, а розвиток сторонніх мікроорганізмів пригнічується. Для процесів вирощування чистих культур мікроорганізмів, виробництва ферментів, амінокислот сувора стерілізація всіх потоків, що подаються у біореактор, і самого біореактора є обов'язковою. У цьому випадку для стерилізації газових потоків, у першу чергу повітря, використовують процес фільтрації через спеціальні волокнисті фільтри, виготовлені з поліпропілену, целюлози, мікрОВОлокна й ін. Вони забезпечують практично стовідсоткове очищення й стерилізацію повітря. Основ-

ною вимогою до фільтруючого матеріалу є допустимість його періодичної стерилізації, яка, як правило, здійснюється подачею гострої пари у відключений фільтр через задані проміжки часу.

Метод фільтрації застосовують і для стерилізації термолабільних рідин (сечовини, аміачної води).

Рідинні потоки стерилізують різними методами, з яких практичний інтерес представляють термічний, радіаційний, фільтраційний, хімічний. Найпоширеніший у промисловості метод – термічний – оснований на відомому факті згубної дії високих температур на живі клітини.

У вихідному живильному середовищі завжди перебувають різноманітні мікроорганізми, вегетативні клітини яких швидко гинуть уже при температурі 70 –100 °С і практично миттєво – при температурі вище 110 °С. Для спор бактерій й особливо для представників роду *Bacillus* характерна висока термічна стійкість. Тому при розрахунках апаратів й установок для термічної стерилізації та виборі режимів стерилізації живильних середовищ користуються в основному константами загибелі найбільш термічно стійких спор бактерій *Bacillus stearothermophilus* штаму 1518. У зв'язку із цим розгляд питань термічної стерилізації живильних середовищ або їхніх компонентів звичайно пов'язують із інактивацією спор цього штаму.

Загибель (відмирання, руйнування) мікроорганізмів під впливом тепла можна описати рівнянням

$$\frac{dN}{d\tau} = -kN, \quad (3.1)$$

де  $N$  – кількість життєздатних мікроорганізмів у повному об'ємі рідини, що стерилізується, до моменту часу  $\tau$ ;  $k$  – константа питомої швидкості загибелі спор,  $\text{хв}^{-1}$ .

Після інтегрування наведеного рівняння в межах від  $N_0$  до  $N$  і від 0 до  $\tau$  виходить такий вираз:

$$\ln \frac{N_0}{N} = \int_0^{\tau} k d\tau, \quad (3.2)$$

де  $N_0$  – кількість життєздатних мікроорганізмів у повному об'ємі рідини до стерилізації ( $\tau = 0$ ).

Ліву частину рівняння можна виразити через  $\Delta$

$$\Delta = \ln \frac{N_0}{N}, \quad (3.3)$$

де  $\Delta$  – безрозмірний критерій стерилізації; характеризує втрату життєздатних спор, використовується при оцінці різних режимів стерилізації.

Вплив температури на зміну константи  $k$  може бути виражено рівнянням Арреніуса

$$k = Ae^{-E/RT}$$

тоді вираз (3.2) набуває вигляду

$$\Delta = A \int_0^{\tau} e^{-E/RT} d\tau, \quad (3.4)$$

де  $A$  – константа Арреніуса,  $\text{хв}^{-1}$ ;  $E$  – енергія активації, необхідна для руйнування (загибелі) спор, Дж/моль;  $R$  – універсальна газова постійна, Дж/ (моль  $^{\circ}\text{C}$ );  $T$  – температура стерилізації, К.

При ізотермічних умовах стерилізації

$$\ln \frac{N_0}{N} = k\tau \quad \text{або} \quad \Delta = k\tau. \quad (3.5)$$

Рівняння (3.5) дозволяє розрахувати час витримки середовища  $\tau$  при заданій температурі стерилізації, що забезпечує досягнення заданого ступеня (критерію) стерилізації.

Для розрахунку ефективності режиму стерилізації за рівнянням (3.4) необхідно знати енергію активації загибелі спор й константу Арреніуса.

У табл. 3.1 наведені залежності константи питомої швидкості загибелі, критерію стерилізації спор штаму бактерій *Bacillus stearothermophilus* від температури.

Таблиця 3.1– Значення константи питомої загибелі спор й критерію стерилізації при різних температурах

$t^{\circ},\text{C}$	$k, \text{хв}^{-1}$	$\Delta$	$t^{\circ},\text{C}$	$k, \text{хв}^{-1}$	$\Delta$
105	0,048	0,167	130	14,8	72,38
110	0,163	0,719	132	18,60	107,58
115	0,540	2,400	134	20,50	160,48
120	1,480	7,550	136	48,80	244,48
122	2,440	11,825	138	72,20	377,68
124	3,756	18,665	140	104,8	575,98
126	5,900	29,130	142	148,0	841,98

У мікробіологічній промисловості при більших витратах стерильних живильних середовищ використовуються безперервні способи стерилізації, при яких нагрівання й охолодження середовища протікають протягом декількох секунд.

Основним недоліком термічної стерилізації, незважаючи на її широке практичне використання, є неминуча втрата живильних властивостей середовища, оскільки при температурах, необхідних для стерилізації (порядку 120–150 °С), більшість субстратів, особливо вуглеводи, виявляються термічно нестабільними. Це змушує дуже жорстко контролювати час і температуру термічного впливу на субстрат. Для запобігання розпаду максимальної кількості вуглеводів, вітамінів й інших корисних компонентів стерилізацію рекомендується проводити швидко при високих температурах.

З підвищенням температури стерилізації, відповідно до рівнянь Арреніуса, збільшення константи термічної загибелі спор

$$k = Ae^{-E/RT}$$

значно перевершує ріст констант реакцій розкладання термолабільних компонентів живильного середовища

$$k_1 = A_1e^{-E_1/RT},$$

де  $E$  та  $E_1$  – енергії активації загибелі спор й розкладання термолабільних компонентів відповідно.

Це пов'язане з великою різницею між енергіями активації термічної загибелі спор й реакції розкладання термолабільних компонентів. Так, енергія активації загибелі спор бактерій *Bacillus stearothermophilus* штаму 1518 дорівнює 280 кДж/моль, енергія реакції розкладання глюкози – близько 150 кДж/моль і для багатьох вітамінів – 50–70 кДж/моль. Однак температура стерилізації в промислових апаратах не повинна перевищувати 140 °С, тому що з її збільшенням зростають капітальні витрати на теплообмінну апаратуру, експлуатаційні витрати на пару й охолодну воду.

Існує ряд субстратів, які не вимагають стерилізації, тому що самі мають антисептичну дію: метанол, етанол, оцтова кислота й ін.

У безперервних умовах стерилізації час витримки середовища при обраній температурі

$$\tau = \frac{2,3}{k} \lg \frac{N_0}{N}. \quad (3.6)$$

Знаючи температуру стерилізації, за табл. 3.1 знаходять константу  $k$ . Кількість життєздатних спор  $N_0$  у повному об'ємі живильного середовища до стерилізації

$$N_0 = C_0 V_{\text{ж}} 10^6,$$

де  $C_0$  – кількість спор у 1 мл середовища (визначається експериментально або приймається рівною 1700 – 2000);  $V_{\text{ж}}$  – об'єм рідини, що стерилізується, м<sup>3</sup>.

З формули (3.6) витікає, що зі зменшенням кількості життєздатних спор  $N$  у живильному середовищі, що стерилізується, час витримки зростає. Таким чином, практично нестерильних операцій бути не може, тому що в протилежному випадку час витримки нескінченне. У більшості випадків економічно доцільним є режим стерилізації, при якому з 100 операцій 1-3 нестерильні, тобто виживають 1-3 спори або  $(1-3)/100 = 0,01-0,03$ .

Останнє співвідношення називається *ймовірністю нестерильності* й позначається як  $b$ . Замінивши в рівнянні (3.6)  $N$  на  $b$ , одержимо вираз для визначення часу витримки середовища в ізотермічних умовах

$$\tau = \frac{2,3}{k} \cdot \lg \frac{N_0}{b}. \quad (3.7)$$

З наведених рівнянь видно, що режим стерилізації істотно залежить від вихідної кількості мікроорганізмів. Останнє визначається об'ємністю об'єкта, що стерилізується, (наприклад, живильного середовища), а також його об'ємом.

Користуючись рівнянням (3.7), можна розрахувати час, необхідний для досягнення заданого ступеня (критерію) стерилізації при заданій температурі стерилізації.

*Приклад розрахунку тривалості стерилізації в ізотермічних умовах*

Колба містить 100 мл живильного середовища, засіяного спорами в кількості  $10^6$  на 1 мл. При температурі стерилізації  $140^\circ\text{C}$ , константі питомої загибелі спор  $k = 104,8 \text{ хв}^{-1}$  й  $b = 0,01$  час стерилізації  $\tau$  складе

$$\tau = \frac{2,3}{104,8} \cdot \lg \frac{10^6 \cdot 100}{0,01} = 0,22 \text{ хв}.$$

При стерилізації того ж середовища в апараті корисною місткістю  $100 \text{ м}^3$  час стерилізації складе:

$$\tau = \frac{2,3}{104,8} \cdot \lg \frac{10^6 \cdot 100 \cdot 10^6}{0,01} = 0,35 \text{ хв}.$$

Тобто для забезпечення рівної ефективності середовище в апараті треба витримувати при тій же температурі в 1,6 раза довше, ніж у колбі.

Ця оцінка є наближеною, тому що на практиці необхідно враховувати, що нагрівання середовища до обраної температури стерилізації й наступне охолодження відбувається не миттєво, а за деякий кінцевий проміжок часу, величина якого також впливає на сумарну ефективність процесу стерилізації.

Графік зміни температури об'єкта, що стерилізується, виглядає так (рис. 3.4).

Перша ділянка кривої відповідає нагріванню до заданої температури, друга – витримуванню при цій температурі, третя – охолодженню. При розрахунку ефекту, що стерилізує, розглядають лише ту частину кривої, що відповідає температурі вище 100 °С, тому що при більш низькій температурі питома швидкість загибелі термостійких спор мізерно мала.

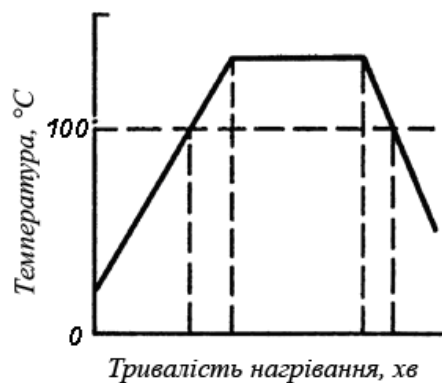


Рисунок 3.4 – Залежність зміни температури об'єкта при стерилізації

Значення критерію стерилізації можна визначити як суму величин, що відповідають кожній ділянці кривої

$$\Delta = \Delta_{\text{н}} + \Delta_{\text{в}} + \Delta_{\text{охл}}, \quad (3.8)$$

де  $\Delta_{\text{н}}$ ,  $\Delta_{\text{в}}$ ,  $\Delta_{\text{охл}}$  – критерії стерилізації на ділянках нагрівання, витримання й охолодження.

Розрахунок  $\Delta_{\text{в}}$  не є важким, він описаний вище у формулі (3.5). Для розрахунку  $\Delta_{\text{н}}$  й  $\Delta_{\text{охл}}$  користуються формулою

$$\Delta_{\text{н(охл)}} = \Delta_{\tau} \frac{\tau_{\text{н(охл)}}}{t_{\text{ст}} - 100} \cdot a, \quad (3.9)$$

де  $\Delta_{\tau}$  – табличне значення критерію стерилізації, що досягається за умови, що об'єкт нагрівається (або охолоджується) зі швидкістю 1 град в

1 хв;  $\tau_{\text{н(охл)}}$  – дійсне значення тривалості нагрівання від 100 °С до  $t_{\text{ст}}$  (або охолодження від  $t_{\text{ст}}$  до 100 °С), хв;  $t_{\text{см}}$  – температура стерилізації, °С;  $a$  – коефіцієнт,  $a = 1$  град/хв.

Значення  $\Delta_{\tau}$ , наведені нижче, отримані при нагріванні (охолодженні) спор *Bac. stearothermophilus* штаму 1518 до заданої температури зі швидкістю 1 град/хв.

Температура, °С	120	122	124	126	128	130	132
$\Delta_{\tau}$	6,8	10,6	16,8	26,2	41,2	65,0	98,3

*Приклад розрахунку сумарного значення критерію стерилізації.*

Визначити сумарне значення критерію стерилізації для такого режиму: тривалість нагрівання від 100 до 123 °С – 10 хв, витримування при 123 °С – 15 хв., охолодження до 100 °С – 20 хв.

Визначимо значення  $\Delta_{\tau} = 13,35$  (середнє між 10,6 й 16,8) і константу  $k = 3,07$ , що відповідає температурі стерилізації 123 °С.

Тоді величини критерію стерилізації для стадії нагрівання  $\Delta_{\text{н}} = 13,35 \cdot 10/23 = 5,8$ , для стадії охолодження  $\Delta_{\text{охл}} = 13,35 \cdot 20/23 = 11,6$  і для стадії витримки  $\Delta_{\text{в}} = 3,07 \cdot 15 = 46,1$ . Сумарне значення  $\Delta$  при цьому режимі

$$\Delta = 5,8 + 11,6 + 46,1 = 63,5.$$

Для гарантованого забезпечення стерильності потрібно, щоб значення  $\Delta$  було не менше заданої величини, а саме  $\Delta \geq 40-45$ . Оскільки розраховане сумарне значення критерію стерилізації (63,5) більше цієї величини, то можна вважати, що заданий режим стерилізації забезпечує гарантоване (з імовірністю 99 %) знищення термостійких спор.

Інші методи стерилізації через різні причини знайшли значно менше поширення. Зокрема, радіаційний метод, оснований на опроміненні матеріалів більшими дозами іонізуючих випромінювань, головним чином  $\gamma$ -випромінюванням, дає гарні результати при стерилізації невеликих об'єктів. Промислове використання  $\gamma$ -випромінювання для стерилізації рідких і газоподібних середовищ, безумовно, можливе, але застосовується рідко через труднощі створення й експлуатації необхідних у цьому ви-

падку потужних джерел  $\gamma$ -квантів; використання ж малопотужних випромінювачів робить процес економічно неефективним.

В окремих випадках застосовують хімічні агенти, що стерилізують, тобто речовини з явно вираженою сильною асептичною дією. Основною проблемою в цьому випадку виявляється необхідність усунення стерилізуючого агента з живильного середовища після загибелі сторонньої мікрофлори й до внесення основної культури. Хімічні антисептики повинні бути не тільки високоефективними, але й такими, що легко розкладаються після завершення стерилізації. На жаль, вибір таких речовин невеликий, і їх не можна вважати легко доступними. До числа кращих з них відноситься пропіолактон, що має сильну бактерицидну дію й легко гідролізується далі в абсолютно нетоксичну молочну кислоту. Хімічна стерилізація живильних середовищ не знайшла промислового застосування, однак у ряді випадків вдало використовується в лабораторних і дослідних умовах.

Не можна віднести до розповсюдженого й метод стерилізуючої фільтрації. Однак це зумовлюється не недоліками самого способу, а тільки труднощами технологічного порядку. Метод оснований на здатності напівпроникних мембран з великими порами (типу мікрофільтраційних мембран) пропускати рідку фазу й затримувати (концентрувати) клітини мікроорганізмів. У принципі метод стерилізуючої фільтрації є ідеальним засобом стерилізації лабільних, у тому числі термічно нестійких рідких і газових середовищ, оскільки він може бути застосований при низькій температурі й вимагає лише градієнта тиску по різні сторони мембрани. У міру створення більш досконалих конструкцій мембранних апаратів з термостійкими мембранами, розрахованими на тривалу експлуатацію, метод стерилізуючої фільтрації буде мати більш широке застосування в промисловій біотехнології, у тому числі в багатотоннажних виробництвах.

### **3.2. Стадія підтримки чистої культури й одержання посівного матеріалу**

Характеристика мікроорганізму-продуцента (продуктивність, швидкість росту) є основою будь-якого процесу промислової мікробіології й

визначає структуру промислового виробництва. Недостатня підтримка чистоти культури може значно знизити технологічні й економічні показники цеху, а в особливо складних випадках повністю виключити можливість подальшої промислової експлуатації штаму.

Таким чином, відділення чистої культури є тою ланкою в промисловому мікробіологічному синтезі, що відповідає за постійне й надійне відтворення корисних властивостей продуцента, знайдених або досягнутих у свій час у ході лабораторних досліджень. Тому таке відділення в будь-якому цеху, де проходить промисловий біосинтез, включає як лабораторні операції з контролю й збереженню чистої культури, так і маломасштабне культивування для постійної передачі штаму на стадію ферментації. У міру необхідності з відділення чистої культури надходить задана маса інокулята, що йде у виробництво, тобто у відділення промислової ферментації.

Функція відділення чистої культури полягає у підтримці властивостей культури й вирощуванні посівних доз послідовно в колбах і бутелях на 10–20 л, що перебувають на качалках або просто розміщені у приміщенні, що термостатується, і далі послідовно у ферментаторах об'ємом (з урахуванням необхідності) 10, 100, 300, 500, 1000, 3000 л.

Характерною рисою мікробіологічного синтезу є наявність постійного взаємозв'язку й залежності між культурою-продуцентом і необхідним для неї живильним середовищем. За інших рівних умов перевага, природно, віддається тому продуценту, що здатний розвиватися й давати продукт на недефіцитних живильних середовищах, не потребує використання рідкісних, дорогих або технологічно незручних субстратів, у тому числі й харчових продуктів.

Після вибору штаму-продуцента у відділенні чистої культури проводиться більша дослідницька робота з оптимізації живильного середовища й умов його вирощування, результати якої включаються в технологічний регламент, що є нормативним документом для працівників промисловості. Однак в умовах виробництва може виникати й зворотне завдання, коли відбуваються сезонні зміни сировини, і підприємство змушене використовувати як компоненти живильні відходи середовищ і побічних продуктів сільського господарства, харчової промисловості й інші речови-

ни, не характерні для цього виробництва. Це ставить завдання додаткової адаптації продуцента до особливостей конкретного середовища й одночасно уточнення складу середовища і її додаткової оптимізації. Можливі, у принципі, й інші випадки, коли необхідно перемінити продуцент і використати інший штам з колекції заводу.

Всі це робить роль мікробіологічної служби заводу й відділення чистої культури в цеху дуже складною й відповідальною. Готування посівного матеріалу, як було відзначено, залежить від виду продуцента, його фізіолого-біохімічних особливостей і складається з декількох послідовних етапів: вихідна культура (у пробірці) → вирощування на агаризованому середовищі (у пробірках) → вирощування в колбах на качалці на рідкому середовищі (одна – дві стадії) → вирощування в посівному апараті - інокуляторі (один або трохи) → нагромадження культури мікроорганізмів у малому ферментаторі посівний матеріал.

На рис. 3.5 показана схема готування посівного матеріалу, застосовувана у виробництві дріжджів на граничних вуглеводнях – *n*-парафінах нафти. Вирощування посівного матеріалу відбувається за такими стадіями: 1 – одержання культури мікроорганізму в мікробіологічній лабораторії заводу; 2 – вирощування посівного матеріалу в малому посівному апараті (місткістю 300 л); 3 – вирощування дріжджів у великому посівному апараті (місткістю 3200 л); 4 – нагромадження культури дріжджів у малому ферментаторі (місткістю 50 м<sup>3</sup>).

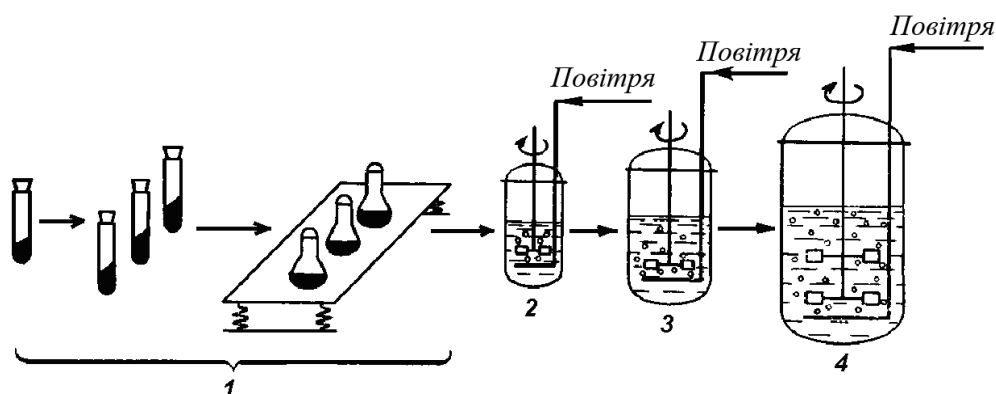


Рисунок 3.5 – Технологічна схема готування посівного матеріалу

Перша стадія вирощування посівного матеріалу здійснюється в заводській лабораторії. Вихідну культуру розмножують на агаризованому середовищі в пробірці у стерильних умовах при оптимальному складі живильного середовища й режимі вирощування (рН, температура, тривалість). Вирощену культуру стерильно змивають водою з поверхні агаризованого середовища в колби місткістю 750 мл, що містять 50–100 мл рідкого живильного середовища. Колби з культурою поміщають на качалку, що перебуває в приміщенні, що термостатується 28–30 °С.

Перемішування культури, що здійснюється струшуванням качалки (120–240 об/хв), інтенсифікує масообмін і збільшує швидкість росту культури. Тривалість вирощування культури в колбах на качалці становить 18–36 год. Цю стадію вирощування необхідно контролювати за морфологічними показниками мікроорганізму. Найкращі результати дає культура, що перебуває в стадії фізіологічної зрілості наприкінці логарифмічної фази росту.

На другій стадії вирощування посівного матеріалу готову культуру з колб стерильно переносять у посівний апарат (інокулятор), у який попередньо вносять парафіни й мінеральні солі в певних кількостях. Посівний апарат оснащений мішалкою, аеруючим пристроєм, а також контрольно-вимірними приладами для регулювання температури, рН, рівня піни й т.д. Об'єм живильного середовища в апараті не повинен перевищувати 60 % загального об'єму. Істотне значення має кількість внесеного в апарат посівного матеріалу, тому що при малій його кількості потрібен більш тривалий період інокуляції. Тому в посівний апарат зазвичай вносять 10–12 % посівного матеріалу від об'єму живильного середовища.

Під час готування посівного матеріалу в апаратах необхідно підтримувати оптимальний режим культивування. Для контролю регулярно відбирають проби й проводять їх мікробіологічний і біохімічний аналіз. Культивування продовжують доти, поки в середовищі не нагромадиться дріжджів 14–20 г/л (розраховуючи на суху масу). Як правило, процес закінчується за 12–14 год.

Третя стадія культивування посівного матеріалу здійснюється в посівному апараті 3,2 об'ємом м<sup>3</sup>. Для цього весь вміст малого інокулятора перекачується в апарат більшого об'єму, у якому знаходиться простери-

лізоване живильне середовище. Коефіцієнт переходу від одного апарата до іншого залежить від конкретних умов вирощування кожної культури мікроорганізмів. Якщо цей перехід здійснюється у фазі експонентного росту, то коефіцієнт переходу стосовно об'єму наступного апарата дорівнює 10. Процес вирощування триває 12–14 год.

Четверта стадія процесу здійснюється в апараті об'ємом 50 м<sup>3</sup>. Перед прийомом дріжджової суспензії з попередньої стадії в апараті готують живильне середовище шляхом подачі парафіну, розчинів поживних солей і мікроелементів. Середовище доводять до оптимальних значень рН і температури, перекачують засівні дріжджі з попередньої стадії й починають процес вирощування при безперервній аерації й перемішуванні. Процес нагромадження дріжджів триває 10–12 год. Коли концентрація абсолютно сухих дріжджів (АСД) у середовищі складе 14–17 г/л, дріжджову суспензію можна подавати у виробничі ферментатори. Отриманий посівний матеріал піддають ретельному мікробіологічному й біохімічному контролю, тому що від його активності й чистоти залежить подальший виробничий цикл.

### 3.3. Стадія ферментації

#### 3.3.1. Особливості процесів тепломасопереносу в біореакторах

Стадія ферментації є центральною в промисловому мікробіологічному виробництві. Під ферментацією розуміють всю сукупність послідовних операцій від внесення інокулята в заздалегідь приготовлене й термостатоване середовище й до завершення процесів росту, біосинтезу внаслідок вичерпання поживних елементів середовища.

Біотехнологічні процеси принципово не відрізняються від процесів хімічного синтезу. Для них характерні такі етапи, як завантаження субстратів для реакцій синтезу, перетворення субстратів, відділення й очищення цільового продукту. Процеси обох типів можуть бути періодичними й безперервними. Існують і загальні принципи створення апаратури: це в першу чергу, *принцип масштабування* – поетапного збільшення об'єм апаратів і *принцип однорідності* фізико-хімічних умов – темпера-

тури, рН, концентрації розчинених речовин, включаючи кисень й інші гази – у повному об'ємі апарата. З огляду на подібність хімічних і біохімічних процесів, спочатку робилися спроби використати хімічні реактори для реалізації процесів мікробіологічного синтезу.

Це однак породжувало серйозні проблеми. Специфіка біотехнологічних процесів полягає в тому, що в них беруть участь живі клітини. Це впливає на процеси *масопередачі* – обміну речовин між різними фазами (наприклад, перенос кисню з газової фази в рідку) і *теплообміну* – перерозподілу теплової енергії між взаємодіючими фазами, – а також накладає додаткові обмеження на системи перемішування й системи теплообміну біореакторів.

Система перемішування служить для забезпечення однорідності умов в апараті, ефективної масопередачі між водною фазою в біореакторі й пухирцями газу, між культуральною рідиною й клітинами, що культивуються, а також між різними шарами рідини.

Розрахунок системи перемішування вимагає ясного розуміння особливих властивостей середовища в біореакторі. Клітини, часто з'єднані в довгі ланцюжки, і особливо гіфи грибів значно збільшують в'язкість середовища. Крім цього, рідина, що містить нитковидні утворення, як би набуває якостей твердої арматури. Зусилля нижче певної (граничної) величини, прикладені к такій рідині (наприклад, тиск лопаток мішалки), не викликають її перемішування. Подібні властивості не характерні для рідких середовищ, що не містять біооб'єкта, тому в біотехнології пред'являються особливі вимоги до системи перемішування, зокрема, доводиться різко підвищувати потужність мішалки.

Підвищення потужності й відповідно прискорення обертання мішалки створюють іншу проблему. Значні зусилля, прикладені до рідини, можуть викликати пригнічення росту біооб'єкта, зниження ефективності синтезу цільового продукту, ушкодження й загибель клітин.

Істотні розходження між біотехнологічними й хіміко-технологічними процесами стосуються масопередачі між газовою й рідкою фазами в реакторі. Багато які біотехнологічні процеси відносяться до *аеробних* – вони потребують для свого здійснення аерації, тобто постачання киснем. Для аерації культурального середовища використовують звичайне повіт-

ря або повітря, збагачене киснем. У ході метаболічних процесів виділяються газоподібні продукти, у першу чергу  $\text{CO}_2$ , які підлягають видаленню. Процеси, що протікають без доступу кисню (анаеробні), вимагають відводу газоподібних продуктів життєдіяльності.

Постачання культурального середовища киснем здійснюється за допомогою спеціальних установок – аераторів, які повинні функціонувати ефективно, надійно й у той же час економічно. Кисень погано розчинний у воді: його рівноважна концентрація в живильних середовищах при 26–30 °С близька до 0,21 моль/м<sup>3</sup> (0,0007 %). У той же час кисень відноситься до числа субстратів, що витрачаються швидко, і тому його запас у рідині без підживлення вичерпується за кілька секунд. Для того, щоб забезпечити клітини мікроорганізмів киснем, необхідно інтенсифікувати процес переходу кисню з повітря в живильне середовище, а потім із середовища – у клітку. Механізм такого переходу досить складний і має різні теоретичні пояснення.

Найбільш розробленою є теорія стаціонарної газової плівки. Відповідно до цієї теорії, перенос кисню з газової фази в клітку мікроорганізму являє собою складний фізико-хімічний процес, у якому можна виділити кілька фазових переходів. На рис. 3.6. показана спрощена схема цього процесу.

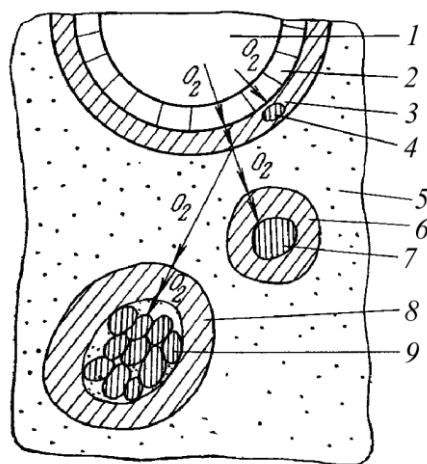


Рисунок 3.6 – Схема переносу кисню з пухирця повітря до поверхні мікробних клітин й агломератів клітин:

1– пухирець повітря; 2– газова плівка; 3, 6, 8 – рідкі плівки; 4, 7 – мікробна клітина; 5 – культуральна рідина; 9 – агломерат мікробних клітин

Перший перехід – фазовий – це перенос кисню з газової фази в рідку, тобто абсорбція газоподібного кисню живильним середовищем. Швидкість процесу на цій стадії залежить від опору прикордонних газової (2) і рідкої (3) плівок, а також від площі поверхні контакту фаз і градієнта концентрацій кисню в газовій і рідкій фазах.

На другому переході – розчиненого кисню з рідини в клітину – необхідно перебороти опір гідратної дифузійної плівки, що утвориться на зовнішній поверхні клітини (6), і агломерату клітин (8). Ця плівка має більшу в'язкість і чинить опір дифузії поживних речовин і кисню в клітину.

При перемішуванні аеробного ферментаційного середовища, усуваються всі фактори, що негативно впливають на швидкість переносу кисню з повітря до клітини: збільшується площа поверхні контакту фаз газ–рідина, зростає градієнт концентрацій кисню між газовою й рідкою фазами, зменшується опір дифузійних газової й рідкої плівок.

Аерація й перемішування одночасне із забезпеченням зростаючої культури киснем сприяють видаленню із середовища газоподібних метаболітів, що утворилися.

Все це зумовлює необхідність злагодженої роботи систем аерації й перемішування в біореакторах.

### ***3.3.2. Системи перемішування й аерації біореакторів***

За способом перемішування й аерації біореактори підрозділяються на апарати з механічним, пневматичним і циркуляційним перемішуванням.

*Апарати з механічним перемішуванням.* Ці апарати (рис. 3.7) мають механічну мішалку, що складається із центрального вала й лопаток (як правило, 6, рідше 8) різної форми (прямих або вигнутих).

Ефективне перемішування рідини в більших об'ємах забезпечується тільки в тому випадку, якщо мішалки багатоярусні, лопатки розташовані в кілька поверхів. При високій кількості оборотів мішалки утвориться центральний коловорот рідини, що перемішується.

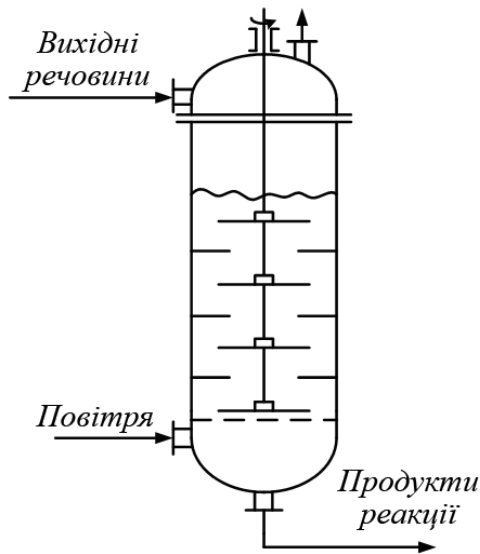


Рисунок. 3.7 – Апарат з механічним перемішуванням

Середовище починає обертатися з тією ж швидкістю, що й мішалка, і недостатньо перемішується. Щоб цього уникнути, установлюють відбивні перегородки – вузькі металеві пластини, прикріплені до внутрішніх стінок реактора. Ці перегородки запобігають виникненню коловороту навколо обертової мішалки, переводячи круговий рух рідини у вихровий, рівномірно розподілене по всьому об'ємі. Іноді відбивні перегородки не застосовні, оскільки вони обростають мікроорганізмами, зокрема міцеліальними грибами, що різко погіршує умови аерації й перемішування в апараті. Для вирощування грибів використовують мішалки із плоскими лопатками, що не розривають міцелій.

Аерація може здійснюватися шляхом барботажу – подачі повітря знизу через барботер – горизонтальну трубку з отворами.

У деяких апаратах використовується порожня мішалка (рис. 3.8).

Повітря надходить у середовище культивування через нижній кінець її вала. Обертання мішалки сприяє диспергуванню повітря в рідині. Добрий газорідинний контакт у такому біореакторі забезпечується також спіральною траєкторією пухирців газу. В апаратах з порожньою мішалкою часто безпосередньо над лопатами аеруючої мішалки встановлюють дифузор – відкритий знизу й зверху циліндр, що ділить об'єм біореактора на два відсіки – внутрішній і зовнішній відносно стінок дифузора. Дифузор підсилює розрідження, створюване при обертанні мішалки у верхній

частині апарата, де поверхня рідини набуває вигляду глибоко ввігнутого меніска й тим самим сприяє додатковому підсмоктуванню повітря зверху (самоусмоктувальний ефект мішалки) і циркуляції рідини у вертикальній площині апарата.

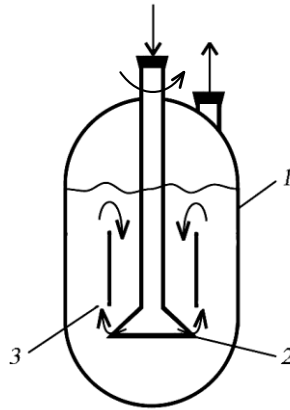


Рисунок 3.8 – Апарат з порожньою мішалкою  
1 – корпус, 2 – порожня мішалка, 3 – дифузор

Апарати подібного типу широко застосовуються у виробництві кормових дріжджів, спирту й в інших виробництвах з використанням дріжджів. Дифузор може встановлюватися також в апаратах зі звичайною (не порожнистою) мішалкою й барботажною аерацією. У цьому випадку дифузор також сприяє аерації й перемішуванню, дозволяючи обмежитися одним ярусом лопаток мішалки.

Апарати з механічним перемішуванням – найпоширеніша конструкція в сучасній мікробіологічній промисловості.

*Апарати із пневматичним перемішуванням.* В апаратах пневматичного типу мішалка відсутня, перемішування рідини здійснюється пухирцями газу. Найпростіший апарат подібного типу - барботажна камера, у якій розпилене барботером повітря, піднімаючись знизу нагору, перемішує культуральне середовище.

Швидкість масопередачі між газом і рідиною в такому апараті набагато нижче, ніж в апаратах з механічним перемішуванням. Для подолання цього недоліку вводяться модифікації. Класичний, так званий ерліфтний (*air lift* – підйом повітря) апарат доповнений дифузором, нижній обріз якого перебуває безпосередньо над барботером (рис. 3.9).

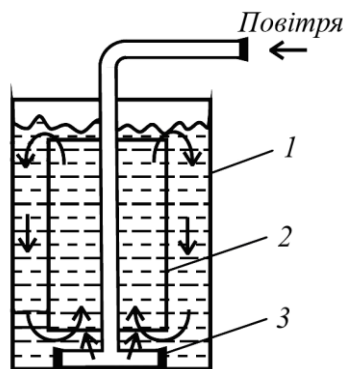


Рисунок 3.9 – Ерліфтний біореактор:  
1 – корпус, 2 – дифузор, 3 – барботер

Стовп рідини усередині дифузора «розштовхується» пухирцями повітря, щільність її зменшується, а об'єм збільшується. Рідина переливається через верхній край дифузора вниз, що приводить до перемішування й аерації об'єму реактора поза дифузором.

На пневматичному перемішуванні зосновані багатоколонні біореактори, розділені горизонтальними перегородками на поверхи. Металеві горизонтальні перегородки мають вузькі отвори. Основне призначення перегородок – інтенсифікація аерації й перемішування. Перегородки з отворами дозволяють також боротися з укрупненням газових пухирців у міру їхнього просування нагору, тому вони мають особливе значення для апаратів великої висоти. Таким шляхом зменшується також загроза надлишкового піноутворення в реакторі.

*Апарати із циркуляційним перемішуванням.* Біореактори циркуляційного (гідродинамічного) типу містять пристрої (насоси, ежектори), що створюють спрямований струм рідини по замкнутому контуру. Рідина захоплює за собою пухирці газу. Насос для циркуляції культуральної рідини може розміщуватися поряд з барботером (поєднання пневматичного й циркуляційного перемішування). В апаратах типу «падаючого струменя» (рис. 3.10) культуральна рідина по трубі, що з'єднує дно реактора з його верхньою частиною, подається за допомогою насоса 1 у сопла на кришці апарата. Пухирці повітря захоплюються рідиною, що струмує зверху вниз у порожнині біореактора.

Апарати циркуляційного типу часто заповнюють твердими частинами (насадкою). Такі частини поліпшують перемішування в біореакторі,

при тривалому безперервному культивуванні перешкоджають обростанню його стінок, а також сприяють диспергуванню повітря в рідині. Клітини ростуть у вигляді плівки на поверхні твердих частинок піску, шматків обпаленої глини, гранул полімерних матеріалів. Прикріплення до твердої поверхні стимулює розвиток багатьох організмів, зокрема грибів.

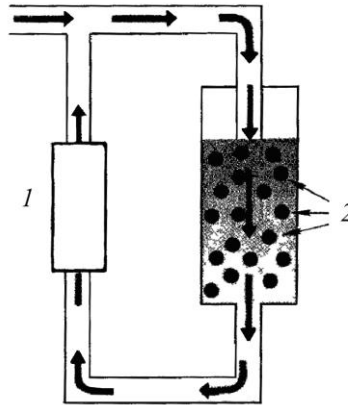


Рисунок 3.10 – Циркуляційний біореактор із твердою насадкою:  
1 – насос, 2 – частки твердої насадки

При одержанні мікробної маси на основі сільськогосподарських відходів використовують насадку із пружних полімерних часток, що рихло заповнюють порожнину апарата. Частки містять пори й порожнини. Після закінчення біотехнологічного процесу частки «вичавлюють», при цьому збирають видавлену біомасу, а частки знову завантажують у біореактор.

Таким чином, за способами перемішування й аерації розрізняють біореактори трьох основних типів, кожний з яких допускає різноманітні варіанти. Незважаючи на те, що певна перевага віддається новітнім конструкціям апаратів – соплоконусним, колонним, із твердою насадкою – широке застосування знаходять і традиційні варіанти, включаючи апарат зі звичайною механічною мішалкою й барботером.

Дотепер не існує стандартних інструкцій на застосування біореакторів, придатних для будь-якого біотехнологічного процесу, хоча існує велика кількість емпіричних спостережень.

Загальні теоретичні положення про відповідність між типами процесів й апаратів перебувають у стадії розробки.

### 3.3.3. Системи теплообміну біореакторів

Теплообмін являє собою також важливу складову частину процесів, що протікають у біореакторі, оскільки життєдіяльність і метаболічна активність біооб'єкта в істотній мірі залежать від температури. Більшість освоєних біотехнологічних процесів протікає при температурах 30–50 °С (мезофільні умови). Це має свої переваги, оскільки для підтримки оптимальної температури лише у рідко яких випадках доводиться вдаватися до спеціального підігріву. Серйозною проблемою, однак, є видалення надлишкової теплоти, виділеної в процесі життєдіяльності клітин, що культивуються, тому біореактор повинен мати систему теплообміну.

Розрахунок й оптимізація системи теплообміну ускладнюються наявністю в біореакторі великої кількості контактуючих поверхонь. Теплообмін відбувається між клітиною й живильним середовищем, між середовищем і стінкою апарата, між стінкою й охолодною (гріючою) рідиною теплообмінного пристрою, між цією рідиною, стінкою теплообмінника й зовнішнім середовищем. Система теплообміну повинна чуйно реагувати на зміни кількості тепла, що відбуваються в ході культивування біооб'єкта, підтримувати температуру на постійному рівні (режим термостатування) або контролювати її зміни за заданою програмою. Наприклад, на перших етапах росту культури біореактор прогривають, а далі постає завдання відводу надлишкової теплоти, виділеної в процесах життєдіяльності.

Теплообмін описується рівнянням, що зв'язує теплоту  $Q$ , передану в одиницю часу від однієї фази до іншої (у розглянутому випадку – між внутрішнім об'ємом реактора й навколишнім середовищем або між цим об'ємом і системою теплообміну), із площею поверхні теплообміну  $F$  і міжфазною різницею температур  $\Delta T$

$$Q=KF\Delta T.$$

*Коефіцієнт теплопередачі  $K$*  відповідає кількості теплоти, що передається в одиницю часу через одиничну поверхню при різниці температур в 1 °С.

З рівняння слідує, що підвищити швидкість передачі теплоти між внутрішнім об'ємом і системою теплообміну, збільшити ефективність

роботи цієї системи можна шляхом: 1) підвищення коефіцієнта теплопередачі; 2) збільшення поверхні теплообміну; 3) збільшення різниці температур. Перші два шляхи пов'язані з інженерно-конструкторськими розробками. Корозія стінок біореактора або їхнє забруднення знижують коефіцієнт теплопередачі. Звідси випливає необхідність виготовлення апарата з несхильних до корозії матеріалів і підтримки його у чистоті. Що стосується різниці температур між реактором і теплообмінними пристроями, то важливий шлях її підвищення полягає у використанні термофільних мікроорганізмів й їхніх ферментів, використанні як охолодний агент води з низькою температурою (артезіанську або пропущену через холодильну установку). Для більш глибокого охолодження використовують етиленгліколь, фреони. Гріючим агентом служить гаряча вода або пара.

#### *Технічні способи передачі тепла в біореакторах*

Розрізняють два основні методи охолодження (нагрівання) середовища в реакторі – прямий і непрямий.

*Прямий* метод використовують для нагрівання рідини шляхом впуску гострої пари безпосередньо у середовище, що нагрівається. Пара конденсується, віддаючи тепло, а конденсат змішується з живильним середовищем. Як правило, пара вводиться через барботер у вигляді спіралі, розташованої на дні реактора. Одночасно відбувається перемішування рідини.

#### *Переваги методу:*

- високий коефіцієнт тепловіддачі теплоносія (пари) –  $5000 - 18000 \text{ Вт/м}^2 \text{ } ^\circ\text{C}$ ;
- рівномірність прогріву рідини, тому що конденсація пари відбувається при постійній температурі.

#### *Недоліки методу:*

- тепловий удар по мікроорганізмах у зоні введення пари, що може спричинити їхню загибель;
- розпад термолабільних компонентів живильного середовища;
- розведення середовища за рахунок конденсату, а отже, зниження концентрації поживних речовин.

Спосіб має обмежене застосування, головним чином, для очищення стічних вод, коли потрібне знезаражування стоків, тобто інактивація патогенної мікрофлори під впливом високих температур.

При *непрямому методі* теплообміну передача тепла від одного теплоносія до іншого здійснюється через непроникну перегородку.

Поверхня, що передає тепло, може мати різні геометричні форми (змійовик, сорочка, трубка) і розташовуватися як ззовні, так й усередині апарата. Типи теплообмінних пристроїв представлені на рис. 3.10.

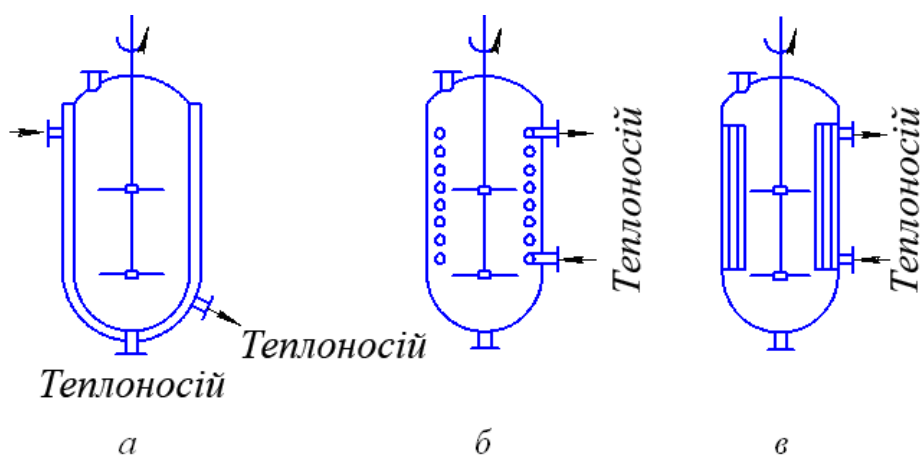


Рисунок 3.10 – Типи теплообмінних пристроїв у біореакторах:  
а – сорочка; б – змійовик; в – трубчатка

У біотехнології поширений *зовнішній* спосіб обігріву або охолодження через сорочку – металевий кожух, заповнений теплоносієм. Основною перевагою цього типу теплообмінного пристрою є звільнення внутрішнього простору апарата від конструктивних елементів, що значно полегшує експлуатацію реактора й сприяє його надійній герметизації.

Для інтенсифікації процесу теплообміну використовують секціоновану сорочку зі спіральною перегородкою, а також тангенціальне введення теплоносія. Однак застосування пристроїв зовнішнього теплообміну обмежено розмірами апарата. Доцільно застосовувати сорочки в реакторах з робочим об'ємом не більше  $1 \text{ м}^3$ , тому що при більшому об'ємі знижується питома поверхня теплообміну й збільшується металомісткість конструкції через необхідність збільшувати розміри теплообмінної поверхні, товщину стінок апарата.

Як внутрішні теплообмінні пристрої у реакторах найчастіше застосовують змійовики. В апаратах об'ємом менше 5 м<sup>3</sup> використовують один змійовик, розташований у центральній частині, в апаратах великого об'єму – кілька змійовиків, розташованих по периферії. Другим типом внутрішнього теплообмінного пристрою є вертикальні трубчасті перегородки, розміщені радіально поблизу стінок апарата.

У порівнянні зі змійовиками вони мають більше зварних з'єднань, тому більше трудомісткі й складні у виготовленні, недостатньо надійні в експлуатації, тому використовуються рідше.

Конструкції внутрішніх теплообмінних пристроїв повинні забезпечувати доступність і простоту для огляду, чищення й стерилізації біохімічного реактора, а також запобігання вібрації при перемішуванні шляхом твердого кріплення до корпусу апарата. Слід зазначити, що розташування теплообмінних пристроїв, особливо декількох, усередині реактора погіршує умови перемішування й теплообміну в його реакційному об'ємі. Крім того, наявність патрубків для введення й виведення теплоносія зі змійовика, які можуть розташовуватися на кришці, днищі або стінках корпусу апарата, знижує надійність герметичності апарата.

Технологічні вимоги до швидкості тепловідводу дуже жорсткі через вузький температурний оптимум росту культури, що укладається, як правило, в інтервал 2–3 °С. Охолодження реактора оборотною водою через змійовики, сорочки й інші пристрої ускладнюється в мікробіологічній промисловості дуже малою різницею температур між вмістом біореактора (32–34 °С для більшості мезофільних процесів) і охолодною водою, що надходить у теплообмінні пристрої із градирні з температурою більше 20 °С, а в жарку пору року – ще вище. Це змушує створювати у біореакторі розвинену поверхню теплообміну, постійно боротися зі шламоутворенням й обростанням поверхні теплообмінних пристроїв, а також збільшувати швидкості руху рідин в обох поверхнях теплообмінника за рахунок великого об'єму охолодної води, що прокачується усередині труб або сорочок, й інтенсивної циркуляції рідини, що перебуває в біореакторі.

### 3.4. Стадія виділення й очищення цільових продуктів біосинтезу

Продукти мікробіологічного синтезу, будь це клітини або метаболіти, надходять із біореактора у вигляді водних суспензій або розчинів, що мають низьку концентрацію основного компонента. Наприклад, вміст біомаси клітин у виробництві дріжджів становить 5–10 %, у виробництві бактеріальних препаратів – не більше 1–2 %. Застосовуваний у кожному конкретному біопроекті метод виділення продукту визначається його фізико-хімічними властивостями (молекулярною масою, розчинністю), масштабом виробництва й вартістю продукту; залежить він також від початкових властивостей культуральної рідини (в'язкості, кількості домішок і т.д.), від необхідної чистоти й кінцевої форми продукту (концентрований розчин, порошок, кристалічна речовина).

У більшості промислових мікробіологічних виробництв як перший етап переробки культуральної рідини роблять відділення біомаси продуцента від рідкої фази, що далі також піддається переробці, якщо вона містить метаболіти, що представляють практичну цінність.

У тих виробництвах, де цільовим продуктом є біомаса клітин, культуральна рідина (безклітинна) не переробляється, а лише піддається очищенню, що дозволяє повторно використати водну фазу й знизити утворення стічних вод.

Способи відділення клітин від середовища в значній мірі залежать від природи продуцента й визначаються кінцевою метою виробництва. Розрізняють *механічні* (відстоювання, фільтрування, центрифугування) і *теплотехнічні* (випарювання, сушіння) способи виділення клітинної маси з культуральної рідини. Залежно від кінцевої мети вибирають різні поєднання цих способів. При виборі схеми концентрування й отримання цільового продукту проводять економічну оцінку технології з урахуванням товарної форми біопрепаратів, концентрації мікроорганізмів у культуральній рідині й ін.

Приміром, у виробництві хлібопекарських дріжджів інтерес представляють лише самі клітини, тому на стадії виділення ставиться завдання можливо більш повного відділення клітин від рідкої фази. Після закін-

чення вирощування дріжджових клітин їх необхідно якнайшвидше виділити з культурального середовища, тому що тривале перебування дріжджів у бражці погіршує їхню ферментативну активність.

Для одержання брикетованих дріжджів застосовують механічні способи виділення клітин. Культуральну рідину спочатку піддають 2–3 східчастій сепарації, розділяючи на рідину, практично позбавлену дріжджів (бражку), і дріжджове молоко з концентрацією дріжджових клітин (300–700) г/л. Із дріжджового молока клітини дріжджів виділяють фільтруванням на барабанних вакуум-фільтрах й одержують пастоподібну масу вологістю  $\approx 75$  %. Надалі масу, зняту з фільтра, піддають пресуванню й одержують продукт із високим вмістом живих клітин, що мають добру хлібопекарську активність («піднімальну силу»).

Однак строк зберігання пресованих дріжджів – не більше 12 діб, у той час як сухі дріжджі можуть зберігатися протягом 5 місяців.

Для одержання харчових дріжджів у сухому вигляді застосовують один з теплотехнічних методів концентрування продукту – сушіння. У процесі сушіння вологість дріжджів знижується до 8–10 %. Основна вимога до технології зневоднювання дріжджів – це збереження їхньої життєздатності. Оскільки дріжджі, як і всі мікроорганізми, термолабільні, то сушіння потрібно проводити в м'якому режимі, тобто при невисокій температурі й невеликій тривалості.

Використовують кілька способів сушіння: у малорухомому шарі, у зваженому стані, розпиленням, в умовах залишкового тиску. В усіх випадках сушіння здійснюють нагрітим повітрям. Однак температура теплоносія різна й залежить від конструкції сушарки: у вакуумній сушарці 60 °С, у камерній і стрічковій сушарках 45–48 °С, у розпилюючій 140 °С.

Особливо складні проблеми вирішуються технологами при виділенні й очищенні цільових метаболітів: амінокислот, ферментів, вітамінів. У таких випадках часто доводиться використовувати дуже складний і, як правило, не типовий, а конкретний (для такого продукту) набір стадій, що дозволяють виділити речовину достатнього ступеня чистоти. Біомасу клітин попередньо виділяють із культуральної рідини осадженням, додаючи вапно або інші тверді компоненти, осадом яких захоплюються клітини. Утворений осад відокремлюють фільтруванням або центрифугуванням.

Переробка отриманої безклітинної культуральної рідини включає такі стадії:

- *первинне виділення продукту* яким-небудь із методів: екстракцією розчинниками (найчастіше спиртом), осадженням хімічними реактивами або застосуванням мембранної технології, насамперед процесів мікрофільтрації й ультрафільтрації через полімерні мембрани зі спеціально підібраним розміром пор (наприклад, мембрана з діаметром пор 5–45 нм повністю відокремлює від культуральної рідини білкові молекули). Цим методом вдається повністю видалити клітини з культуральних рідин, концентруючи їх й одержуючи фільтрат, що становить 90 % і більше (за об'ємом) від вихідної рідини й абсолютно не забруднений клітинами.

Після первинного виділення продукту його концентрація зростає в  $\approx 10$  разів у порівнянні з вихідною рідиною.

- *подальше концентрування продукту й очищення від домішок*. Тут можуть використовуватися фракційне осадження, адсорбція, хроматографія.

Поділ речовин шляхом хроматографії пов'язаний з їхнім неоднаковим розподілом між двома фазами, що не змішуються. Розрізняють хроматографію на папері, пластинках, колонках. При хроматографії на папері або на пластинках однією з фаз, що не змішуються, служить рухливий розчинник, наприклад, бутанол, а іншою, нерухомою фазою – волокна паперу або частки силікагелю або іншого матеріалу, які покривають пластинку. При колоночній хроматографії рухлива фаза – поточний через колонку розчинник, нерухома – адсорбент, що заповнює колонку, найчастіше гранульований гель. Поділювана суміш вводиться у контакт із рухливою й нерухомою фазами. У промислових умовах застосовується колоночна хроматографія.

Концентрація продукту на цьому етапі зростає до 80 %.

- *остаточне очищення продукту*. Після цієї операції продукт готовий до відправлення споживачеві. Використовують відгін органічного розчинника й наступне висушування продукту. Здійснюють сушіння розпиленням або в барабані. Концентрація продукту досягає 90–100 %.

### 3.5. Одержання товарних форм продуктів мікробного синтезу

Останньою стадією технологічного циклу в мікробіологічному синтезі є одержання товарної форми продукту. Залежно від кінцевого вигляду цільового продукту його товарна форма може являти собою або біомасу клітин, або досить високоочищений препарат, що відповідає ряду спеціальних вимог, наприклад асептики.

У виробництві пресованих хлібопекарських дріжджів товарний продукт одержують шляхом формування пастоподібної дріжджової маси у вигляді прямокутних брусків масою 1000, 500, 100, 50 грамів. Брикети загортають у спеціальний папір. Формування й фасування пресованих дріжджів здійснюють в автоматичних лініях, що складаються з формувальної машини й фасувально-пакувального автомата для різання й упакування дріжджів. Упаковані бруски укладають у дерев'яні чисті, сухі ящики й відправляють на зберігання в холодильні камери, де підтримується температура 1–4 °С й вологість повітря не менше 82 %. Низька температура сприяє вповільненню процесів життєдіяльності в дріжджових клітинах і кращій схоронності продукту.

Труднощі поділу багатоконпонентних розведених розчинів і суспензій, що є первинним продуктом промислової біотехнології, у ряді випадків змушують відмовитися від виділення основного компонента. Це стосується, зокрема, виробництва амінокислоти – лізину. На жаль, технологія одержання кристалічної форми лізину в зручному для зберігання (негіроскопічному) вигляді вимагає подальшого вдосконалювання, що виправдовує випуск концентратів з невисоким вмістом основної амінокислоти.

Промисловість випускає рідкий концентрат лізину й так званий кормовий концентрат лізину (РКЛ і ККЛ відповідно). У першому випадку продуктом є просто упарена безклітинна культуральна рідина, у якій концентрація сухих речовин у рідкій фазі підвищується від 4–6 % до 40 %, а в другому – після випарювання до рідкої фази додають який-небудь кормовий наповнювач, наприклад, висівки, і отриману пасту сушать на стрічкових сушарках. На відміну від нетранспортабельного РКЛ,

що швидко псується, сухий концентрат зберігається більше тривалий час і зручний у застосуванні, однак низький вміст лізину (15–20 %) робить його не вигідним при перевезеннях на великі відстані. Зрозуміло, що хоча обидва види концентратів містять додаткову, крім лізину, кількість корисних компонентів культуральної рідини, що перейшли в продукт при розпарюванні й сушінні, набагато ефективніше одержувати кристалічний лізин з високим (> 95 %) вмістом основної речовини, а суміш інших компонентів культуральної рідини, що мають високу фізіологічну активність, випускати окремо як додатковий продукт.

Стадія фасування розглянутих комплексних препаратів – БВК, ККЛ, ферментів технічного призначення – полягає в поміщенні їх у тару (мішки, барабани й т.ін.), розміри й тип якої визначаються потребами замовника й властивостями продукту (його злежуваністю, гігроскопічністю, стійкістю до загнивання й т.д.). Для цілого ряду біопрепаратів це питання вирішується значно складніше, оскільки біохімічні продукти харчового й особливо медичного призначення (наприклад, вітаміни) повинні мати заданий ступінь чистоти й дуже часто абсолютну стерильність. Крім звичайних прийомів, спрямованих на підвищення вмісту основної речовини до значення, обумовленого вимогою державних стандартів, при фасуванні й закупорюванні таких продуктів доводиться використовувати спеціальну технологію, що дозволяє стерилізувати речовини й підготувати для них тару та робити її наповнення й закупорку в асептичних умовах. Останнє, як правило, досягається застосуванням спеціальних автоматизованих ліній фасовки й ретельним хімічним і мікробіологічним контролем виробництва.

### **3.6. Поняття про іммобілізацію ферментів і клітин мікроорганізмів**

Широкі перспективи для промислової реалізації біотехнологічних процесів відкрилися в результаті створення нового типу біокаталізаторів, так званих іммобілізованих ферментів.

Довгий час використання ферментів у різних областях практичної діяльності людини: у харчовій, фармацевтичній, текстильній, шкіряній й

іншій галузях промисловості, у медицині, сільському господарстві – стримувалося з ряду причин. По-перше, вони нестійкі при зберіганні, а також при різних впливах, особливо теплових. По-друге, багаторазове використання ферментів утруднене через складність їхнього відділення від реагентів і продуктів реакції; з цієї же причини продукт, забруднений ферментом, не може відповідати пропонованим вимогам за чистотою.

Початок цілеспрямованих досліджень, орієнтованих на створення стабілізованих ферментних каталізаторів, відноситься до середини минулого сторіччя. Слід зазначити, що в природі: ґрунтах, гірських породах, на поверхні рослин – мікроорганізми існують в основному в закріпленому стані. Перші спроби застосувати іммобілізовані мікроорганізми були зроблені ще 150 років тому в Німеччині, коли закріплені на буковій стружці бактерії використали для виробництва оцту. Було замічено, що іммобілізовані клітини здобувають високу стабільність і можуть використовуватися в процесі біосинтезу протягом декількох місяців і навіть років.

Особливу увагу фахівців іммобілізовані клітини привернули наприкінці 60-х – початку 70-х років ХХ сторіччя, коли вони стали успішно застосовуватися не тільки для виробництва препаратів, але й для проведення нескладних біохімічних аналізів. У 1971 р. на першій конференції з інженерної ензимології (США) був узаконений термін «іммобілізовані ферменти».

*Іммобілізація ферменту* – це обмеження його рухливості таким чином, щоб активний центр його молекули не піддавався структурним змінам і зберігав свою конфігурацію, а отже, і працездатність (каталітичну активність) протягом тривалого часу.

При іммобілізації ферменти з розряду гомогенних каталізаторів ( що перебувають у тій же фазі, що й субстрати реакції) переходять у розряд гетерогенних (утворюючи особливу фазу, відділену від реагентів). Фермент і реагенти можуть бути розділені, що дозволяє: а) у потрібний момент зупинити реакцію; б) регенерувати фермент після закінчення реакції й використати його для нового циклу біотехнологічного процесу; в) одержати продукт реакції без домішки ферменту, що має особливе значення для харчової й фармацевтичної промисловості.

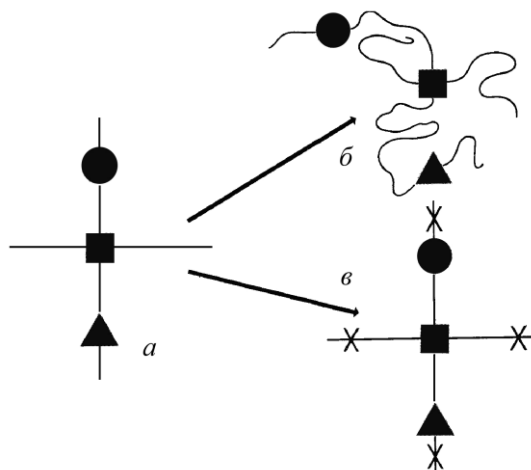


Рисунок 3.11 – Активний центр ферменту (*a*) і його зміни, що приводять до втрати активності (*б*) або стабілізації шляхом іммобілізації (*в*)

Процес можна багаторазово реалізовувати в періодичному режимі з використанням того самого ферментного препарату. Ще важливіше можливість безперервного режиму з використанням відомого в хімічній технології принципу взаємодії рухливої й нерухомої фаз. Рухлива фаза – розчин, суспензія, емульсія реагентів – протікає через реактор, заповнений насадкою з іммобілізованим на носії біокатализатором (нерухома фаза).

Фактором, що сприяє тривалому, у тому числі безперервному, функціонуванню іммобілізованих біокатализаторів, є їхня підвищена стабільність, збереження активності протягом тривалого часу як при зберіганні, так й у ході біотехнологічного процесу.

Принципи іммобілізації ферментів поширилися й на клітини.

### 3.6.1. Методи іммобілізації біокатализаторів

Тривалість збереження каталітичної активності й властивостей біокатализаторів визначається правильністю вибору методу й умов проведення іммобілізації. Існує декілька принципово різних методів зв'язування каталізаторів з носієм: методи адсорбції й хімічного зв'язування на поверхні, механічного включення, хімічного приєднання (рис. 3.12).

Специфіка кожного з них повинна бути врахована при виборі кращого методу іммобілізації й конкретних умов його реалізації.

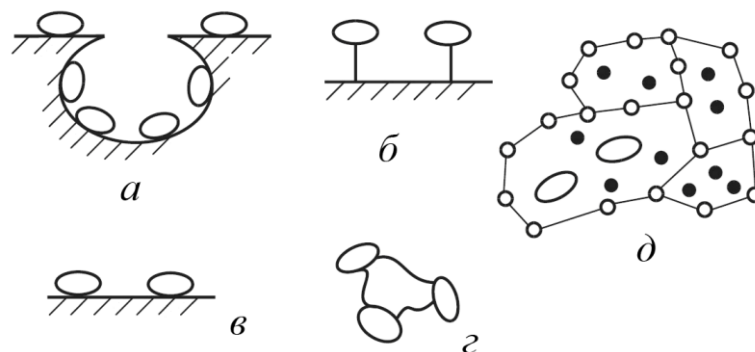


Рисунок 3.12 – Основні методи іммобілізації ферментів:  
 а – адсорбція на високопористому носії; б – ковалентне зв'язування;  
 в – адсорбція на плоскому носії; г – поперечна зшивка; д – включення в гель

*Іммобілізація шляхом адсорбції або хімічної зшивки.* Іммобілізація ферментів шляхом адсорбції на нерозчинних носіях відрізняється винятковою простотою й досягається при контакті водяного розчину ферменту з носієм.

Для одержання іммобілізованих ферментів використовується велика кількість носіїв. Основні вимоги до матеріалів, які можуть бути застосовані як носії, такі: 1 – висока хімічна й біологічна стійкість; 2 – висока механічна міцність (у першу чергу, стосовно стирання); 3 – достатня проникність для ферменту й субстратів, велика питома поверхня, висока місткість, пористість; 4 – можливість одержання у вигляді зручних у технологічному відношенні форм (гранул, мембран, труб, листів і т. д.); 5 – легке переведення в реакційноздатну форму (активація); 6 – висока гідрофільність, що забезпечує можливість проведення реакції зв'язування ферменту з носієм у водному середовищі; 7 – невисока вартість. Носії, що задовольняють одночасно всім цим вимогам, практично відсутні, і це зумовлює широкий набір застосовуваних для іммобілізації матеріалів. Як правило, їх використовують у вигляді порошків, дрібних кульок або гранул.

При іммобілізації шляхом адсорбції фермент фіксують на поверхні неорганічних (силікагель, пористе скло, пісок, обпалена глина, кераміка) або органічних (целюлоза, іонообмінні смоли, поліетилен, полістирол) носіїв. Механізм і міцність зв'язків між біокаталізатором і носієм різно-

манітні. Головну роль грає електростатична взаємодія носія й поверхні клітин. На практиці для одержання адсорбційно-імобілізованих ферментів застосовуються такі способи:

- *статичний спосіб з перемішуванням* полягає в тому, що носій вносять у водяний розчин ферменту й отриману суміш безупинно перемішують за допомогою магнітної або механічної мішалки. Імобілізація здійснюється за рахунок дифузії ферменту до поверхні носія з наступною адсорбцією. Після відмивання неадсорбованого ферменту препарат імобілізованого біокатализатора готовий до використання. Спосіб забезпечує рівномірне заповнення поверхні носія адсорбованим ферментом (рис. 3.13).



Рисунок 3.13 – Одержання адсорбційно-імобілізованих ферментів статичним способом з перемішуванням

- *динамічний – метод нанесення в колонку*: через колонку, заповнену носієм, за допомогою насоса спрямовують у напрямку зверху вниз розчин ферменту в режимі безперервної циркуляції (рис. 3.14).

Метод має ту перевагу, що дозволяє проводити нанесення ферменту, промивання, а потім і сам ферментативний процес в одній і тій же колонці без додаткових маніпуляцій з носієм.

У цей час адсорбційна імобілізація завдяки цілому ряду переваг є найбільш широко поширеним способом одержання імобілізованих ферментів промислового значення.

Прикладом промислового застосування іммобілізації ферментів може служити широко застосована нині технологія одержання виноградного цукру (глюкози) із крохмалю. Амілази, що розщеплюють крохмаль, не вводять у реактор разом із сировиною, а просочують ними пористі скляні кулі, якими потім заповнюють колону біореактора. Через реактор пропускають очищений розчин крохмалю. Процес протікає безупинно; реактор працює кілька місяців, поки через неминучі втрати не знизиться концентрація амілаз на поверхні носія.

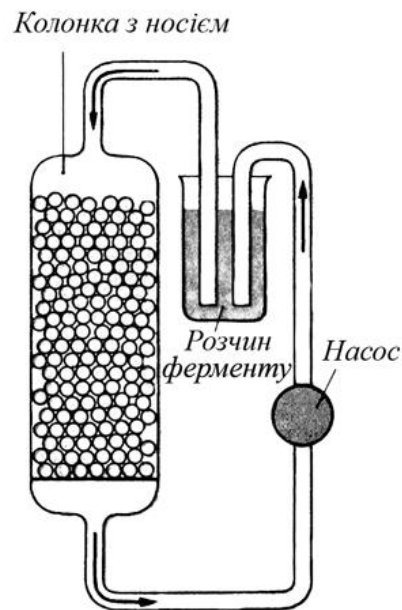


Рисунок 3.14 – Одержання адсорбційно-іммобілізованих ферментів динамічним способом

Аналогічними методами іммобілізують клітини мікроорганізмів, хоча сама ідея закріплення клітин з'явилася значно пізніше, ніж ідея закріплення ферментів. При цьому активність закріплених клітин приблизно в 10 разів перевищує активність вільних кліток. На сьогодні діє кілька великих дослідних установок для одержання спирту за допомогою іммобілізованих дріжджів, закріплених на пористих полімерних кулях. Кулі поміщають у колонний біореактор, зверху подають розчин цукру, а знизу відводять спирт. Апарат працює безупинно тривалий час (не менше 4 місяців); його продуктивність у 10 разів вище, а собівартість продукції значно нижче, ніж при використанні незакріплених дріжджів.

У сучасних розробках простежується тенденція до використання як носії синтетичних крупнопористих матеріалів, своєрідних «губок», що усмоктують клітинну масу. Величина пор при цьому повинна в декілька разів (4–12) перевищувати розмір клітин. Розповсюдженим губчатим матеріалом є поліуретан, що утворює тверду «піну» з відкритими осередками. Цей матеріал у вигляді дрібно нарізаних часток поміщають у біореактор із клітинами. Клітини, проникаючи в осередки носія, швидко ростуть. Така система застосовується в очищенні стічних вод. У загальному випадку ефективне очищення промислових стічних вод можливе лише при роботі з іммобілізованими мікроорганізмами. При цьому використовують їхнє просторове розташування для спрямованого руйнування тієї або іншої сполуки за допомогою спеціально підібраних штамів. В очисних спорудах установлюють спеціальні каркаси із гнучкими йоржами зі скловолокна, на кожному з яких адсорбовані специфічні мікроорганізми, здатні руйнувати певну забруднюючу речовину. Такі системи знешкоджують ціаніди, феноли й інші сполуки в 2–10 разів швидше, ніж без іммобілізації, знижують собівартість очищення, поліпшують якість очищеної води.

Для іммобілізації біокатализатора шляхом фізичної адсорбції без хімічної зшивки характерний слабкий вплив носія на властивості біокаталітичної системи. Ферменти зберігають свою природну активність, а клітини – життєздатність. У той же час неміцний характер зв'язку носія з ферментом (клітиною) веде до їхньої десорбції, що знижує надійність методу.

Більш міцною є *хімічна зшивка* – хімічне приєднання біокатализатора до носія. Для цих цілей широко застосовують реакції, що ведуть до утворення пептидних зв'язків між аміногрупами біокатализатора й карбоксильними групами носія або, навпаки, між карбоксильними групами катализатора й аміногрупами носія.

Іммобілізація шляхом хімічної зшивки відрізняється більш високою ефективністю й міцністю зв'язку, ніж проведена шляхом фізичної адсорбції.

Позитивними якостями методу іммобілізації шляхом адсорбції є: відносна дешевизна носіїв, яким до того ж можна надати будь-яку форму й

забезпечити необхідну пористість; стійкість адсорбентів до впливу мікроорганізмів.

Застосування методу обмежується недостатньо високою міцністю зв'язування біокатализатора з носієм, внаслідок чого відбувається десорбція ферменту. Це веде до втрати дорогого каталізатора й забруднення кінцевого продукту.

Ці недоліки можна усунути при іммобілізації ферментів шляхом включення в гелі.

*Іммобілізація шляхом включення у полімерну структуру (гель)*

Цим методом біокатализатор вносять у полімерну структуру: виходять гранули, плівки, волокна, що несуть біокатализатор (рис. 3.15).

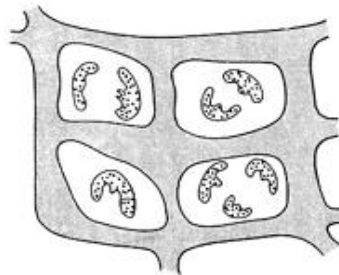


Рисунок 3.15 – Іммобілізація шляхом включення у полімерну структуру (гель)

Суть цього методу іммобілізації полягає в тому, що молекули ферменту включаються у тривимірну сітку з тісно переплетених полімерних ланцюгів, що утворюють гель (рис. 3.16).

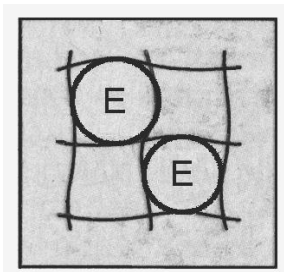


Рисунок 3.16 – Молекули ферменту в тривимірній сітці

Середня відстань між сусідніми ланцюгами в гелі менше розміру молекули включеного ферменту, тому він не може покинути полімерну ма-

трицю й вийти у навколишній розчин, тобто перебуває в іммобілізованому стані. Додатковий «внесок» у втримання ферменту в сітці гелю можуть робити також іонні й водневі зв'язки між молекулою ферменту й полімерними ланцюгами навколо неї.

Простір між полімерними ланцюгами в гелі заповнено водою, на частку якої, як правило, припадає значна частина загального об'єму гелю.

Для іммобілізації ферментів у гелі існує два основні способи. За одним з них фермент поміщають у водяний розчин мономера, а потім проводять полімеризацію, у результаті якої утвориться полімерний гель із включеними в нього молекулами ферменту.

У реакційну суміш часто додають також біфункціональні (тобто такі, що утримують у молекулі два подвійні зв'язки) агенти, що зшивають, які надають полімеру, що утворюється, структуру тривимірної сітки (рис. 3.17, *а*). За другим способом фермент вносять у розчин уже готового полімеру, який потім яким-небудь чином переводять у гелеподібний стан (рис. 3.17, *б*). Метод перспективний, особливо в застосуванні до цілих клітин. Клітини зберігають життєздатність і високу каталітичну активність, здатні реалізувати багатостадійні, поліферментні реакції. Застосовують як природні, так і синтетичні полімерні матеріали: альгінат, карагінан, колаген, желатин, целюлозу, поліакриламід. Спосіб включення біологічного матеріалу в полімерну структуру визначається специфікою полімеру. Полімеризація альгінату й карагінану, що добувають із морських водоростей, залежить від  $\text{Ca}^{2+}$  (для альгінату) і  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  (для карагінану). Біокаталізатор вносять у розчин мономерів (альгінату або карагінану), і отриману суміш по краплях додають у водяний розчин відповідних катіонів. Утворюються сферичні полімерні частки, що несуть іммобілізований біокаталізатор.

Важливим технологічним параметром є однорідність отриманих гранул. Однорідні гранули утворюються при пропусненні розчину «майбутнього полімеру» з біокаталізатором через спеціальні голки, що формують краплі стандартних розмірів.

Нова перспективна технологія основана на утворенні однорідних крапель при розриві струменя рідини із застосуванням пристосування типу пульверизатора, що дає дрібні (менше 1 мм) однорідні краплі. Ця тех-

нологія успішно застосована при одержанні гранул альгінату кальцію із включеними клітинами пекарських дріжджів.

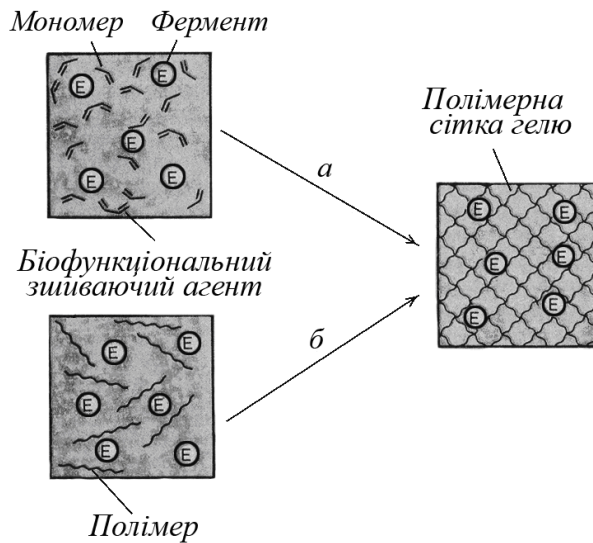


Рисунок 3.17 – Імобілізація ферментів шляхом включення в гель, отриманий шляхом полімеризації низькомолекулярного мономера (а) і готового полімеру (б)

Переваги методу іммобілізації шляхом включення у гель: простота застосовуваних методик, можливість створення іммобілізованих препаратів будь-якої геометричної конфігурації (гранули, плівки т.ін.). Багато полімерних гелів мають високу хімічну й теплову стійкість, що дає можливість багаторазово використовувати іммобілізовані каталізатори на їхній основі. Імобілізація в гелі приводить до значної стабілізації ферментів і до їхнього захисту від інактивації внаслідок бактеріального зараження, оскільки клітини бактерій не можуть проникнути в дрібнопористу полімерну матрицю.

Основним недоліком методу є те, що полімерна матриця створює значну перешкоду для дифузії субстрату до ферменту, знижуючи каталітичну ефективність методу. Якщо як субстрат використовується високомолекулярна сполука, то цей спосіб іммобілізації взагалі не застосовується.

#### *Імобілізація з використанням напівпроникних мембран*

Загальний принцип, що лежить в основі цього способу іммобілізації, полягає в тому, що водяний розчин ферменту відокремлюється від водяного розчину субстрату напівпроникною мембраною, що легко пропускає

невеликі молекули субстрату, але являє собою непереборний бар'єр для великих молекул ферменту (рис. 3.18).

*Напівпроникна мембрана*

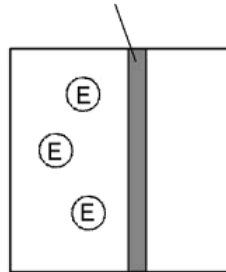


Рисунок 3.18 – Іммобілізація з використанням напівпроникних мембран

Існуючі модифікації цього методу розрізняються лише способами одержання напівпроникної мембрани і її природою. Найбільш поширений метод інкапсуляції. Суть його полягає в тому, що біокаталізатори покривають спеціальними напівпроникними оболонками, виготовленими з різних матеріалів – целюлози, поліакрилату, полістиролу, поліуретану, ліпідів (рис. 3.19).

Технологія інкапсуляції полягає в тому, що клітини або ферменти спочатку включають у полімерну структуру, а потім утворені гранули «одягають» напівпроникною мембраною; при цьому утворюються замкнуті сферичні пухирці з тонкою полімерною плівкою – мікрокапсули.



Рисунок 3.19 – Інкапсуляція ферментів

Залежно від умов одержання розмір мікрокапсул змінюється від декількох десятків до декількох сотень мікрометрів, а товщина мембрани становить соті–десяті частки мікрометра при діаметрі пор порядку декількох нанометрів.

Для утворення мікрокапсул гранули полімеру, що містить біокатализатор, поміщують в емульсію вода/масло, а потім при енергійному перемішуванні додають ефірний розчин полімеру, зазвичай нітрату целюлози. При зіткненні з поверхнею емульсійних крапель цей полімер, будучи нерозчинним у воді, утворить тонку оболонку – мікрокапсулу. Готові мікрокапсули відокремлюють центрифугуванням або фільтруванням і промивають. Потім усередину капсул уводять речовину, що руйнує полімер, внаслідок чого він розсипається на мономери, що дифундують через мембрану в зовнішній розчин. Клітини, подібно малькам в оболонці ікринки, здобувають волю руху в межах капсули, що сприяє їхньому росту й доступу до них поживних речовин. Розміри пор у мембранах установлюють із таким розрахунком, щоб у капсулах затримувався цільовий продукт, а більш низькомолекулярні домішки легко з них вимивалися. Після закінчення процесу біосинтезу за участю біокатализатора капсули ретельно відмивають, руйнують і відокремлюють центрифугуванням від розчину, що містить цільовий продукт.

Метод перспективний для синтезу препаратів харчового й медичного призначення.

До основних переваг цього методу іммобілізації можна віднести його простоту й універсальність (можливість включення не тільки індивідуальних ферментів, але й поліферментних систем, клітин, ферментів, попередньо іммобілізованих яким-небудь іншим способом, і т.ін.). Іммобілізовані в мембранних системах ферменти в значній мірі зберігають свою каталітичну активність, а їхня стабільність часто істотно зростає. Ефект стабілізації забезпечується, зокрема, за рахунок відсутності деградації ферментів під дією мікроорганізмів, які не можуть проникнути крізь мембрану.

Основним недоліком мембранних систем, як і систем на основі полімерних гелів, є неможливість ферментативного перетворення високомолекулярних субстратів, для яких мембрана створює непереборний дифузійний бар'єр.

Як видно, кожний з методів іммобілізації має свої переваги й недоліки. Для кожного типу біокатализаторів є свої кращі методи. Клітини найчастіше іммобілізують включенням у полімерні структури, у той час як

ферменти переважно іммобілізують на поверхні носіїв. Застосовують також комбінації різних методів. Наприклад, розчин ферменту змішують із зольом кремнієвої кислоти, і суміш наносять на пористий носій – оксид алюмінію. У цих умовах золь за 1–2 хвилини переходить у гель, так, що фермент виявляється одночасно включеним у гелієву структуру й адсорбованим на носії.

## ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Дайте характеристику основних стадій типового біотехнологічного виробництва.
2. Назвіть основні компоненти виробничих живильних середовищ і джерела цих компонентів, використовувані для готування живильних середовищ.
3. Що таке критерій стерилізації об'єкта? Викладіть методіку розрахунку сумарного критерію стерилізації в умовах нестаціонарного температурного режиму.
4. Які особливості процесів масо- і теплопередачі в біотехнології?
5. Обґрунтуйте вибір систем перемішування, аерації й теплообміну для біореакторів.
6. Чим визначається вибір методу виділення цільового продукту біосинтезу з культурального середовища?
7. Які переваги іммобілізованих біокаталізаторів перед вільними?
8. Назвіть основні методи іммобілізації ферментів і клітин, їхні переваги й недоліки.

## РОЗДІЛ 4. СПЕЦІАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ ХАРЧОВИХ ВИРОБНИЦТВ

### 4.1. Основні типи біохімічних процесів, використовуваних у харчових і бродильних виробництвах

У процесі виробництва харчових продуктів відбуваються біохімічні перетворення вихідних субстратів у цільові продукти. Найважливіші біохімічні процеси, що лежать в основі харчових виробництв, діляться залежно від складу використовуваного субстрату на дві основні групи:

- перетворення органічних речовин, що не містять азоту (безазотистих органічних речовин), – це різні види бродіння й окислювання;
- перетворення органічних речовин, що містять азот (гниття).

#### 4.1.1. Біохімічне перетворення органічних речовин, що не містять азоту

Процеси перетворення безазотистих речовин можуть відбуватися як в аеробних, так й в анаеробних умовах.

До анаеробних процесів відносяться різні види бродінь: спиртове, молочнокисле, маслянокисле й ін.

*Спиртове бродіння* викликається дріжджами роду *Saccharomyces* (цукроміцети), деякими бактеріями й окремими видами грибів. Основні збудники цього бродіння – цукроміцети (рис. 4.1).

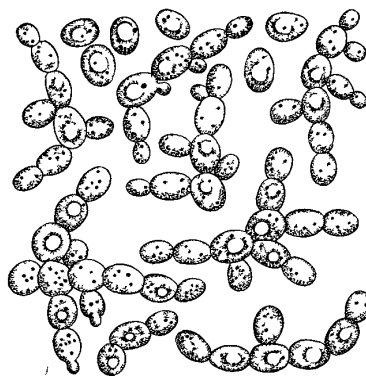


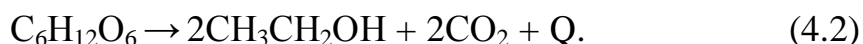
Рисунок 4.1 – Дріжджі роду *Saccharomyces*

Цукроміцети є факультативними анаеробами. В аеробних умовах дріжджі одержують енергію шляхом повного окислювання моно- і дисахаридів до  $\text{CO}_2$  і  $\text{H}_2\text{O}$ , тобто шляхом аеробного дихання



Цей процес лежить в основі виробництва хлібопекарських (пресованих) і кормових дріжджів, де необхідно, щоб цукор споживався, головним чином, на розмноження дріжджів, у результаті чого накопичувалася б значна біомаса.

В анаеробних умовах необхідну для життєдіяльності енергію дріжджі одержують шляхом зброджування моно- і дисахаридів за сумарним рівнянням:



Як і будь-яке бродіння, це складний багатоетапний процес, що протікає за участі комплексу різноманітних ферментів, наявних у дріжджів. Кожна стадія каталізується відповідним ферментом.

Поряд з основними продуктами бродіння у незначних кількостях утворюються побічні продукти: гліцерин, оцтовий альдегід, оцтова й бурштинова кислоти, сивушні масла (суміш вищих спиртів).

*Загальні умови спиртового бродіння.* На розвиток дріжджів і хід бродіння впливають багато факторів: склад середовища, що зброджується, вміст спирту, температура, рН, раса дріжджів.

*Склад середовища, що зброджується.* Більшість дріжджів здатна зброджувати моносахариди (глюкозу, фруктозу) і дисахариди (сахарозу, мальтозу), деякі дріжджі можуть зброджувати пентози (ксилозу, арабінозу). Крохмаль дріжджі не зброджують, тому що амілолітичні ферменти в них відсутні. Тому крохмалевмісна сировина для бродильних виробництв попередньо піддається *оцукрюванню* (частковому гідролізу) за участі амілаз різного походження. Концентрація цукру 10–15 % найбільш сприятлива для більшості дріжджів.

*Вміст спирту.* На дріжджі негативно впливає етиловий спирт, що накопичується в середовищі. Відношення різних дріжджів до спирту неоднакове. Гнітюча дія проявляється вже при концентрації 2–5 %, бродіння припиняється в більшості випадків при 12–14 %. Є й спиртостійкі дріжджі, які переносять вміст спирту до 18 %.

*Температура.* Стосовно температури цукроміцети підрозділяються на верхівкові й низові. *Верхівкові*, або *дріжджі верхівкового бродіння*, викликають бурхливе й швидке бродіння при температурі 20–28 °С. При цьому вони спливають на поверхню під дією диоксида вуглецю, що виділяється. Після закінчення бродіння дріжджі осідають на дно бродильних посудин пухким шаром.

*Низові*, або *дріжджі низового бродіння*, здійснюють більш спокійне або повільне бродіння при температурі 5–10 °С. Газ виділяється поступово, піни утворюється менше, дріжджі осідають на дно посудини, утворюючи щільний осад.

*Кислотність середовища.* Спиртове бродіння протікає при кислих значеннях рН = 4 – 4,5. При підлужуванні середовища до рН 8 дріжджі як основний продукт бродіння накопичують не спирт, а гліцерин (до 40 % відносно зброженого цукру). Це так звана *гліцеринова форма* спиртового бродіння



*Практичне використання спиртового бродіння.* Ряд харчових виробництв оснований на життєдіяльності цукроміцетів, що викликають спиртове бродіння. Воно лежить в основі виробництва етилового спирту, пива, вина, а також хлібопечення. Разом з молочнокислим бродінням воно використовується для виробництва квасу, кефіру, кумису. Дріжджі, використовувані на тому або іншому виробництві, мають специфічні якості. Більш того, у тому самому виробництві можуть застосовуватися різновиди того самого виду, що відрізняються між собою однією або декількома особливостями. Такі культури називають *расами* (штамами). Їх одержують, як правило, з однієї клітки. Кожне виробництво у своєму користуванні має декілько рас, що задовольняють певним вимогам.

Етиловий спирт - основний продукт бродіння – знаходить широке застосування в багатьох галузях народного господарства. Основними споживачами спирту є харчова, медична й хімічна промисловість; він може бути використаний як джерело вуглецю для виробництва біомаси мікроорганізмів, а також як транспортне паливо.

Продуктом спиртового бродіння є вино. Сировиною у виробництві вин служить виноградний сік, який сульфітують (обробляють  $\text{SO}_2$ ) з метою придушення розвитку сторонніх мікроорганізмів, а потім зброджують.

**Аеробні процеси** перетворення органічних безазотистих речовин здійснюються мікроорганізмами в присутності молекулярного кисню, але, на відміну від аеробного дихання (повного окислювання), є процесами неповного окислювання. Ці процеси лежать в основі виробництва харчового оцту, органічних кислот (лимонної, щавлевої й ін.).

*Одержання оцтової кислоти* зі спиртовмісних рідин було відомо більше 10 тис. років тому. У ті часи стародавні греки й римляни використовували оцет як освіжаючий напій й одержували його, головним чином, залишаючи вино відкритим.

Оцтовокисле бродіння ґрунтується на здатності оцтовокислих бактерій окисляти спирт киснем повітря в оцтову кислоту



У промислових технологіях для одержання оцту використовують оцтовокислі бактерії роду *Acetobacter*.

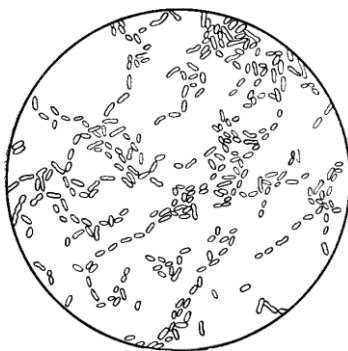
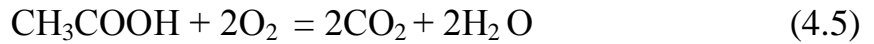


Рисунок 4.2 – Оцтовокислі бактерії роду *Acetobacter*

Оцтовокислі бактерії – суворі аероби. Деякі з них можуть викликати процес так званого переокислювання, тобто подальшого повного окислювання оцтової кислоти, що утворилася зі спирту, до  $\text{CO}_2$  і  $\text{H}_2\text{O}$



Цей процес є небезпечним у виробництві оцту. Оцтовокислі бактерії розрізняються за своєю стійкістю до спирту, здатністю накопичувати різну кількість оцтової кислоти (від 4,5 % до 9 – 11 %). Оптимальна температура для їхнього розвитку – близько 30 °С. Вони кислотостійкі, можуть розвиватися при рН близько 3, оптимальні значення рН 5,4–6,3. Оцтовокислі бактерії широко поширені в природі, живуть на квітах, на зрілих фруктах, ягодах, овочах, є в садовому ґрунті, у прокислих фруктових соках пиві, вині, квашених овочах.

Оцтовокислі бактерії використовуються для промислового одержання спиртового натурального оцту. Вихідною сировиною є розчин спирту, що містить невелику кількість сахарози, мінеральні солі як джерела азоту, фосфору, сірки, калію й магнію, а також оцтову кислоту. Підкислення необхідне для запобігання розвитку сторонніх мікроорганізмів. Виробничою культурою є *Acetobacter aceti*.

У теперішній час процес реалізують як періодичним (поверхневим), так і безперервним (глибинним) способом. Принцип методів полягає в створенні якнайбільшої поверхні для окислювання спирту. Поверхневий режим протікає в струминних генераторах об'ємом до 60 м<sup>3</sup>, наповнених згорненою буковою стружкою, на поверхні яких закріплюються оцтовокислі бактерії. У стінках окислювача є отвори для засмоктування повітря. Вихідний живильний розчин розбризкують по поверхні стружок, а оцтовокислі бактерії, що густо заселяють стружку, окисляють спирт в оцтову кислоту. Розчин стікає, збираючись у нижній частині апарата. Після цього рідину збирають і знову накачують у верхню частину апарата. Процедуру повторюють 3–4 рази, у результаті протягом 3-х днів до 90 % спирту трансформується в ацетат і накопичується оцтова кислота в кількості 9–10 %. Готовий оцет зливають, і цикл повторюється спочатку.

На сьогодні розроблений і реалізований ефективний безперервний спосіб одержання оцтової кислоти глибинним методом у батареї фермен-

таторів (як правило, 5 апаратів). Температура культивування становить 28 °С. Найкращою сировиною для процесу є етиловий спирт, отриманий із зерно-картопляної сировини, при його концентрації близько 10 %. Оптимум рН для розвитку бактерій – близько 3. При збільшенні вмісту оцтової кислоти в культурі понад 8 % ріст бактерій сповільнюється, при 12–14 % – припиняється. Тому процес проводять у батареї послідовно з'єднаних апаратів (рис. 4.3).

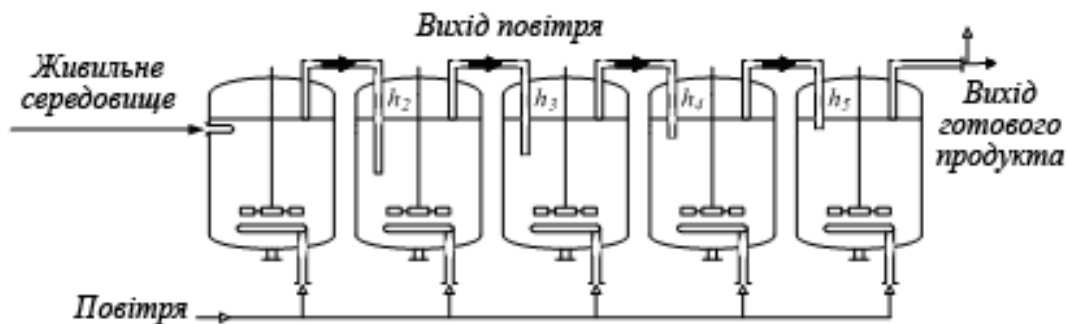


Рисунок 4.3 – Схема установки для одержання оцту безперервним способом

Перший виконує роль інокулятора, тому в нього безупинно подають свіже середовище, засівають оцтовокислими бактеріями й підтримують умови, оптимальні для швидкого утворення біомаси бактерій.

Вміст ферментатора перемішується мішалкою, а через барботер безупинно подається повітря. Культура з першого апарата надходить у другий апарат і далі – у наступні; при цьому транспортування культуральної рідини здійснюється повітрям. У кожному апараті умови ферментації стабілізуються відповідно до вимог протікання ходу ферментації, при поступовому зниженні температури середовища від 28 °С у першому апараті до 25 °С – в останньому. Режим аерації також змінюється від 0,4 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup>хв до 0,15 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup>хв. Концентрація спирту із другого по четвертий апарат стабілізується на необхідному рівні подачею в них середовища з 40 % етанолом. З останнього апарата виводиться культуральна рідина зі вмістом ацетату не нижче 9,0 % і не вище 9,3 %. Вихід кислоти становить до 90 кг із 100 л безводного спирту. На постферментаційній стадії після відділення бактеріальної біомаси розчин оцту фільтрують, звільняючи від

забарвлювальних і зважених часток, і далі піддають пастеризації. Для підвищення концентрації вихідні розчини виморожують до 20–30 %. Подальше концентрування до одержання крижаної оцтової кислоти (98,0–99,8 %) проводять методом перегонки.

Крім спиртового натурального оцту роблять винний оцет, коли субстратом для окислювання служить вино, і яблучний оцет, коли використовується яблучний сік.

#### 4.1.2. Біохімічне перетворення органічних речовин, які містять азот

Процеси перетворення органічних азотвмісних речовин мають велике значення у виробництві харчових продуктів. Це, у першу чергу, гнильні процеси.

*Гниття* – це процес глибокого розкладання білкових речовин мікроорганізмами. Одним з кінцевих продуктів розкладання білків є аміак ( $\text{NH}_3$ ), тому процес гниття називають також *амоніфікацією* білкових речовин, а бактерії – *гнильними*, або *амоніфікаторами*.

Схематично процес розщеплення білків представлений на рис. 4.4.

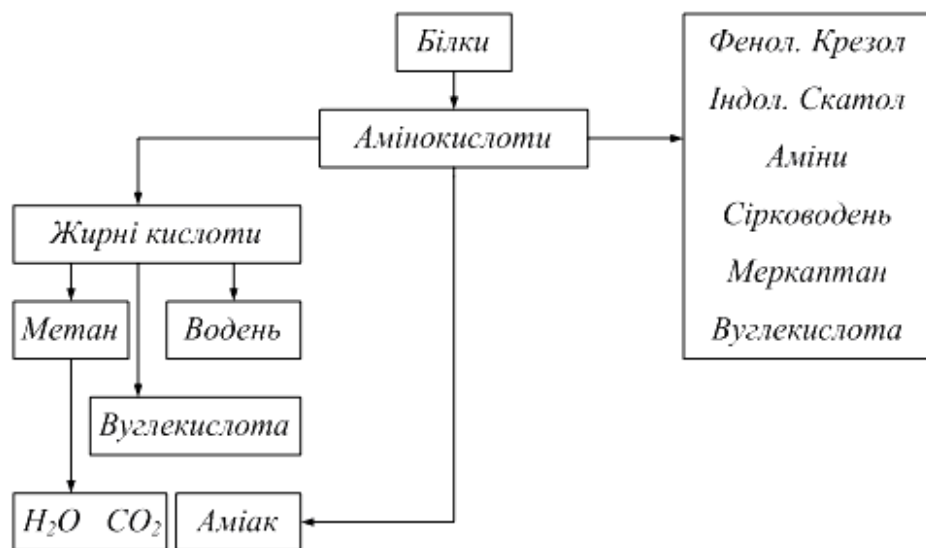
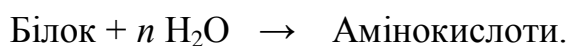


Рисунок 4.4. – Схема розщеплення білків

Білки, подібно іншим високомолекулярним сполукам, у незміненому вигляді усередину бактеріальної клітини проникнути не можуть і спочат-

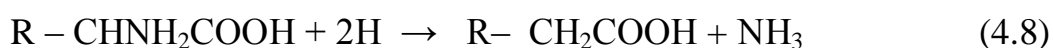
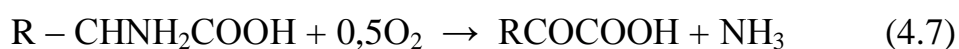
ку піддаються розщепленню поза клітиною під впливом мікроорганізмів, що володіють протеолітичними ферментами, які за характером дії є екзоферментами.

Розщеплення молекул білків починається з їхнього гідролізу за допомогою ферментів протеаз за такою схемою



Подальші перетворення амінокислот, що утворилися, різні. Вони дифундують усередину мікробних клітин і можуть використовуватися мікроорганізмами або в конструктивному обміні для біосинтезу білків клітини як джерела вуглецю й азоту, або піддаються дезамінуванню або декарбоксиліруванню.

*Дезамінування* приводить до відщиплення аміногрупи, з якої утворюється аміак, органічні кислоти й спирти по рівняннях:



При розкладанні білків утворюються мурашина, оцтова, пропіонова, масляна, валеріанова й інша кислоти та високомолекулярні спирти. Утворені продукти розпаду амінокислот зазнають різних перетворень залежно від виду бактерій й умов, у яких відбувається процес гниття.

В аеробних умовах кислоти повністю окисляються до  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CO}_2$  (весь вуглець білкових речовин виділяється у вигляді  $\text{CO}_2$ ). Якщо в складі амінокислот є сірка, то вона при гнитті виділяється у формі сірководню або меркаптанів, що мають запах тухлих яєць.

В анаеробних умовах повне окислювання проміжних продуктів розкладання амінокислот неможливе, і вони накопичуються в середовищі. Крім того, в анаеробних умовах відбувається *декарбоксилірування* амінокислот (тобто їхнє розкладання з виділенням  $\text{CO}_2$ ). При цьому утворюються речовини, що погано пахнуть: індол, скатол, фенол й ін. При дека-

рбоксиліруванні амінокислот утворюються діаміни; їхні похідні є трупними отрутами, мають отрутну дію й можуть викликати отруєння.

Збудниками гниття в основному є бактерії. До аеробних гнильних бактерій відносяться головним чином спороутворюючі палички *Bacillus subtilis* (рис. 4.5).

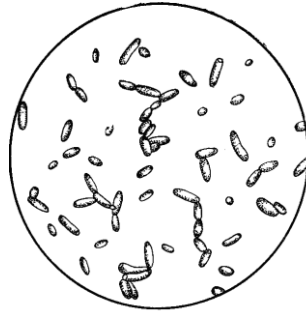


Рисунок 4.5 – *Bacillus subtilis* (сінна паличка)

До строгих анаеробів відносяться спорові палички *Clostridium putrificum*, *C. sporogenes* (рис. 4.6).

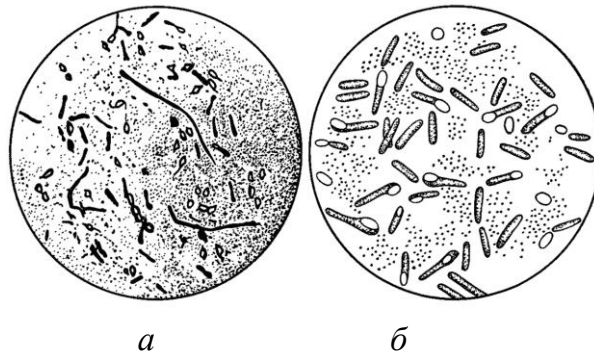


Рисунок 4.6 – Спорові палички: *a* – *Clostridium putrificum*;  
*б* – *C. sporogenes*

*Значення процесу гниття.* Гнильні бактерії є шкідниками багатьох харчових продуктів, що мають високу харчову цінність (м'яса й м'ясопродуктів, риби й рибопродуктів, молока й молочних продуктів, яєць й ін.).

У природі (у воді, ґрунті) гнильні бактерії активно розкладають трупи тварин та відмерлі рослини, мінералізують білкові речовини й тим самим відіграють важливу роль у круговороті вуглецю й азоту.

## 4.2. Основи мікробіологічного та санітарно-гігієнічного контролю у харчовій промисловості

Мікроорганізми у харчовій промисловості відіграють двояку роль. З одного боку, багато харчових виробництв оснований на їхній життєдіяльності: хлібопечення, виробництво хлібопекарських дріжджів, сироваріння, виробництво спирту, пива, квасу, виробництво кисломолочних продуктів (сир, сметана, кисляк й ін.), органічних кислот (оцтова, лимонна, молочна) і ін. Для одержання цих продуктів використовують чисті культури мікроорганізмів.

З іншого боку, у харчові виробництва попадає інфекція, тобто сторонні мікроорганізми. Це або безпечні для здоров'я людини сапрофіти, які є шкідниками виробництва, і в результаті їхньої життєдіяльності порушується технологічний процес, зростають втрати сировини, знижується вихід й якість готової продукції; або патогенні мікроорганізми, які можуть завдати шкоди здоров'ю людини, стати причиною важких інфекційних захворювань і харчових отруєнь. На всіх харчових підприємствах необхідно здійснювати строгий мікробіологічний контроль із метою виявлення сторонніх мікроорганізмів, і у випадку їхнього виявлення проводити дезінфекцію.

### 4.2.1. Джерела сторонніх мікроорганізмів у харчових виробництвах

На харчових підприємствах можуть бути зовнішні (позаза заводські) і внутрішні (внутрішньозаводські) джерела інфекції. До позаза заводських відносяться – сировина, вода й повітря, до внутрішньозаводських – повітря виробничих приміщень, виробнича культура мікроорганізму, технологічне устаткування, тара, руки, одяг, взуття персоналу.

4.2.1.1. Позаза заводські джерела інфекції. *Сировина*. Однією з умов одержання продукції високої якості є доброякісність сировини, що залежить від умов і строків її зберігання.

На поверхні плодів, ягід, овочів постійно знаходиться велика кількість різних мікроорганізмів, здатних розмножуватися при невеликій

концентрації поживних речовин. Вони становлять так звану епіфітну мікрофлору, чисельність і видовий склад якої змінюються від виду рослини, кліматичних й інших умов. Характерними представниками епіфітної мікрофлори плодів і ягід є різні дріжджі, молочні й оцтовокислі бактерії, спори цвілевих грибів. Зерно й солод рясно інфіковані епіфітною мікрофлорою, серед якої виявлені спори грибів, молочнокислі бактерії й різні коки.

Докладно мікрофлора окремих видів сировини, напівфабрикатів, а також допоміжних матеріалів (цукор, сіль, спеції, ароматичні трави й ін.), її походження й шкода, що спричиняється нею, розглядаються в спеціальних розділах мікробіології конкретно для кожного виробництва.

*Вода.* Харчова промисловість України нараховує більше 20 галузей, з яких найбільшими споживачами води є цукрове, олійно-жирове, спиртове, крохмале-паточне, дріжджове, пивобезалкогольне й консервне виробництва. Вода є складовою частиною промислової продукції, розчинником, засобом транспортування й мийки сировини, устаткування, охолоджувачем, теплоносієм, використовується для підтримки необхідних санітарно-гігієнічних умов у виробничих приміщеннях і на території підприємства, для одержання пари й т.д.

Вимоги до якості води для виробничих потреб залежать від її призначення. Якщо вода входить до складу готової продукції (безалкогольні напої, пиво, компоти, маринади, розсоли й т.ін.), то вона повинна бути прозорою, по можливості безбарвною, без стороннього запаху й смаку; не повинна містити сторонніх домішок, що впливають на здоров'я людини, а також патогенних мікроорганізмів. Вода повинна відповідати вимогам ГОСТ 2874-82 «Вода питна. Гігієнічні вимоги й контроль за якістю».

При використанні мікробіологічно забрудненої води у виробництво можуть потрапити збудники інфекційних захворювань, харчових отруень, а також різні сапрофіти – гнильні, оцтоутворюючі бактерії, які можуть несприятливо впливати не тільки на хід технологічного процесу, але й на якість і стійкість готової продукції при зберіганні.

Найбільш повно задовольняють вимогам стандартів артезіанські й джерельні води. Ними можна користуватися без попереднього очищення.

Воду з відкритих водоймищ піддають спеціальній обробці на водоочисних станціях.

*Першим* етапом є відстоювання води в спеціальних басейнах (відстійниках) для видалення суспензій, посвітління, знебарвлення води, видалення небажаних присмаків і запахів, знесолення й опріснення води й т.д. Для прискорення відстоювання й більш ефективного посвітління й знебарвлення води застосовують *коагулянти* – речовини, що викликають укрупнення колоїдних часток і їх наступне випадання в осад. Як коагулянти застосовують солі алюмінію й заліза. При використанні, наприклад, сульфату алюмінію відбувається його взаємодія з розчиненими у воді гідрокарбонатами кальцію й магнію за рівняннями



Гідрокарбонат алюмінію, що утворився, нестійкий і розпадається на гідроксид алюмінію й діоксид вуглецю



Сумарно



Гідроксиди алюмінію випадають у вигляді пластівців. Осідаючи, пластівці захоплюють за собою суспензії й клітини мікроорганізмів.

*Другим* етапом є фільтрування води через шар річкового піску. У верхніх шарах фільтра формується біологічна плівка, що містить велику кількість мікроорганізмів і складається з домішок та пластівців коагулянтів, які містяться у воді.

*Третій* етап – знезаражування профільтрованої води, тобто знищення мікроорганізмів, що залишилися у воді, серед яких можуть бути й патогенні, за допомогою різних дезинфікуючих засобів.

У ряді процесів з успіхом може використовуватися вода непитного призначення (для охолодження устаткування, транспортування деяких видів сировини, відходів й ін.). Наприклад, у цукровій промисловості питома вага технічної води може досягати 90–95 % від загальної кількості споживаної підприємством води (включаючи зворотну воду). Для миття деяких видів сировини (картоплі, цукрового буряка, зерна й ін.) і тари з метою економії чистої води, скорочення кількості стічних вод і миючих препаратів застосовується зворотна вода. Зворотна вода перед повторним використанням обов'язково піддається очищенню з метою видалення грубих домішок і дезинфекції, а потім використовується на тих же операціях або в інших апаратах і процесах. Наприклад, тепла вода після охолодження устаткування, конденсації пари іде на миття устаткування, підлог.

*Повітря.* У харчовій промисловості мікрофлора атмосферного повітря має значення лише на тих ділянках технологічного процесу, де сировина, напівфабрикати або готовий продукт стикається з ним. Тут має значення також температура й відносна вологість повітря.

#### 4.2.1.2. Внутрішньозаводські джерела інфекції

*Повітря виробничих приміщень* становить значну небезпеку в харчових виробництвах. Воно є внутрішньозаводським джерелом забруднення сировини, устаткування, виробничих культур мікроорганізмів і готової продукції. Тому чистота повітря є важливою умовою для одержання високоякісного готового продукту.

Для зниження бактеріального обсіміння повітря виробничих приміщень застосовують фізичні способи його очищення. За допомогою вентиляції забруднене повітря видаляється із приміщень, а на його місце надходить більш чисте атмосферне повітря. Фільтрація повітря, що надходить, через спеціальні фільтри значно підвищує ефективність очищення. Фільтри заповнюють гранульованим зернистим і волокнистим фільтрувальним матеріалом, використовуючи гранульоване вугілля й спеціальні бактерицидні волокна. Це забезпечує практично стовідсоткове очищення й стерилізацію повітря.

*Виробнича культура.* У тих галузях харчової промисловості, де виробництво основане на життєдіяльності мікроорганізмів, виробнича ку-

льтура (дріжджі, молочнокислі бактерії, міцеліальні гриби й ін.) часто служить джерелом внутрішньозаводської інфекції. Причиною її забруднення є незадовільний санітарний стан апаратури, води, повітря, негерметичність виробничого устаткування.

Навіть чиста культура, отримана з апарата для її розведення, після зіткнення з виробничим живильним середовищем і комунікаціями перестає бути чистою, оскільки технологічний процес ведеться в нестерильних умовах. Така культура переносить інфекцію з однієї ділянки технологічного процесу на іншу, у результаті чого забруднюється все устаткування.

*Технологічне устаткування й тара.* Чистота устаткування, апаратури, комунікацій і тари має винятково велике значення для якості готової продукції. Неякісне миття, нерегулярна дезинфекція приводять до великого обмінення продукту і є причиною випуску недоброякісної продукції й низької стійкості її при зберіганні. Ефективність миття й дезинфекції залежить від ступеня забруднення матеріалу й стану оброблюваних поверхонь встаткування.

Залишки напівпродуктів і відходів представляють для мікроорганізмів добре живильне середовище, де вони починають швидко розмножуватися й забруднюють все виробництво. Швидкість розмноження залежить від стану поверхні й матеріалу апарата. Так, в алюмінії й нержавіючої сталі поверхня матова або полірована, у сталі з емальованим покриттям і скла зовсім гладка, без пор, у гуми – пориста, а в деревини – шорсткувата. Найкраще змиваються залишки напівпродукту й мікроорганізми з устаткування з нержавіючої сталі, скла, органічного скла, склопластику, поліетилену, алюмінію, гірше – з поверхні дерев'яних ємкостей. У той же час в алюмінієвих ємкостях при поганому відході або при застосуванні невідповідних миючих і дезинфікуючих засобів внаслідок корозії з'являються тріщини й мікропори, які є вогнищами інфекції.

Комунікації, рукави, шланги з гуми на внутрішній поверхні також стають пористими, утворюють тріщини за рахунок поступового нашарування там забруднюючих осадів та їхнього підсихання, куди проникають і починають розмножуватися мікроорганізми. Вогнищами інфекції є кути, закруглення в устаткуванні, трійники, фланцеві з'єднання, низько розташовані штуцери й т.ін., які неможливо добре продезинфікувати.

*Обслуговуючий персонал.* При недотриманні особистої гігієни персонал може стати рознощиком інфекції на харчовому підприємстві. Особливу небезпеку представляють хворі шлунково-кишковими й гнійничковими захворюваннями, а також носії патогенних мікроорганізмів. Персонал харчових виробництв повинен стежити за станом свого здоров'я, дотримувати правил особистої гігієни – стежити за чистотою свого тіла, рук, особливо нігтів, працювати в чистому санітарному одязі.

#### **4.2.2. Патогенна мікрофлора.**

##### **Санітарно-показові мікроорганізми**

*Патогенність* – це потенційна здатність певного виду мікробів приживатися в макроорганізмі, розмножуватися й викликати певне захворювання. Патогенні мікроорганізми є паразитами. У процесі пристосування до паразитичного способу життя вони втратили здатність до утворення цілого ряду ферментів і стали використовувати необхідні їм сполуки з живих клітин хазяїна. Патогенні мікроорганізми характеризуються суворою специфічністю – кожен їхній вид здатний викликати тільки певну хворобу з характерними для неї симптомами. Так, холерний вібріон викликає холеру, туберкульозні мікобактерії – туберкульоз і т.д.

Багато патогенних мікроорганізмів паразитують тільки в певних органах і тканинах. Наприклад, збудники шлунково-кишкових захворювань розмножуються при потраплянні тільки в кишковик. Однак є мікроорганізми, які можуть вражати будь-який орган або тканину, наприклад стафілококи, що викликають гнійно-запальні процеси, збудники туберкульозу й ін.

*Санітарно-показові мікроорганізми.* Швидко й безпосередньо виявити в об'єктах зовнішнього середовища (воді, повітрі, харчових продуктах) патогенні мікроорганізми дуже важко, тому що їхня кількість мізерно мала в порівнянні із сапрофітною мікрофлорою досліджуваних об'єктів. Тому можливе забруднення цих об'єктів патогенними мікроорганізмами визначають непрямым шляхом – на підставі якісного й кількісного обліку санітарно-показових мікроорганізмів.

До санітарно-показових мікроорганізмів відносяться кишкова паличка, гемолітичні (які розчинюють еритроцити крові) стрептококи й стафі-

лококи. Вони є постійними мешканцями природних порожнин тіла людини й тварин (кишківника, слизуватих оболонок порожнини рота й верхніх дихальних шляхів). Присутність санітарно-показових мікроорганізмів в об'єктах зовнішнього середовища вказує на забруднення їхніми виділеннями людського організму, а отже, і на можливість наявності в них відповідних патогенних мікроорганізмів.

*Кишкова паличка (Escherichia coli)* є постійним мешканцем товстих кишок, нешкідлива для людини, але є показником фекального забруднення води й харчових продуктів виділеннями кишківника людини, що свідчить про можливу наявність збудників важких кишкових захворювань (дизентерії, черевного тифу, паратифів і т.ін.), які виділяються із хворого організму в зовнішнє середовище.

Для санітарно-гігієнічної оцінки води, харчових продуктів й інших об'єктів необхідно не тільки встановити наявність у них кишкової палички, але в ряді випадків провести кількісний облік цих бактерій.

Інтенсивність фекального забруднення характеризується двома мікробіологічними показниками: колі-титром і колі-індексом.

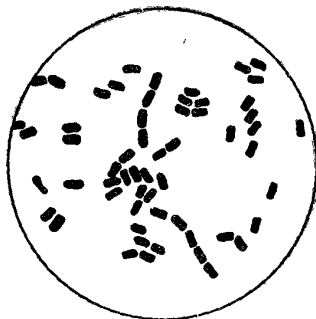


Рисунок 4.7 – *Escherichia coli* (кишкова паличка)

*Колі-титр* – найменша кількість досліджуваного матеріалу (об'єм, маса), у якому виявляється одна кишкова паличка. Для рідких об'єктів – води, сусла, вина, пива, напоїв - колі-титр виражають в одиниці об'єму; для щільних середовищ (грунту) – в одиницях маси. Чим менше величина колі-титру, тим небезпечніше такий об'єкт в епідеміологічному відношенні.

*Колі-індекс* – це кількість кишкових паличок в одиниці об'єму (маси) досліджуваної речовини (як правило, в 1 л або 1 кг).

Останнім часом найбільш надійним показником фекального забруднення вважають вміст ентерококів. Вони не розмножуються у воді, через що фекальне походження їх більш вірогідне.

*Гемолітичні стрептококи й стафілококи.* Вони постійно живуть на слизистих оболонках порожнини, рота й верхніх дихальних шляхів і також є санітарно-показовими мікроорганізми. Їхня наявність указує на обсіміння повітряного середовища й деяких продуктів мікрофлорою дихальних шляхів, серед якої можуть бути збудники ангіни, коклюшу, туберкульозу й ін., що попадають туди при кашлі, чханні й ін.

#### ***4.2.3. Загальні принципи мікробіологічного й санітарно-гігієнічного контролю в харчовій промисловості***

Завданням мікробіологічного контролю є швидке виявлення мікроорганізмів-шкідників, шляхів їхнього проникнення у виробництво, запобігання розвитку сторонньої мікрофлори шляхом використання різних профілактичних заходів, знищення її шляхом дезінфекції з метою одержання високоякісної готової продукції.

Мікробіологічний контроль повинен проводитися систематично заводськими лабораторіями. Він здійснюється на всіх етапах технологічного процесу, починаючи із сировини й кінчаючи готовим продуктом, на підставі державних стандартів, технічних умов (ТУ), інструкцій, правил, методичних вказівок й іншої нормативної документації, розробленої для кожної галузі харчової промисловості.

Мікробіологічний контроль буде діючим, тільки, якщо він поєднується із санітарно-гігієнічним контролем, призначення якого – виявлення патогенних мікроорганізмів. Санітарно-гігієнічний контроль включає перевірку чистоти води, повітря виробничих приміщень, харчових продуктів, санітарного стану технологічного устаткування, інвентарю, тари, гігієнічного стану обслуговуючого персоналу (чистоти рук, одягу взуття й т.ін.). Він здійснюється мікробіологічною лабораторією підприємства й санітарно-епідеміологічних станцій.

*Контроль харчових продуктів.* Для оцінки якості сировини, напівфабрикатів, допоміжних матеріалів, готової продукції використовуються два показники – загальне бактеріальне обсіміння (ЗБО) і кількість бак-

терій кишкової групи (переважно кишкової палички). Існують норми припустимого загального бактеріального обсіменіння й вмісту кишкової палички для конкретних об'єктів контролю.

*Контроль води.* Для санітарно-гігієнічної оцінки води використовуються два мікробіологічних показники: загальна кількість бактерій у воді й колі-індекс.

*Загальна кількість бактерій* – це кількість колоній аеробних і факультативно-анаеробних мезофільних сапрофітних бактерій, що виростають при посіві 1 мл нерозбавленої води на м'ясо-пептонному середовищі за 24 год. при 37 °С.

Для оцінки якості води найбільш важливим мікробіологічним показником є величина колі-індексу, що характеризує забруднення води патогенними бактеріями кишкової групи. Відповідно до ГОСТ 2874-82 «Вода питна. Гігієнічні вимоги й контроль за якістю» загальна кількість клітин бактерій в 1 мл води повинна бути не більше 100, а колі-індекс – не більше 3 в 1 л.

Аналіз води проводиться один раз у квартал при користуванні міським водопроводом, а при наявності власних джерел водопостачання – один раз на місяць.

*Контроль повітря виробничих приміщень.* Для санітарно-гігієнічної оцінки повітря закритих приміщень визначають два показники.

*Першим* є загальна кількість сапрофітних мікроорганізмів в 1 м<sup>3</sup> повітря. Повітря виробничих цехів харчових виробництв вважається чистим, якщо в ньому міститься не більше 500 сапрофітних мікроорганізмів в 1 м<sup>3</sup>. *Другим* показником є кількість у тому ж об'ємі повітря санітарно-показових мікроорганізмів – гемолітичних стрептококів і стафілококів. Нормативів на цей показник сьогодні немає. Виявлення їх у повітрі виробничих приміщень вказує на санітарне неблагополуччя такого об'єкта й можливість виникнення в персоналу інфекційних захворювань (ангіни, грипу, коклюшу, дифтерії, туберкульозу й ін.), що викликаються мікрофлорою дихальних шляхів, яка передається через повітря. Таке повітря може стати джерелом обсіменіння харчових продуктів, а отже, становити потенційну небезпеку для здоров'я людей.

*Контроль устаткування, інвентарю, тари.* Для запобігання забруднення сторонніми мікроорганізмами сировини й напівфабрикатів у процесі їхньої переробки, а також готової продукції при її зберіганні необхідна підтримка чистоти на робочому місці, у виробничих приміщеннях, проведення регулярної санітарної обробки устаткування, інвентарю, тари.

*Санітарна обробка* включає:

- механічне очищення робочих поверхонь від залишків харчових продуктів;
- ретельне промивання робочих поверхонь гарячою водою із застосуванням мийних засобів;
- дезинфекцію й наступне ретельне промивання робочих поверхонь гарячою водою до повного видалення дезинфікуючого засобу (дезинфектанту).

Дезинфекція устаткування може здійснюватися шляхом пропарювання його насиченою парою, при якому гинуть як вегетативні клітини, так і спори мікроорганізмів. Можна проводити дезинфекцію й хімічними дезинфікуючими засобами. Заключна обробка гарячою водою має подвійне значення: з одного боку, видаляються залишки дезинфектанту, з іншого – відбувається нагрівання поверхонь, що сприяє їхньому швидкому висиханню.

Після санітарної обробки проводять санітарно-гігієнічний контроль якості миття й дезинфекції устаткування, інвентарю, тари, що включає визначення колі-індексу й загального бактеріального обсіменіння змивів з технологічного устаткування. Змиви беруть за допомогою стерильних нержавіючих металевих трафаретів з вирізаною серединою (площа вирізу 10, 25 або 100 см<sup>2</sup>). Цю площу протирають стерильним ватяним тампоном, змоченим у пробірці на 10 мл зі стерильною водою, після чого тампон занурюють у цю ж пробірку, ретельно перемішують вміст і висівають 1 мл змиву на м'ясо-пептонний агар. Після термостатування посівів при 30 °С впродовж 24–28 г визначають загальне бактеріальне обсіменіння у перерахуванні на 1 см<sup>2</sup> досліджуваної поверхні.

У змивах з добре вимитого устаткування загальна кількість мікроорганізмів і колі-індекс не повинні перевищувати їхнього вмісту в чистій воді, що надходить для миття.

Контроль якості миття й дезінфекції *трубопроводів, рукавів, шлангів* подібним чином здійснити не можна, тому що з їхньої внутрішньої поверхні важко зробити змиви за допомогою трафарету. У цьому випадку загальна кількість мікроорганізмів і колі-індекс визначають в останній промивній воді шляхом її мікроскопування й посіву. Загальне бактеріальне обсіменіння і колі-індекс промивної води не повинні відрізнятися від показників води, застосовуваної у виробництві.

Для контролю якості миття й дезінфекції *інвентарю* проби відбирають у той момент, коли інвентар підготовлений до роботи. Із дрібного інвентарю (мішалки, пробники, термометри, ножі, шприци й т.ін.) мазки беруть стерильним тампоном з усієї поверхні предмета й досліджують на загальну кількість мікроорганізмів і наявність кишкової палички. Зі столів, стелажів, лотків, цебрів, лопат і т.д. мазки беруть стерильним тампоном за допомогою обпаленого трафарету й роблять аналогічні аналізи.

Для контролю якості миття й дезінфекції *тари* (бочки, бідони, цистерни) проби останньої промивної води мікроскопують. Загальна кількість мікроорганізмів в 1 мл і колі-індекс не повинні значно відрізнятися від обсіменіння води, застосовуваної у виробництві.

*Контроль чистоти рук й одягу персоналу.* При недотриманні особистої гігієни (чистоти рук, одягу), особливо під час ручних операцій, на харчові продукти можуть попадати мікроорганізми, у тому числі й патогенні.

Бактеріальне забруднення рук й одягу визначають шляхом дослідження мікрофлори змивів. У змивах, які беруть перед початком роботи, як правило, визначають загальне бактеріальне обсіменіння і наявність кишкової палички. Чистоту рук оцінюють за кількістю мікроорганізмів в 1 мл змиву:

відмінно	1000;
добре	1000 – 5000;
задовільно	5000 – 10000;
погано	понад 10000.

Наявність бактерій групи кишкової палички у змивах з рук й одягу не допускається.

### 4.3. Дезинфекція у харчовій промисловості

*Дезинфекцією* (знезаражуванням) називається знищення в об'єктах зовнішнього середовища сапрофітних мікроорганізмів – шкідників цього виробництва, які викликають псування сировини, напівфабрикатів і готової продукції, а також патогенних мікроорганізмів – збудників харчових інфекцій і харчових отруєнь. Розрізняють поточну й екстрену дезинфекцію.

*Поточна, або профілактична* дезинфекція проводиться систематично відповідно до встановлених санітарних вимог для кожної галузі промисловості з метою попередження забруднення продуктів мікроорганізмами.

*Екстрена* дезинфекція проводиться за епідеміологічними показниками: при підозрі на харчове отруєння, у випадку інфекційних захворювань серед персоналу, при надходженні інфікованої сировини, напівфабрикатів, тари й т.ін.

За видом діючого агента методи дезинфекції бувають фізичні й хімічні.

До *фізичних* способів дезинфекції відносяться: кварцове й ультрафіолетове опромінення, ультразвук, дія високих температур (випалювання, прожарювання, кип'ятіння, ошпарювання посуду, тари й устаткування, обробка гострою парою).

До *хімічних* способів дезинфекції належить велика кількість хімічних речовин, що мають антимікробну дію.

*Вплив антимікробних хімічних речовин на мікроорганізми.* Хімічні речовини за характером дії бувають *мікробоцидними* (викликають загибель мікроорганізмів) і *мікробостатичними* (припиняють ріст мікроорганізмів, але після видалення цієї речовини їхній ріст знову відновляється). Характер дії залежить від дози речовини, часу її впливу, температури й рН. Малі дози антимікробних речовин часто стимулюють розвиток мікроорганізмів. З підвищенням температури токсичність багатьох антимікробних речовин, як правило, зростає. Температура впливає не тільки на активність самої хімічної речовини, але й на мікроорганізми. При температурах, що перевищують максимальну для такого мікроорганізму,

навіть невеликі дози антимікробних речовин викликають їхню загибель. Аналогічну дію має і рН середовища.

До різних антимікробних речовин той самий мікроорганізм проявляє різний ступінь стійкості. У той же час та сама речовина може мати неоднакову дію на різні види мікроорганізмів: одні мікроби можуть відразу загинути, інші припиняють розвиток, а деякі взагалі реагують. Це залежить від наявності спор і капсул, стійких до хімічних речовин. Антимікробні речовини значно сильніше діють на вегетативні клітини, ніж на спори.

З неорганічних речовин сильною антимікробною дією володіють солі важких металів (ртуті, міді, срібла), окислювачі (хлор, озон, йод, пероксид водню, хлорне вапно, перманганат калію), луги й кислоти (їдкий натр, сірчиста, фтористоводнева, борна кислоти), деякі гази (сірководень, оксид вуглецю, сірчистий, вуглекислий газ).

Речовини органічної природи (спирти, феноли, альдегіди, особливо формальдегід) мають згубну дію на мікроорганізми. Механізм згубної дії антимікробних речовин різний і залежить від їхньої хімічної природи. Наприклад, спирти, ефіри розчиняють ліпіди ЦПМ, внаслідок чого вони легко проникають у клітину й порушують її нормальну життєдіяльність. Солі важких металів, формалін викликають швидку коагуляцію білків цитоплазми, феноли, хлор, озон – інактивацію ферментів, кислоти й луги – гідроліз білків.

Антимікробні хімічні речовини використовуються як дезінфікуючі засоби й антисептики.

*Дезінфікуючі* речовини викликають швидку (протягом декількох хвилин) загибель бактерій, вони активні в середовищах, бідних органічними речовинами, знищують не тільки вегетативні клітини, але й спори. Вони не викликають появи стійких форм мікроорганізмів.

*Антисептики*, на відміну від дезинфектантів, проявляють мікробоцидну дію через 3 год. і більше. Найбільша активність проявляється в середовищах, що містять органічні речовини. Антисептики знищують тільки вегетативні клітини й викликають утворення стійких форм мікроорганізмів.

Такі антимікробні речовини, як феноли, хлорамін, формалін, у більших концентраціях 2–5 % є дезінфектантами, але їх же розчини, розведені в 100–1000 разів, можуть бути використані як антисептики. Багато антисептиків використовують як консерванти харчових продуктів (сірчиста, бензойна й інші кислоти)

Дезінфікуючі речовини в харчовій промисловості використовуються, як правило, для обробки робочих поверхонь апаратів й іншого технологічного устаткування, інвентарю, тари, посуду й приміщень. У харчовій промисловості можна застосовувати лише такі препарати, які не мають токсичної дії на організм людини, не мають запаху й смаку. Крім того, вони повинні мати антимікробну дію при мінімальній концентрації, розчинятися у воді й бути ефективними при невеликих термінах дії. Велике значення має також їхня стійкість при зберіганні. Препарати не повинні робити руйнуючою дію на матеріал устаткування, повинні бути дешеві й зручні для транспортування.

*Для обробки устаткування на підприємствах харчової промисловості в основному застосовуються хлорвмісні дезінфікуючі речовини, дія яких обумовлена виділенням активного хлору. Як правило для дезінфекції застосовують розчини, що містять 150–200 мг активного хлору в 1 л. Тривалість обробки устаткування повинна бути не менше 15 хв. До неорганічних хлорвмісних дезінфікуючих речовин належать: хлорне вапно, антиформин (суміш хлорного вапна, кальцинованої й каустичної соди), гіпохлорит натрію; до органічних – хлорамін Б, синтетичні препарати (дихлордиметилгідантоїн) і складні комбінації хлорактивних сполук із поверхнево-активними речовинами (наприклад, сульфохлорантин, що має одночасно змочувальну, миючу і високу антимікробну дію). Як дезінфектанти застосовують також формалін (водяний розчин формальдегіду), вапняне молоко, кальциновану й каустичну соду.*

Високою антимікробною активністю в малих дозах володіють органічні синтетичні дезінфектанти – так звані четвертинні амонієві сполуки. Їхня перевага перед існуючими антимікробними засобами полягає в тім, що вони добре розчинні у воді, не мають запаху, смаку, не викликають корозії металів, не подразнюють шкіру рук персоналу. До них відносяться, зокрема, катамін-АБ, катамін-П. Ці сполуки не токсичні для організму

людини, тому в невеликих дозах (0,001-0,005 %) їх застосовують для антисептування сировини, наприклад, меласи, а також пивоварного й іншого видів харчового устаткування.

Сильну бактерицидну дію мають багато газоподібних речовин (формальдегід, сірчистий ангідрид, оксид етилену).

При застосуванні дезінфектантів у процесі обробки устаткування необхідно дотримувати загальних правил: застосовувати їх тільки після ретельного механічного миття устаткування; розчини дезінфектантів повинні бути щойно приготовленими; після дезінфекції все оброблене устаткування й комунікації потрібно ретельно промити до повного видалення дезінфектанту.

*Питну воду*, а також воду промислового призначення знезаражують різноманітними шляхами – за допомогою сильних окислювачів (велику кількість води – хлором, малу – сполуками хлору, йодом, іонами важких металів), шляхом озонування, опромінення ультрафіолетовими променями, обробки гамма-випромінюванням, ультразвуком.

*Для дезінфекції повітря* найчастіше застосовують хлорвмісні препарати й триетиленгліколь у вигляді їхніх випарів або аерозолів. Зазначені дезінфектанти знижують загальну кількість мікроорганізмів у повітрі більш ніж на 90 %. Добрі результати для знезараження повітря виробничих цехів і холодильних камер дає озонування й ультрафіолетове опромінення. Періодичне застосування фізичних (вентиляція, фільтрування) і хімічних способів дезінфекції, очищення й знезараження повітря й сполучення їх з вологим збиранням приміщень дозволяє значно понизити бактеріальне обсіменіння повітря виробничих і побутових приміщень.

## ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. На які групи діляться біохімічні процеси, що використовуються в харчових технологіях, залежно від виду субстрату?
2. Назвіть фактори, що впливають на хід спиртового бродіння.
3. Назвіть основні методи одержання спиртового оцту. Який загальний принцип, покладений в основу цих методів?

4. Опишіть механізм процесу гниття в аеробних й анаеробних умовах.
5. У чому полягає специфічність дії патогенних мікробів?
6. Які мікроорганізми відносяться до санітарно-показових? Яка їхня роль в оцінці забруднення об'єктів зовнішнього середовища?
7. Які завдання мікробіологічного й санітарно-гігієнічного контролю в харчовій промисловості?
8. Які мікробіологічні показники використовуються для оцінки санітарно-гігієнічного стану об'єктів контролю на харчових підприємствах?
9. Які існують види дезинфекції в харчовій промисловості?
10. У чому відмінність між мікробоцидною і мікробостатичною дією антимікробних речовин на мікроорганізми?

## РОЗДІЛ 5. МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА МІКРОБНОЇ БІОМАСИ

### 5.1. Мікробіологія та біохімія дріжджового виробництва

#### 5.1.1. Історія використання мікроорганізмів для одержання харчового білка

Структура харчування людства в цілому, у тому числі населення нашої країни, далеко неідеальна, причому найбільш дефіцитним компонентом їжі є білок, особливо білок високої поживної цінності.

Крупнотоннажне мікробіологічне виробництво білка дозволяє розширити і якісно поліпшити харчову базу, одержати найбільш високоякісні білкові продукти з найменшими витратами ресурсів, з мінімальним збитком для середовища, що оточує людину. Мікроорганізми синтезують білок у 100 000 разів швидше, ніж корова. При цьому корова повертає нам у вигляді м'яса приблизно десяту частину поживних речовин, споживаних нею у вигляді рослинного корму; 90 % корму корови для харчування людей пропадає. У мікроорганізмів майже вся маса поживних речовин перетворюється в білки, цукри й жири, придатні для використання людиною.

Як промисловий процес мікробіологічне виробництво білка не вимагає посівних площ, не залежить від кліматичних і погодних умов, піддається точному плануванню й високому рівню автоматизації, дозволяє одержувати продукцію стандартної якості.

Продукти мікробіологічного синтезу можна назвати новими видами їжі. Зокрема, дріжджі є цінним джерелом вітамінів групи В, містять рибофлавін, фолієву кислоту, ергостерин, що при опроміненні ультрафіолетовими променями перетворюється у вітамін Д. Уперше використати пивні дріжджі як білкові компоненти їжі було запропоновано в 90-і роки XIX ст.

Сучасна історія мікробіологічного виробництва білка почалася в Німеччині під час Першої світової війни, де з цією метою використовувалися хлібопекарські дріжджі. Були розроблені рецептури додавання вирощених на меласі дріжджів у різні продукти. Це дозволило врятувати від

голодної смерті тисячі людей. У 1915 р. потужність німецьких установок з виробництва дріжджів була доведена до 10 тис. т, але в 1916 р. випуск дріжджів припинили через нестачу меласи.

Під час Другої світової війни в Німеччині дріжджі харчового призначення вирощували на гідролізатах деревини. В 1944 р. потужність виробництва харчових дріжджів склала 15 тис. т. Колоніальний уряд Великобританії – союзника СРСР у Другій світовій війні – побудувало на Ямайці завод харчових дріжджів, завдяки чому наша країна також одержувала в цей час дріжджі для харчування людей.

Із самого початку промислового вирощування дріжджів робилися численні спроби здійснити їх напівбезперервне або безперервне виробництво. Починаючи з 30-х років минулого століття виробництво дріжджів здійснюється за безперервним методом, а як єдине джерело сировини використовується меласа.

Хлібопекарські дріжджі застосовують у мікробіологічній промисловості як сировину для одержання вітаміну Д і готування живильних середовищ, у медичній промисловості – для готування ліків.

### *5.1.2. Основні стадії технологічного процесу*

Основне завдання дріжджового виробництва полягає в одержанні дріжджів для хлібопекарської промисловості. Вміщений у дріжджах комплекс ферментів викликає в тісті спиртове бродіння; діоксид вуглецю, що виділяється при цьому, піднімає й розпушує тісто.

Клітини дріжджів у процесі росту й розмноження споживають поживні речовини з культурального середовища й синтезують із них клітинну речовину. Частина поживних речовин, в основному цукрів, витрачається дріжджами на одержання енергії, необхідної для процесів синтезу.

У процесі росту й розмноження дріжджові клітини інтенсивно споживають кисень, для поповнення запасів якого в середовище безупинно подають повітря. При нестачі розчиненого кисню дріжджі переходять на менш економічний спосіб добування енергії – анаеробний. Вони починають розкладати цукри середовища з утворенням етилового спирту й діоксиду вуглецю (спиртове бродіння); при цьому ріст клітин значно сповільнюється.

Дріжджові заводи роблять пресовані й сухі дріжджі. Пресовані дріжджі – це брикети світло-сірого або світло-жовтого кольору із вмістом вологи 73–75 %, що представляють собою біомасу дріжджових клітин, в 1 г якої утримується від 8 до 12 млрд клітин.

Сухі дріжджі являють собою дрібну крупку (гранули) або «вермішель», що містять 8–10 % вологи.

Сировиною у виробництві хлібопекарських дріжджів є бурякова меласа (відходи цукробурякового виробництва), мінеральні солі, активатори росту, вода.

Технологічний процес дріжджового виробництва (рис. 5.1) складається з декількох стадій: підготовка живильного середовища, вирощування засівних дріжджів, вирощування товарних дріжджів, виділення, пресування й упакування пресованих дріжджів або сушіння з наступним упакуванням сушених дріжджів.

Перед вирощуванням дріжджів меласу спочатку розбавляють водою, а потім освітлюють, у процесі чого вона звільняється від більшої частини колоїдних часток, які можуть обволікати дріжджові клітини й заважати їхньому розвитку, солей кальцію, а також від сторонніх мікроорганізмів.

Потім меласу підкисляють сірчаною кислотою (до рН 4,5–5), додають азот- і фосфорвмісні солі (сульфат амонію, діамоній фосфат), а також стимулятори росту клітин – кукурудзяний екстракт або витяжку із солодових паростків – у яких міститься біотин, оскільки вміст всіх цих речовин у меласі недостатній для активного розмноження дріжджів. Отримана суміш називається меласним суслем.

Для готування засівних (маткових) дріжджів використовують чисту культуру спеціальних рас (штамів) хлібопекарських дріжджів, що спочатку вирощують у лабораторних умовах, починаючи із пробірки, потім – у напіввиробничих умовах – у відділенні чистої культури, поступово збільшуючи її об'єм. У результаті одержують дріжджі, що називаються чистою культурою (ЧК), або матковими дріжджами А. Процес розмноження чистої культури ведуть при температурі 25–30 °С, живильне середовище підкислюють до рН 4,8–5,8.

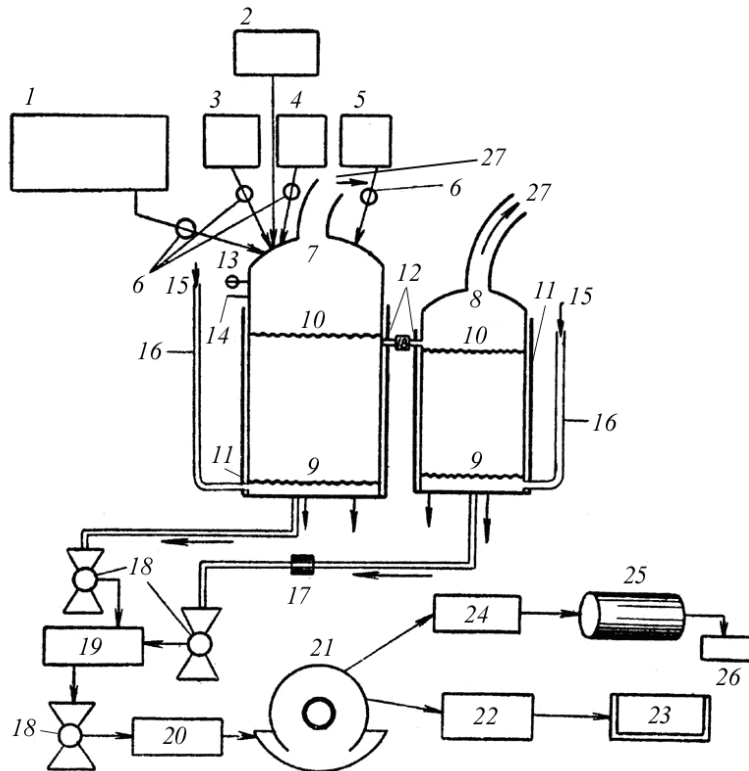


Рисунок 5.1 – Схема виробництва хлібопекарських дріжджів:

1 – меласне сусло; 2 – засівні дріжджі; 3, 4, 5 – поживні солі, біотин; 6 – дозатори, 7 – дріжджоростильний апарат (основний); 8 – доброджувач; 9 – повітродозподільні системи, 10 – рівень рідини, 11 – водяна сорочка; 12 – вихід води; 13 – подача води в апарат, 14 – подача піногасника, 15 – подача повітря, 16 – подача пари, 17 – витратомір, 18 – сепаратори, 19, 20 – збірники для дріжджового концентрату, 21 – вакуум-фільтр, 22 – формування й упакування пресованих дріжджів, 23 – холодильна камера, 24 – дріжджеформовочна машина; 25 – сушарка, 26 – охолодження й упакування сушених дріжджів, 27 – відвід відпрацьованого повітря

Живильне середовище безупинно аерується повітроприпливним способом, тому що тільки при доступі кисню дріжджі використовують цукри меласи не на спиртове бродіння, а на енергійне розмноження й нагромадження значної біомаси фізіологічно активних, життєздатних дріжджових клітин.

Дріжджі ЧК служать засівним матеріалом для готування природно чистої культури (ПЧК), або маткових дріжджів Б. Дріжджі ПЧК використовують як маткові для одержання товарних дріжджів.

Вирощування товарних дріжджів здійснюють у дріжджоростильних апаратах. Є різні технологічні схеми (періодична, напівбезперервна й безперервна) для одержання товарних пресованих дріжджів (дріжджі В). Головний напрямок у сучасній технології – вирощування дріжджів на концентрованих середовищах, що містять 5–6 % цукру. Це поліпшує якість дріжджів і підвищує продуктивність дріжджоростильних апаратів.

Щоб забезпечити нормальне розмноження дріжджів, середовище аерують більшою кількістю повітря (100–120 м<sup>3</sup>/г повітря на 1 м<sup>3</sup> середовища). Після накопичення в апараті певної кількості дріжджових клітин і заповнення його на повну корисну ємкість (через 6–7 годин після початку процесу) починається відтік середовища разом із дріжджами в сусідні апарати – доброджувачі. Після закінчення процесу вирощування дріжджів культуральну рідину сепарують, одержують дріжджове молоко, що містить 500–600 г/л дріжджів, і бражку. Дріжджове молоко надходить на промивання холодною водою для видалення залишків бражки, після чого дріжджі знову надходять на сепарування. Промивання й сепарування повторюють 2–3 рази, поки клітини дріжджів не будуть остаточно звільнені від бражки.

Промиті й відсепаровані дріжджі за допомогою насоса подаються у вакуум-фільтр, де вони пресуються, а далі формуються у вигляді брусків. Їх загортають у папір з етикеткою заводу, укладають у ящики й направляють у холодильні камери, де прохолоджують до 4 °С.

Сушені дріжджі одержують висушуванням пресованих дріжджів теплим повітрям до залишкового вмісту вологи 8–10 %. Для прискорення сушіння дріжджі спочатку подрібнюють у спеціальній дріжджоформувальній машині до одержання короткої тонкої «вермішелі» або гранул. Завдяки низькому вмісту вологи сушені дріжджі, на відміну від пресованих, можуть довго зберігатися. Сушіння до деякої міри гнітить дріжджі, тому застосовуються м'які температурні режими – (30–40) °С. Після сушіння продукцію охолоджують до 15–16 °С та упаковують.

### 5.1.3. Особливості культур дріжджів, використовуваних у виробництві

Для виробництва пресованих хлібопекарських дріжджів використовують різні раси дріжджів-цукроміцетів виду *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 5.2). За характером бродіння це верхівкові дріжджі; при бродінні вони довго не опускаються на дно й частково піднімаються на поверхню рідини, що бродить, у вигляді піни. Ці раси мають великі клітини, які швидко розмножуються у меласному живильному середовищі, стійкі при зберіганні в пресованому й сушеному вигляді, мають високу ферментативну (мальтазну і зимазну) активність.

*Мальтазна активність* – це час (у хв.), необхідний для виділення 10 мл CO<sub>2</sub> при зброджуванні 10–20 мл 5 %-го розчину мальтози при 30 °С дріжджами, узятими в кількості 2,5 % до об'єму середовища.



Рисунок 5.2 – Хлібопекарські дріжджі виду *Saccharomyces cerevisiae*

Мальтазна активність характеризує здатність дріжджів гідролізувати мальтозу борошна й залежить від присутності в дріжджах ферменту мальтази. Мальтоза – основний цукор тесту; вона зброджується дріжджами більш повільно, ніж інші цукри, тому що дріжджі містять порівняно мало мальтази. Мальтазна активність дріжджів високої якості повинна бути не більше 100 хв.

*Зимазна активність* – це час (у хв.), необхідний для виділення 10 мл CO<sub>2</sub> при зброджуванні 10–20 мл 5 %-го розчину глюкози при 30 °С дріжджами, узятими в кількості 2,5 % до об'єму середовища. Зимазна активність дріжджів високої якості повинна бути не більше 60 хв.

*Піднімальною силою* називається період часу (у хв), протягом якого тісто, замішане на випробуваних дріжджах, піднімається до певного рівня у формі. Для дріжджів високої якості цей показник повинен становити не більше 75 хв; рівень підйому тіста – 70 мм.

Виробничі раси, використовувані для одержання сушених дріжджів, крім перерахованих вище властивостей, повинні мати стійкість до висушування.

#### **5.1.4. Мікроорганізми – шкідники дріжджового виробництва**

Джерелами потрапляння сторонньої мікрофлори у виробництво дріжджів є сировина, мінеральні солі, ростові речовини (кукурудзяний екстракт, солодові паростки), засівні дріжджі, вода, повітря, технологічне устаткування. Розвиваючись разом із дріжджами, сторонні мікроорганізми несприятливо впливають на технологічний процес, знижують вихід та якість готової продукції.

Оскільки технологічне устаткування становить однаково небезпеку в мікробіологічному відношенні для різних харчових виробництв, і як джерело сторонньої мікрофлори було розглянуто раніше (розд. 4), то в цьому розділі розглядатися не буде.

**Мікрофлора меласи.** Вона дуже різноманітна й мінлива. В 1 м нормальної меласи міститься від 1000 до 10000 мікроорганізмів. Вони попадають у меласу з буряка, і в процесі виробництва цукру – з апаратури, води, повітря.

Натуральна меласа завдяки високому (близько 50 %) вмісту сахарози стійка при зберіганні, оскільки мікроорганізми перебувають у ній у недіяльному стані. При тривалому зберіганні у відповідних умовах у закритих сховищах кількість мікроорганізмів поступово зменшується внаслідок відмирання видів, менш стійких до осмотичного тиску. Однак, якщо в процесі зберігання меласи в неї потрапляють дощові води, то кількість мікроорганізмів у розведеному поверхневому шарі може різко зрости. З верхніх шарів мікроорганізми поширюються по всій товщі меласи, і в результаті їхньої життєдіяльності змінюється її хімічний склад (зменшується вміст цукру, накопичуються шкідливі продукти обміну речовин мікроорганізмів). При переробці сильно інфікованої меласи сторонні мікроорганізми можуть поширитися по всьому виробництву.

Мікрофлора меласи складається в основному з багатьох видів бактерій і недосконалих дріжджів. Найбільшу небезпеку для дріжджового виробництва представляють деякі групи мікроорганізмів, що виявляють не тільки в меласі, але й у готових пресованих дріжджах.

*Спороутворюючі бактерії* представлені в основному ґрунтовими бактеріями (сінна паличка *Bacillus subtilis*, *B. mycoides* й ін.). Вони відносяться до гнильних бактерій, можуть розмножуватися як в освітленій припливній меласі, так і разом із дріжджами в дріжджоростильних апаратах.

Спороутворюючі бактерії завдають значної шкоди виробництву, тому що в процесі життєдіяльності не тільки використовують цукор й інші поживні речовини середовища, але й відновлюють нітрати, що містяться у меласі, отруйні для дріжджів нітрити, малі дози яких затримують нормальне брунькування дріжджових клітин. У міру збільшення концентрації нітритів нагромадження біомаси дріжджів знижується на 40–50 %. Стійкість дріжджів при зберіганні під впливом нітритуотворюючих бактерій знижується, вони викликають розкладання дріжджових білків і розрідження пресованих дріжджів. Нітрити утворюються найчастіше при недостатній аерації середовища, тому поява нітритів у дріжджоростильних апаратах є непрямим показником недостатності аерації.

*Неспороносні гнильні бактерії* представлені багатьма представниками роду *Pseudomonas*, а також кишковою паличкою, мікрококами. Всі вони знижують вихід дріжджів та їхню якість, викликають розкладання білків дріжджів, що приводить до швидкого псування пресованих дріжджів (розрідження) і появи продуктів гниття, що неприємно пахнуть (сірководню, індолу, скатолу й ін.).

*Молочнокислі бактерії* завдають чималої шкоди дріжджовому виробництву. Оцтоутворюючі бактерії, зокрема *Leuconostoc mesenteroides*, згущають припливну меласу, що утрудняє її надходження в дріжджеростильні апарати. У дріжджоростильних апаратах іноді розвивається інший вид молочнокислих бактерій – *Leuconostoc agglutinans*. Він склеює (аглютинує) дріжджові клітини в грудки, які осідають на дно апаратів. При цьому розмноження дріжджів майже припиняється, а отже, знижується їхній вихід і погіршується товарний вигляд. Боротися із цими бактеріями

дуже важко, оскільки слизисті капсули обгороджують клітини від впливу температури й дезінфікуючих речовин. Пресовані дріжджі, вирощені в присутності лейконостока, мають грудкувату структуру. Піднімальна сила й мальтазна активність у них низька.

*Недосконалі дріжджі* зустрічаються поряд з бактеріальною мікрофлорою в меласі. В основному це дріжджі родів *Candida* й *Torulopsis* (рис. 5.3).

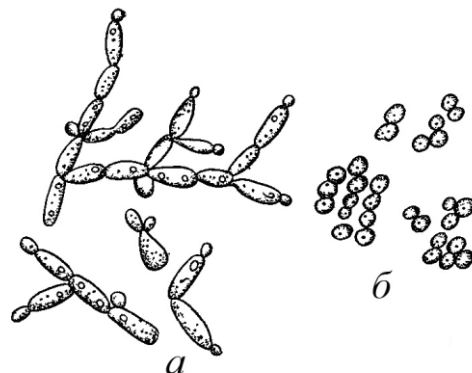


Рисунок 5.3 – Недосконалі дріжджі:  
а – рід *Candida*; б – рід *Torulopsis*

Вони попадають у меласу з води, повітря, апаратури. У дріжджоростильні апарати вони проникають із припливною меласою і розмножуються при тих же температурних умовах і значеннях рН, які сприятливі для виробничої культури дріжджів.

Швидкість росту й брунькування недосконалих дріжджів у кілька разів більше, ніж в основної культури хлібопекарських дріжджів.

Наявність у готовій продукції недосконалих дріжджів знижує стійкість пресованих дріжджів, погіршує їхню консистенцію, піднімальну силу й мальтазну активність, хоча іноді вихід дріжджів за рахунок біомаси недосконалих дріжджів збільшується.

**Мікрофлора мінеральних солей й активаторів росту.** Суперфосфат, діамоній фосфат, сульфат амонію, хлорид калію й сульфат магнію, як правило, не містять мікроорганізмів.

Однак при неправильному прийманні й зберіганні на заводі (вивантаження прямо на землю, відкрите зберігання в розсипах або в непристо-

сованих приміщеннях) може відбутися вторинне забруднення продуктів часточками ґрунту й, отже, мікроорганізмами. При використанні таких забруднених солей у виробничий процес можуть проникати спороутворюючі гнильні бактерії, сторонні дріжджоподібні гриби й ін.

*Кукурудзяний екстракт* містить спори міцеліальних грибів, спороутворюючі аеробні (сінна паличка) і анаеробні (маслянокислі бактерії), неспороутворюючі (сарцина, мікрококи). Іноді виявляються дріжджі.

***Мікрофлора води й повітря.*** Дріжджове виробництво характеризується великою витратою води. Вода використовується для розведення меласи, для промивання дріжджів після їхнього відділення від живильного середовища, для миття апаратури, регулювання температури в дріжджоростильних апаратах. Вода, що сильно засіяна мікроорганізмами, може стати серйозним джерелом інфекції на заводі, тому до води у виробництві дріжджів пред'являють ті ж вимоги, що й до питної. Вона повинна відповідати чинному держстандарту.

Для того щоб забезпечити енергійне розмноження й накопичення біомаси хлібопекарських дріжджів, необхідна величезна кількість по-вітря – від 10 до 80 тис. м<sup>3</sup>/ч (залежно від потужності заводу). В атмосферному повітрі перебуває значна кількість мікроорганізмів, і воно може стати додатковим джерелом проникнення у виробництво сторонньої мікрофлори. Особливу небезпеку представляють недосконалі дріжджі, наявні в повітрі, для яких умови вирощування хлібопекарських дріжджів дуже сприятливі. Тому повітря піддається фільтруванню.

Джерелами розвитку різних сторонніх бактерій і недосконалих дріжджів можуть стати апаратура й трубопроводи із залишками живильного середовища.

## **5.2. Мікробіологічний і санітарно-гігієнічний контроль дріжджового виробництва**

### ***5.2.1. Мікробіологічний контроль виробництва дріжджів***

Мікробіологічний контроль здійснюється шляхом мікроскопування проб на всіх стадіях виробництва хлібопекарських дріжджів, починаючи з контролю сировини, що надходить на переробку, і кінчаючи готовою продукцією.

**Контроль сировини.** Контроль мікробіологічної чистоти сировини має дуже велике значення, оскільки при інфікуванні процесу від сировини будуть заражені всі технологічні стадії й фактично вся продукція буде забракована.

*Меласа.* У ній визначають загальну кількість мікроорганізмів в 1 г, якісний (видовий) склад мікрофлори з метою виявлення мікроорганізмів – шкідників виробництва і їхнього процентного співвідношення, кількісного складу.

Загальна кількість мікроорганізмів в 1 г меласи доброї якості не повинна перевищувати 2000; нормальної якості – від 1000 до 10000; меласи, придатної для використання – від 10000 до 20000. Меласа вважається непридатною, якщо в 1 г міститься більше 20 000 мікроорганізмів.

Якщо вміст спороутворюючих гнильних бактерій у меласі становить 90 % від загальної кількості мікроорганізмів, її не слід використовувати у дріжджовому виробництві, тому що серед них можлива присутність нітритоутворюючих бактерій.

*Мінеральні солі й кукурудзяний екстракт.* При аналізі мінеральних солей шляхом мікроскопування допускається присутність одиничних клітин мікроорганізмів.

Для кукурудзяного екстракту допускається присутність від 500 до 10000 мікроорганізмів в 1 г. Більш засіяний екстракт може стати джерелом інфекції.

**Контроль дріжджів на основних стадіях вирощування.** Мікробіологічному контролю підлягають дріжджі на всіх стадіях розмноження. У вихідній чистій дводобовій культурі перед її розведенням визначають:

- однорідність дріжджових клітин – всі клітини повинні бути однієї застосовуваної раси дріжджів;
- чистоту культури – сторонніх дріжджів і бактерій не повинно бути;
- ферментативну активність (зимазну й мальтазну) – вона повинна відповідати показникам застосовуваної раси дріжджів.

На всіх стадіях вирощування дріжджів (стадія ЧК, стадія ПЧК і стадія товарних дріжджів) щогодини відбирають і мікроскопують проби. При цьому відзначають:

- кількість клітин, що брунькуються (у %) – повинно бути від 10 до 80 %;
- правильність брунькування, вміст мертвих клітин (%) – не повинен перевищувати декількох часток відсотка;
- присутність сторонніх дріжджів і бактерій – бактерії й сторонні дріжджі (нецукроміцети) повинні бути відсутні.

Наявність сторонньої мікрофлори свідчить про незадовільну якість дріжджів ЧК й ПЧК та їхню непридатність для використання як засівних.

На стадії виділення товарних дріжджів для обліку втрат дріжджів мікроскопують проби бражки й промивних вод із сепараторів і пресів. У бражці кількість дріжджових клітин повинна бути не більше 1–2. У воді, що відходить із пресів, дріжджових клітин бути не повинно.

**Контроль готової продукції.** У пресованих дріжджах ЧК й ПЧК визначають: вміст вологи, кислотність (рН), ферментативну активність (зизмазну, мальтазну піднімальну силу). Ці показники повинні відповідати державному стандарту.

Пресовані дріжджі мікроскопують для оцінки їхньої якості за величиною й однорідністю клітин цукроміцетів і з метою виявлення сторонньої мікрофлори. У випадку різкого погіршення піднімальної сили або стійкості готової продукції визначають ступінь її загального обсіменіння й присутність мікроорганізмів – шкідників виробництва. У доброякісних пресованих дріжджах допускається присутність кислотоутворюючих бактерій не більше 15–35 %, гнильних бактерій бути не повинно, сторонніх дріжджів – не більше 30 %.

**Показники якості пресованих і сушених хлібопекарських дріжджів.** Вони повинні задовольняти вимогам державного стандарту: мати світло-сірий або жовтувато-білий кольори, характерний «дріжджовий» запах, що злегка нагадує фруктовий, консистенція повинна бути щільною, дріжджі повинні легко ламатися й не мазатися.

Вміст вологи в пресованих дріжджах повинен бути не більше 75 %, зольність – не вище 2 %.

Основним показником якості хлібопекарських дріжджів є їхня піднімальна сила. Піднімальна сила повинна бути не більше 75 хв. Стійкість (до моменту розм'якшення бруска дріжджів) – не менше 48 год. при тем-

пературі зберігання 35 °С і 10 діб при температурі зберігання від 0 до 4 °С; мальтазна активність – 60–90 хв, зимазна – 50–60 хв.

У пресованих дріжджах, що надходять на сушіння, визначають вміст вологи й піднімальну силу, кількість недосконалих дріжджів. Бажано, щоб піднімальна сила була до 60 хв. Після сушіння в сушених дріжджах визначають вміст вологи, піднімальну силу, кислотність, а також оцінюють кольори, запах дріжджів і визначають кількість мертвих клітин.

Вміст вологи в сушених дріжджах повинен бути не вище 8–10 %, піднімальна сила – 70–90 хв, але не більше 110 хв. Кольори – коричнево-жовтий, запах – «дріжджовий». Тривалість зберігання в добре укупореній тарі від 5 до 12 міс.

### **5.2.2. Санітарно-гігієнічний режим виробництва дріжджів**

Все устаткування й інвентар дріжджового заводу повинні бути справними й утримуватися в чистоті.

*Баки-сховища для меласи* повинні бути надійно захищені від потрапляння атмосферних опадів. Перед завантаженням сировини сховища потрібно очистити від залишків старої меласи й промити миючими засобами. Якщо в сховищі перебувала сильно засіяна меласа, то необхідно провести дезінфекцію 3 %-м розчином хлорного вапна. У меласі, що зберігається, кількість мікроорганізмів у порівнянні з вихідною не повинна збільшуватися.

При переробці меласи з підвищеним обсіменінням або тієї, що містить небезпечні для виробництва мікроорганізми (наприклад, що утворюють нітрити), її піддають пастеризації або миттєвому нагріванню до температури 120 °С. Застосовують також добавку антибіотика біоміцину в кількості 5–10 мг на 1 м<sup>3</sup> меласного сула й антисептики (суміш молочної й борної кислот, фурацилін, катапін-П). Антисептики використовуються для боротьби з небажаною мікрофлорою в припливній меласі в поєднанні з її нагріванням до 85 °С.

*Мінеральні солі* повинні зберігатися в спеціальних приміщеннях, що виключають забруднення їх частками ґрунту й мікроорганізмами, які містяться в них.

*Кукурудзяний екстракт* необхідно зберігати в спеціальних закритих ємкостях, які перед завантаженням повинні бути ретельно очищені від залишків продукту, промиті водою й пропарені (при сильному забрудненні потрібно застосовувати дезінфікуючі засоби). Сильно інфікований екстракт перед використанням розбавляють водою у співвідношенні 1:1 і паром прогрівають до температури 90–95 °С.

*Дезинфекцію устаткування* проводять тільки після видалення з нього живильного середовища, дріжджів і ретельного миття. Як миючі засоби використовуються каустична й кальцинована сода, а як дезінфікуючі засоби для боротьби зі сторонніми мікроорганізмами – хлорне вапно, формалін, газоподібний формальдегід, гіпохлорид кальцію.

Після миття й дезинфекції устаткування (дріжджоростильні апарати й інші ємкості) ретельно промивають водою до повного видалення миючого засобу й дезинфектанту. Перевірку ефективності обробки роблять шляхом мікроскопування останньої змивної води.

*Дріжджоростильні апарати* очищають, промивають гарячою водою й дезінфікують 3 %-м розчином хлорного вапна, а після відмивання дезінфікуючого розчину пропарюють. Особливу увагу звертають на проведення обробки й дезинфекції повітророзподільної системи, у якій можуть зберегтися залишки живильного середовища й дріжджів, що спричиняють розвиток сторонніх мікроорганізмів. Вони можуть стати причиною забруднення й псування готової продукції. Повітророзподільну систему заповнюють розчином дезинфектанту на певний час, а потім ретельно промивають. Підведене у дріжджоростильні апарати повітря не повинно містити пил і мікроорганізми, здатні розмножуватися в апаратах (в основному недосконалі дріжджі й гнильні бактерії). Тому забір повітря роблять вище даху заводської будівлі, а для його очищення повинні бути встановлені фільтри, що затримують пил і мікроорганізми.

Дріжджові сепаратори, промивні чани, збірники для згущеного дріжджового концентрату, фільтр-преси, вакуум-фільтри необхідно регулярно (1 раз у зміну) піддавати чищенню й миттю. Особливо ретельно миють і дезінфікують сепаратори, призначені для виділення засівних дріжджів чистої культури (ЧК) і природно чистої культури (ПЧК).

Всі трубопроводи після закінчення роботи промивають холодною водою й пропарюють протягом 20-30 хв.

Не рідше одного разу на місяць або ж у випадку появи сторонньої мікрофлори в дріжджоростильних апаратах, а також перед готуванням маткових дріжджів трубопроводи заповнюють 1 %-м розчином каустичної соди або 2 %-м розчином антиформіну на 8–12 год. Потім розчини зливають, трубопроводи промивають водою й пропарюють.

Очищення й дезінфекцію бункерів для запасу дріжджів, що формуються, роблять щодня.

### ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. У чому переваги одержання харчового білка мікробіологічним способом у порівнянні із традиційним одержанням тваринного й рослинного білка?

2. Назвіть основні стадії виробництва хлібопекарських дріжджів.

3. Який вид дріжджів використовується як чиста культура у виробництві хлібопекарських дріжджів? Назвіть основні мікробіологічні характеристики цих дріжджів.

4. Назвіть джерела проникнення сторонньої мікрофлори у виробництво дріжджів.

5. Яке порушення технологічного режиму характеризує розвиток спороутворюючих бактерій у дріжджоростильному апараті?

6. Яку небезпеку для виробництва хлібопекарських дріжджів представляють молочнокислі бактерії й недосконалі дріжджі?

7. Який метод мікробіологічного контролю використовується у виробництві хлібопекарських дріжджів?

8. Які мікробіологічні показники визначають на стадіях вирощування дріжджів ЧК, ПЧК і стадії одержання товарних дріжджів?

9. Яким показникам якості повинні задовольняти готові пресовані й сушені дріжджі?

10. Який порядок проведення дезінфекції основного устаткування: дріжджоростильних апаратів, сепараторів, фільтр-пресів.

## РОЗДІЛ 6. МІКРОБІОЛОГІЧНІ І БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ ПРОДУКТІВ БРОДІННЯ

### 6.1. Мікробіологія й біохімія пивоварного виробництва

Пиво – слабоалкогольний напій – одержують шляхом збродження охмеленого сусла спеціальними расами дріжджів. Смак й аромат пива обумовлюють екстрактивні речовини, що містяться в ньому, витягнуті із зернопродуктів, гіркі й ароматичні речовини хмелю, а також спирт і диоксид вуглецю, що утворюються при бродінні сусла. Насиченість пива диоксидом вуглецю надає йому властивість добре вгамовувати спрагу.

У готовому продукті міститься близько 90 % води, 2,8–6 % спирту, приблизно 0,3 % диоксида вуглецю й 5–10 % екстрактивних речовин. Сировиною для виробництва пива служать ячмінь, хміль і вода, причому в пивоварному виробництві застосовують тільки спеціально виведені сорти ячменю.

#### 6.1.1. Сировина й основні стадії технологічного процесу

Технологія пива включає такі стадії: виробництво солоду, готування пивного сусла, бродіння пивного сусла, освітління й розлив пива. Принципову схему виробництва пива представлено на рис. 6.1.

Основною сировиною для готування пива є солод, який роблять із високоякісних пивоварних сортів ячменю. Для виробництва солоду ячмінь замочують, пророщують у певних умовах і сушать.

У процесі солодоростіння в зерні накопичуються активні амілолітичні й протеолітичні ферменти. Щойно пророслий солод сушать при підвищеній температурі для накопичення в ньому ароматичних речовин, що надають пиву характерні смак і запах.

У пивоварстві як сировина використовують і *несоложені* матеріали: ячмінь, кукурудзу, рис, глюкозний й ячмінний сиропи, крохмальну патоку, очеретяний цукор-сирець й ін.

Приготування сусла є складною технологічною стадією. Дроблений солод змішують із теплою водою; при цьому відбувається ферментативне розщеплення крохмалю, білків й інших речовин, а також екстрагування

розчинних речовин водою. Готування сусла роблять у кілька етапів, регулюючи температуру й створюючи кращі умови для дії амілолітичних і протеолітичних ферментів. Під їхньою дією близько 75 % сухої речовини солоду переходить у розчин.



Рисунок 6.1 – Схема виробництва пива

У випадку використання несоложеної сировини у пивоварстві на стадії варіння сусла вносяться ферментні препарати мікробного походження.

Відфільтроване пивне сусло кип'ятять із хмелем. При цьому відбувається коагуляція білків, інактивація ферментів, стерилізація сусла, а також охмеління сусла – екстрагування із хмелю гірких й ароматичних речовин, які мають бактерицидну дію.

Спиртове бродіння цукрів сусла під дією ферментів дріжджів – основний процес у технології пива, він підрозділяється на дві стадії: головне бродіння й доброджування.

*Головне бродіння* протікає в бродильних чанах або танках. Залежно від виду застосовуваних дріжджів бродіння може бути *низовим*, що протікає при температурі 6–10 °С, і *верхівковим*, що протікає при 14–25 °С. Найпоширенішим є низове бродіння.

Головне бродіння проводять при атмосферному тиску; тривалість процесу – 7–10 діб. У результаті одержують молоде пиво – напій зі своєрідним смаком й ароматом, що містить невелику кількість дріжджів. Основна маса дріжджів осідає наприкінці головного бродіння на дно посудини.

*Доброджування* й дозрівання молодого пива протікає в герметично закритих апаратах при зниженій температурі 0–2 °С під надлишковим тиском 0,03–0,07 МПа протягом 21–90 діб.

При доброджуванні й дозріванні в молодому пиві відбуваються складні біохімічні й фізико-хімічні процеси, у результаті яких пиво набуває своїх товарних властивостей. Готове пиво освітлюють сепаруванням або фільтруванням, прохолоджують, додатково насичують діоксидом вуглецю й розливають у тару.

Останнім часом застосовується технологія бродіння сусла й доброджування молодого пива в одному вертикальному апараті – циліндроколічному танку (ЦКТ). Система охолодження й гарна теплова ізоляція дають можливість регулювати заданий температурний режим під час процесу й скоротити тривалість циклу бродіння й доброджування в ЦКТ у два рази.

Крім того, розроблені різні способи бродіння сусла й доброджування молодого пива в безперервному потоці, що дозволяють також скоротити тривалість цих технологічних стадій.

### **6.1. 2. Характеристика виробничих дріжджів**

Для виробництва пива використовуються спеціальні раси дріжджів-цукроміцетів, що належать до видів *Saccharomyces carlsbergensis* (дріжджі низового бродіння) і *Saccharomyces cerevisiae* (дріжджі верхівкового бродіння). Дріжджі низового бродіння широко використовуються в пивоварстві для готування стандартного й сортового пива. Для темних і спеціальних сортів пива застосовують дріжджі верхівкового бродіння.

У пивоварстві використовують чисті культури дріжджів, які розмножують (розводять) спочатку в лабораторії, а потім – у цеху в спеціальних апаратах. Процес розведення полягає в збільшенні маси дріжджів від однієї пробірки до маси, необхідної для внесення в бродильний апарат.

Дріжджі у виробництві пива використовують до 10–12 разів, причому після кожного циклу бродіння їхній вік (генерація) збільшується. Такі виробничі (насінні) дріжджі перед повторним використанням спеціально підготовляють (промивають й активують).

Дріжджі, застосовувані в пивоварстві, прийнято називати культурними, оскільки вони мають особливі ознаки, набуті в результаті тривалого розведення (культивування) у певних технологічних умовах. Для одержання високоякісного пива дріжджі повинні мати такі властивості:

- висока бродильна активність; дріжджі активно зброджують глюкозу й фруктозу, повільніше – мальтозу й ще повільніше – трисахарид мальтотріозу. Декстрини не зброджуються, але відіграють важливу роль у створенні повноти й смаку пива;
- флокуляційна здатність - повільно й повно осідати на дно бродильних апаратів;
- помірною здатність до розмноження;
- стійкість до несприятливих умов і до інфікування;
- стабільність морфологічних і фізіологічних властивостей і здатністю надавати пиву характерні смак й аромат.

*Бродильна активність* пивних дріжджів є найважливішою властивістю й залежить як від біологічних властивостей дріжджів, так і від зовнішніх умов. Бродильну активність визначають за ступенем зброджування сусла. *Ступінь зброджування*  $V$  (%) – це показник, що характеризує відношення маси збродженого екстракту ( $E - e$ ) до маси сухої речовини в початковому суслі  $E$

$$V = (E - e) 100 / E,$$

де  $e$  – вміст у пиві екстрактивних речовин, % до маси пива.

За ступенем зброджування дріжджі ділять на сильно- або високозброджуючі (ступінь зброджування 90–100 %), середнезброджуючі (ступінь зброджування 80–90 %) і слабо- або низькозброджуючі (ступінь зброджування менше 80 %).

Ступінь зброджування залежить від здатності дріжджів використовувати вуглеводи сусла. Цукри, що зброджуються, становлять 70–80 % маси сусла. Вони зброджуються пивними дріжджами в певній послідовності, що зумовлено швидкістю їхнього проникнення в дріжджову клітину. У першу чергу дріжджі зброджують фруктозу й глюкозу, а потім – сахарозу, що попередньо гідролізується до глюкози й фруктози. Після цього дріжджі зброджують мальтозу, що також гідролізується до глюкози. Зброджування мальтотріози починається пізніше, ніж зброджування мальтози. В основному мальтотріоза зброджується на стадії доброджування.

*Флокуляційна здатність* – це властивість дріжджів осідати наприкінці головного бродіння, що обумовлює посвітління молодого пива й готового пива наприкінці доброджування. Здатність дріжджів до флокуляції обумовлена будовою клітинної стінки. На флокуляційну здатність впливають і зовнішні фактори (склад сусла, температура, аерація й ін.). Затримує флокуляцію підвищення концентрації в суслі цукрів, що зброджуються, особливо мальтози. Сприяє флокуляції низька температура бродіння й присутність солей кальцію.

Флокулюють дріжджі як низового, так і верхівкового бродіння, однак характер флокуляції різний. Розходження у флокуляційних властивостях дріжджів лежить в основі їхнього розподілу на пластівчасті й пиллоподібні.

*Пластівчасті* дріжджі низового бродіння наприкінці головного бродіння злипаються в грудки (пластівці, флокули) і осідають на дно, утворюючи осад. У дріжджів верхівкового бродіння пластівці піднімаються на поверхню, утворюючи «шапку». *Пилоподібні* дріжджі протягом усього процесу бродіння залишаються у зваженому стані.

*Здатність дріжджів до розмноження* має дуже важливе значення в пивоварстві. У процесі бродіння біомаса дріжджів збільшується, як правило, в 3–4 рази. Активне розмноження дріжджів небажано, тому що воно приводить до швидкої витрати екстракту сусла й до утворення у великих кількостях побічних продуктів.

У зв'язку з тим, що у виробництві пива дріжджі використовують неодноразово, вони повинні характеризуватися *стабільністю морфологічних і фізіологічних властивостей*. Особливо це стосується таких важливих властивостей, як життєздатність, бродильна активність і флокуляційна здатність. У виробничих дріжджів регулярно перевіряють морфологію клітин, вміст мертвих клітин, наявність глікогену, здатність до розмноження, бродіння й осідання.

*Стійкість дріжджів до несприятливих умов* – нестачі поживних речовин, підвищення температури, зміни кислотності, інфікування сторонніми, шкідливими для пива мікроорганізмами – повинна бути високою.

Пивні дріжджі в процесі спиртового бродіння здатні накопичувати в суслі велику кількість продуктів, у результаті чого утворюється специфічний харчовий продукт, що володіє приємними ароматичними й смаковими властивостями. Крім етилового спирту й діоксиду вуглецю (основних продуктів бродіння), найбільш важливим у кількісному і якісному відношенні є утворення альдегідів, органічних кислот, ефірів, вищих спиртів, які визначають смак й аромат пива.

Виробництво пива ведеться у нестерильних умовах, тому окремі стадії технологічного процесу інфікуються різними мікроорганізмами, що викликають псування готової продукції.

### **6.1.3. Мікроорганізми – шкідники пивоварного виробництва**

Сторонні мікроорганізми, розвиваючись у суслі й пиві, приводять до появи запаху й смаку, невластивих для пива, і до зниження його якості.

Природна стійкість сусла, що бродить, до впливу мікроорганізмів обумовлена особливостями його хімічного складу й фізико-хімічного стану. Хмелеві смоли й низьке значення рН мають бактерицидну дію на деякі мікроорганізми. Нестача кисню, надлишковий тиск діоксиду вуглецю, присутність спирту, низька температура й інші фактори гальмують розвиток багатьох мікроорганізмів-шкідників. Однак деякі мікроби, проникаючи в пиво, насичене CO<sub>2</sub>, можуть розвиватися в ньому, викликаючи зміни органолептичних властивостей, утворюючи каламуть і підвищуючи кислотність.

Сторонні мікроорганізми можуть попадати в пивоварне виробництво з повітря, води, сировини, виробничих культур, дріжджів, устаткування, тари й від персоналу. У цьому розділі не буде розглядатися мікрофлора устаткування, води, повітря, тари, оскільки їхня небезпека в мікробіологічному відношенні однакова для всіх харчових виробництв і була розглянута раніше (розд. 4).

**Мікрофлора сировини.** Основною сировиною для виробництва пива є солод, якість якого залежить від якості ячменю. На поверхні й під оболонкою ячменю виявляються як бактерії, так і міцеліальні гриби. Загальна кількість мікроорганізмів, головним чином бактерій, становить десятки й сотні тисяч клітин в 1 г свіжезібраного доброякісного зерна. Міцеліальні гриби становлять 1–2 % від загальної кількості мікроорганізмів.

У процесі виробництва солоду гриби інтенсивно розвиваються, споживають поживні речовини й виробляють продукти, що негативно впливають на властивості солоду: він темніє, знижується його ферментативна активність, що робить важчим процес оцукрювання. Якість сусла й пива, отриманих з такого солоду, значно погіршується. Пиво набуває стороннього присмаку й аромату, містить токсини й має тенденцію до фонтанування, тобто надмірного піноутворення.

При зберіганні ячменю, особливо в несприятливих умовах (при підвищеній вологості й температурі), відбувається кількісна і якісна зміна мікрофлори, спостерігається інтенсивний розвиток міцеліальних грибів.

Джерелом мікроорганізмів є й інша сировина, використовувана в пивоварстві: ячмінь, хміль, кукурудза, рис, цукор й ін.

**Виробничі (насінні) дріжджі** при їх недостатній біологічній чистоті можуть служити небезпечним джерелом інфекції. При повторному застосуванні дріжджів з кожною наступною генерацією їхній біологічний стан, як правило, погіршується, тому що на поверхні клітин дріжджів адсорбуються клітини сторонніх мікроорганізмів (бактерій і диких дріжджів).

Бактерії, що інфікують виробничі дріжджі, представлені в основному молочнокислими бактеріями й бактеріями кишкової групи. Крім того, у значних кількостях виявляються оцтовокислі бактерії.

**Мікроорганізми, що інфікують пиво.** Важливим показником якості пива є *біологічна стійкість* – його здатність протистояти помутнінню, причиною якого є розвиток мікроорганізмів. Псування пива можуть викликати культурні пивні дріжджі, що залишилися в невеликих кількостях у результаті неякісного сепарування або фільтрування. При розвитку в готовому пиві вони утворюють пухкий осад на дні пляшки, надають пиву дріжджового присмаку і псують його товарний вигляд.

Більш небезпечними для якості пива є сторонні мікроорганізми. Вони викликають помутніння пива, підвищують кислотність, змінюють аромат і смак, роблячи його непридатним до вживання. Сторонні мікроорганізми, що розвиваються в пиві, належать до бактерій і дріжджів. Це в основному спирто- і кислотостійкі мікроорганізми, нечутливі до антисептичної дії хмелю.

Основними шкідниками пивоварного виробництва є молочнокислі, оцтовокислі бактерії, бактерії кишкової групи, дикі дріжджі й ін.

*Молочнокислі бактерії, що зустрічаються у пиві, відносяться до родів *Lactobacillus* й *Pediococcus*. Вони викликають помутніння, утворюючи «шовковисту каламуть», підвищують кислотність пива, зброджуючи цукри в основному в молочну кислоту.*

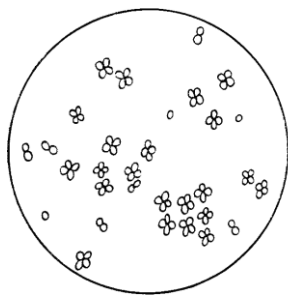


Рисунок 6.2 – Бактерії роду *Pediococcus*

Кокоподібні бактерії роду *Pediococcus* (сарцини) (рис. 6.2), викликають так зване «сарцинне захворювання» пива. Пиво набуває неприємного смаку і медового запаху. Найнебезпечнішим серед педіококів є вид *P. serevisiae*, що утворює велику кількість молочної кислоти, викликаючи швидке прокисання пива.

Оцтовокислі бактерії родів *Acetobacter* й *Acetomonas* також зустрічаються у пивоварному виробництві. Бактерії роду *Acetomonas* окисляють спирт тільки до оцтової кислоти, а бактерії роду *Acetobacter* – до  $\text{CO}_2$  і води.

У пиві оцтовокислі бактерії починають розмножуватися навіть при низькому вмісті кисню. Сприяють їхньому розвитку неповне наливання пляшок і бочок, нещільне укупування. Оцтовокислі бактерії поряд з молочнокислими є найбільш частою причиною зміни кислотності й смаку пива, помутніння й появи плівки на поверхні пива в пляшці.

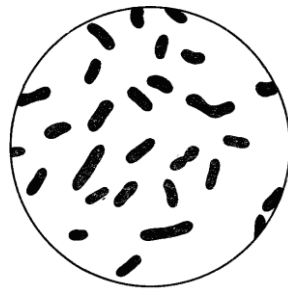


Рисунок 6.3– Бактерія роду *Zymomonas*

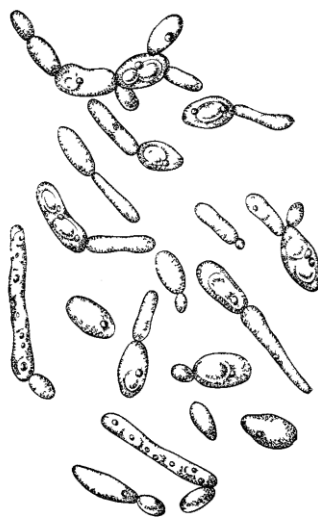


Рисунок 6.4 – Дріжджі роду *Brettanomyces*

*Бактерія Zymomonas anaerobia* (рис. 6.3) також розвивається у суслі, утворюючи спирт, органічні кислоти, ацетальдегід і CO<sub>2</sub>. Ця бактерія може зіпсувати пиво протягом декількох годин.

*Бактерії кишкової групи* дуже швидко розвиваються у суслі й утворюють велику кількість продуктів, що впливають на смак й аромат пива. Пиво стає солодкуватим із фруктовим присмаком або набуває запаху вареної капусти; іноді утворюється сірководень. Наявність бактерій кишкової групи є показником санітарного стану заводу.

*Дикі дріжджі.* У пивоварному виробництві зустрічаються дріжджі, які можуть викликати істотні зміни біохімічних й органолептичних властивостей пива. Їх називають *дикими*. При розвитку диких дріжджів утворюються вищі спирти, ефіри летучих кислот, гіркі речовини, що надають суслу й пиву сторонній запах (фруктово–ефірний, лікарський й ін.), неприємні гіркоту й смак та спричиняють сильне помутніння, утворення осаду.

Серед дріжджів-шкідників зустрічаються справжні дріжджі-цукроміцети, що відрізняються за фізіологічними ознаками від культурних пивних дріжджів. До них відносяться дріжджі родів: *Saccharomyces*, *Brettanomyces* (рис. 6.4), *Torulopsis*. Рідше зустрічаються неспороутворюючі дріжджі родів *Pichia*, *Candida* й ін.

Дикі дріжджі, як правило, зустрічаються в менших кількостях, ніж бактерії.

## **6.2. Мікробіологічний і санітарно-гігієнічний контроль пивоварного виробництва**

### **6.2.1. Мікробіологічний контроль виробництва пива**

Мікробіологічний контроль здійснюється на всіх технологічних стадіях і включає контроль дріжджів, сусла, молодого пива, готового пива.

У пивоварному виробництві визначається загальна кількість мікроорганізмів і бактерій кишкової групи.

**Контроль пивних дріжджів.** При виробництві пива однією із найвідповідальніших технологічних стадій є підготовка пивних дріжджів до

бродіння. Стан дріжджової культури не тільки визначає якість пива, але й лімітує швидкість головного бродіння.

Пивні дріжджі з апарата для розведення чистої культури перед подачею в цех бродіння аналізують на присутність у них сторонніх мікроорганізмів і мертвих клітин дріжджів. Якщо аналіз показує наявність сторонніх мікроорганізмів, то розводять нову чисту культуру із пробірки.

Виробничі (насінні) дріжджі досліджують щодня з кожної ванночки: перевіряють морфологію клітин, вміст мертвих клітин, визначають присутність сторонніх мікроорганізмів. У виробничих дріжджах, використуваних кілька разів, кількість мертвих клітин дріжджів не повинна перевищувати 5%, а кількість бактерій – 0,5% від загальної кількості клітин дріжджів. Присутність диких дріжджів неприпустима. Якщо насінні дріжджі не відповідають зазначеним показникам, то вони підлягають антисептичній обробці персульфатом амонію.

**Контроль сусла.** Сусло відразу після кип'ятіння із хмелем зазвичай стерильне, і його інфікування відбувається при охолодженні. На аналіз відбирають проби сусла з апаратів для охолодження, комунікацій і бродильних ємкостей. Визначають стійкість сусла, загальне обсіменіння сусла мікроорганізмами, наявність кислотоутворюючих бактерій і колі-титр. Загальне обсіменіння сусла є критерієм при оцінці його біологічного стану, однак вирішальне значення має наявність бактерій, здатних розвиватися в готовому пиві.

**Контроль молодого пива.** Аналіз молодого пива проводять у випадку порушення нормального ходу головного бродіння з метою виявлення причин порушення. У цей час за 7 діб до закінчення доброджування, коли практично осіли всі дріжджі, відбирають проби пива й визначають його біологічну стійкість. Поява плівки, осаду, гнильного або кислого запаху через 2–3 доби свідчить про підвищене обсіменіння сусла сторонніми мікроорганізмами й про незадовільну санітарну обробку танків. Такий аналіз допомагає прогнозувати якість готового пива.

**Контроль готового пива.** Готове пиво перевіряють на біологічну стійкість і визначають загальну кількість мікроорганізмів і наявність бактерій кишкової групи. Біологічна стійкість кожного сорту пива характеризується часом (у добах), протягом якого не відбувається розвиток у

ньому мікрофлори. Якщо стійкість нижче, ніж передбачена стандартами, то необхідно визначити загальну кількість мікроорганізмів у готовому пиві. В 1 мл пива не повинно бути більше 100 клітин сторонніх мікроорганізмів.

Не рідше одного разу на місяць у кожному сорті пива визначають бактерії кишкової групи – їхня присутність неприпустима.

**Контроль води й матеріалів.** Об'єктами мікробіологічного контролю пивоварного виробництва, як і всіх інших харчових виробництв, є змивні води, фільтрувальні матеріали, тара, укупорний матеріал. Проби відбирають із апаратури для охолодження суслу, бродильних ємкостей, комунікацій. У табірному й розливному відділеннях аналізують промивні води з танків, якість миття тари – пляшок, бочок, обсеменність готового продукту й ін. Установлюються норми обсіменіння кожного об'єкта. Так, наприклад, кількість мікроорганізмів в останніх змивних водах після дезінфекції устаткування повинна наближатися до кількості клітин у воді, використовуваній для обробки. Бактерії кишкової групи в 100 см<sup>3</sup> змивної води повинні бути відсутніми.

### **6.2.2. Санітарно-гігієнічний режим пивоварного виробництва**

Якість пива в значній мірі визначається рівнем санітарного стану виробництва по всьому технологічному процесі. Санітарно-гігієнічні вимоги передбачають на всіх ділянках виробництва проведення профілактичних заходів щодо запобігання мікробіологічного забруднення сировини, напівпродуктів і готової продукції.

**Зберігання ячменю.** Приміщення для зберігання зерна є найбільш запиленою ділянкою виробництва. Тому санітарні правила передбачають установлення пиловловлювачів і вентиляторів, а також прибирання приміщення кожної зміни.

Перед надходженням нової партії ячменю складські приміщення повинні бути ретельно очищені від сміття, пилу, залишків старого зерна й дезінфіковані. Устаткування й територію складу також очищають від сміття й зерна.

Мішки з ячменем розташовують так, щоб до них був доступ повітря. Нижній ряд мішків складають на стелажі на висоті 25–30 см від підлоги. У силосні ємкості завантажують ячмінь із вмістом вологи не вище 12–15 % і регулярно їх провітрюють.

**Солодовий цех.** Санітарні заходи при готуванні солоду спрямовані в основному на боротьбу із зерновим пилом, механічними домішками, мікроорганізмами.

Ячмінь, що надходить на замочування, після ретельного миття рекомендується дезінфікувати негашеним вапном, хлорним вапном, формаліном або перманганатом калію для інактивації мікрофлори, що присутні на поверхні зерна.

Рекомендується чищення, миття й дезінфекція хлорним вапном або формаліном замочних чанів і солодоростильних апаратів після звільнення їх від солоду. У солодовому цеху необхідно боротися з міцеліальними грибами, які можуть розвиватися на солоді. Для боротьби з міцеліальними грибами поверхню стін цеху перед білінням потрібно обробляти антисептиком (зазвичай 2–4 %-м розчином мідного купоросу).

**Варильний цех.** Після кожного варіння внутрішню поверхню заторних казанів, фільтраційних апаратів і сушварильних казанів необхідно ретельно чистити й мити. Комунікації необхідно один раз на добу промивати холодною й гарячою водою, потім пропарювати протягом 15–20 хв. і знову промивати холодною водою. Дезінфекція всього цього устаткування обов'язкова при загальній антисептичній обробці цеху.

Виробничі відходи варильного цеху – пивну й хмелеву дробину – насосом перекачують у закриті бункери. Зберігати й транспортувати дробину відкритим способом не рекомендується, тому що це створює антисанітарні умови на території заводу.

Необхідно забезпечити належні санітарні умови процесу посвітління й охолодження сусла. Сепаратори для посвітління сусла наприкінці кожної зміни необхідно промивати й обробляти 2 %-м розчином каустичної соди з температурою 7 °С, а потім знову промити водою. Теплообмінники два рази в тиждень чистять і дезінфікують 1 %-м гарячим розчином лугу. Обробку теплообмінників, виконаних з нержавіючої сталі, проводять щотижня 1–1,5 %-ю азотною кислотою. Дезінфекцію всього вариль-

ного цеху проводять, як правило, антиформіном при загальній дезінфекції заводу не рідше двох разів на місяць.

**Дріжджове відділення.** Воно повинне бути ізольоване й мати температуру в межах 2–4 °С. Дріжджові ванночки й інше устаткування необхідно дезінфікувати 1 %-м розчином хлорного вапна або антиформіном протягом 1–2 г.

**Цех бродіння.** Цей цех повинен бути сухим, у ньому необхідно підтримувати температуру на рівні 6–8 °С. Бродильні чани й танки після перекачування молодого пива в танки для дображування очищають механічним способом, миють й обробляють дезінфікуючим препаратом протягом 30 хв, після чого змивають водою. Для дезінфекції алюмінієвих ємкостей лужні розчини застосовувати забороняється. Універсальним дезінфектантом є четвертинна амонійна сполука катамін-АБ.

**Цех доброджування.** Він також повинен бути сухим і мати температуру не вище 3 °С. Для дезінфекції танків застосовують ті ж дезінфектанти, що й у цеху бродіння. Ретельно проводять обробку пивопроводів: до початку й після закінчення робіт їх промивають водою й два рази в тиждень дезінфікують антиформіном, каустичною содою або катаміном-АБ з наступним промиванням водою.

**Цех розливу.** Всі приміщення цеху розливу, а також приміщення для миття тари піддають ретельній санітарній обробці.

Всю систему фільтрувально-розливної установки щодня миють, один раз на тиждень піддають механічному очищенню й дезінфікують антиформіном або розчином хлорного вапна. Розливні автомати промивають чистою водою до й після розливу пива. Пивопровід між фільтраційним відділенням і розливними машинами пропарюють один раз на тиждень протягом 15 хв.

Розливання пива проводять в окремих приміщеннях. Пляшки, бочки й автотермоцистерни перед наповненням ретельно оглядають і миють. Для обробки пляшок у пляшкомиїних машинах застосовують 0,5 %-й розчин каустичної соди.

Загальний санітарно-гігієнічний контроль включає й систематичну перевірку чистоти води, а також чистоти рук робітників на наявність бактерій кишкової групи. Велику увагу звертають на чистоту санітарного

одягу, який зберігають у спеціальних шафах і регулярно піддають чистенню й дезінфекції.

### ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. З яких основних стадій складається виробництво пива?
2. Назвіть основні види сировини для виробництва пива. Яка роль солоду в процесі одержання пивного сусла?
3. Які способи одержання пива використовуються у сучасному виробництві?
4. Якими властивостями повинні володіти культурні дріжджі, використовувані в пивоварстві?
5. Від чого залежить бродильна активність пивних дріжджів?
6. Назвіть джерела сторонніх мікроорганізмів у виробництві пива.
7. Що таке біологічна стійкість пива? Які мікроби можуть викликати її зниження?
8. За якими показниками проводиться мікробіологічний контроль виробничих дріжджів, сусла, молодого пива, готового пива?
9. Які санітарно-гігієнічні вимоги до приміщень й устаткування для зберігання ячменю й готування солоду?
10. Які заходи передбачаються на виробництві для забезпечення санітарно-гігієнічного режиму у варильному цеху, цехах бродіння сусла й доброджування пива?

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Домарецький В.А. Технологія харчових продуктів / Домарецький В.А, Остапчук М.В., Українець А.І. – К. : НУХТ, 2003.
2. Сельскохозяйственная биотехнология / Под ред. акад. РАСХН Шевелухи В.С. – М. : Высшая школа, 2003.
3. Кантере В.М. Теоретические основы технологии микробиологических производств / Кантере В.М. – М. : Агропромиздат, 1990.
4. Вербина Н.М. Микробиология пищевых производств / Вербина Н.М., Каптева Ю.В. – М. : Агропромиздат, 1988.
5. Чубанова И.Н. Микробиология / Чубанова И.Н. – М. : Высшая школа, 1987.
6. Быков В.А. Расчет процессов микробиологических производств / Быков В.А – К. : Техника, 1985.
7. Биотехнология. В 8 кн. / Под ред. Егорова Н.С. – М. : Высшая школа, 1987.
8. Промышленная микробиология. / Под ред. Егорова Н.С. – М. : Высшая школа, 1989.
9. Остапчук Н.Р. Математическое моделирование процессов пищевых производств / Остапчук Н.Р. – К. : Техника, 1992.
10. Мальцев Г.М. Технология бродильных производств / Мальцев Г.М. – М. : Пищевая промышленность, 1980.
11. Панфилов В.А. Научные основы развития технологических линий пищевых производств / Панфилов В.А. – М. : Пищевая промышленность, 1986.
12. Беккер М.Е. Введение в биотехнологию / Беккер М.Е. – М. : Пищевая промышленность, 1978.
13. Виестур У.Е. Биотехнология / Виестур У.Е., Шмите И.А., Жилевич А.В. – Рига : Зинатне, 1987.
14. Мюллер Г. Микробиология пищевых продуктов растительного происхождения / Мюллер Г., Литц П., Мюнх Г-Д. – М. : Пищевая промышленность, 1977.

15. Жвирблянская А.Ю., Микробиология в пищевой промышленности / Жвирблянская А.Ю., Бакушинская О.А. – М. : Пищевая промышленность, 1975.

16. Бондар І.В. Промислова мікробіологія. Харчова і агробіотехнологія / Бондар І.В, Гуляєв В.М. – Дніпродзержинськ : Вид-во ДДТУ, 2004.

### Завдання на виконання контрольної роботи для студентів заочної форми навчання

З дисципліни «Біохімічні і мікробіологічні основи харчової та бродильної технології» студенти заочної форми навчання в VIII семестрі виконують контрольну роботу. Завдання на виконання цієї роботи обирається, як правило, за двома останніми цифрами номера залікової книжки (див. таблицю нижче). Щоб уникнути повторення завдань рік у рік, викладач має право міняти спосіб вибору завдань для контрольної роботи. Відповіді на запитання повинні бути короткими, але змістовними й мати відповідне теоретичне обґрунтування. Залік контрольної роботи здійснюється за результатами співбесіди викладача зі студентом після виправлення ним помилок і зауважень, виявлених при перевірці роботи.

Завдання для контрольної роботи

Шифр завдання	Номери запитань	Шифр завдання	Номери запитань
00	1, 15, 29	15	14, 25, 40
01	2, 16, 30	16	13, 16, 42
02	3, 17, 31	17	12, 17, 37
03	4, 18, 32	18	11, 18, 38
04	5, 19, 33	19	10, 19, 35
05	6, 20, 34	20	9, 20, 36
06	7, 21, 35	21	8, 21, 34
07	8, 22, 36	22	7, 22, 33
08	9, 23, 37	23	6, 24, 32
09	10, 24, 38	24	5, 23, 30
10	11, 25, 39	25	4, 15, 31
11	12, 26, 40	26	3, 27, 41
12	13, 27, 41	27	2, 26, 39
13	14, 28, 42	28	1, 28, 29

### Запитання для контрольної роботи

1. Промислова мікробіологія як наукова база бродильних виробництв. Історія промислової мікробіології.
2. Основні відомості про мікроорганізми. Класифікація й номенклатура мікроорганізмів. Морфологічні особливості мікроорганізмів .
3. Особливості будови клітин еукаріотів.
4. Будова прокариотичної клітин. Ультрамікроби.
5. Характеристика основних культур мікроорганізмів, застосовуваних у бродильних виробництвах – дріжджів і бактерій. Явище спороутворення.
6. Елементарний склад клітини. Функції води в клітні.
7. Органічні компоненти клітини. Будова й функції білків.
8. Будова й функції нуклеїнових кислот, вуглеводів і ліпідів.
9. Поняття про ферменти. Особливості ферментативного каталізу.
10. Структура, механізм дії й властивості ферментів. Лабільність ферментів.
11. Обмін речовин і харчування мікроорганізмів. Дихання клітин.
12. Мікроорганізми й навколишнє середовище. Вплив біотичних (біологічних) факторів на мікроби.
13. Вплив абіотичних (фізичних і хімічних) факторів на мікроорганізми.
14. Властивість термостійкості клітин. Поняття про стерилізацію й пастеризацію.
15. Основні стадії типового біотехнологічного (бродильного) виробництва. Готування живильних середовищ для вирощування мікроорганізмів .
16. Друга стадія типового біотехнологічного процесу – підтримка чистої культури мікроорганізмів.
17. Основна стадія типового біотехнологічного процесу – стадія ферментації. Системи аерації й перемішування в біореакторах.

18. Теплопередача в процесах ферментації. Системи теплообміну в біореакторах.
19. Виділення й очищення продуктів ферментації (бродіння).
20. Одержання товарних форм продуктів ферментації.
21. Методи стерилізації рідких середовищ.
22. Методи іммобілізації ферментів і клітин.
23. Основні біохімічні процеси, використовувані в харчових виробництвах (спиртове, кисломолочне бродіння, гнильні процеси).
24. Джерела сторонніх мікроорганізмів у харчових виробництвах.
25. Дезінфекція в харчовій промисловості.
26. Загальні принципи мікробіологічного й санітарно-гігієнічного контролю в харчовій промисловості.
27. Спиртове бродіння і його практичне використання в харчових виробництвах.
28. Перетворення азотистих і безазотистих органічних речовин у харчових виробництвах.
29. Сировина й основні стадії культивування хлібопекарських дріжджів. Готування живильного середовища.
30. Вплив умов вирощування хлібопекарських дріжджів на нагромадження біомаси дріжджів.
31. Технологія вирощування посівних хлібопекарських дріжджів.
32. Технологія вирощування товарних хлібопекарських дріжджів.
33. Особливості культур дріжджів, використовуваних для виробництва пресованих і сушених хлібопекарських дріжджів. Мікроорганізми – шкідники дріжджового виробництва.
34. Мікробіологічний і санітарно-гігієнічний контроль виробництва дріжджів.
35. Принципова технологічна схема виробництва пива. Сировина і основні стадії технологічного процесу.
36. Характеристика дріжджів, використовуваних у пивоварстві. Мікроорганізми – шкідники пивоварного виробництва

37. Санітарно-гігієнічний і мікробіологічний контроль пивоварного виробництва.
38. Загальні представлення про ріст та розвиток клітин мікроорганізмів.
39. Основні способи культивування мікроорганізмів.
40. Закономірності росту періодичної культури мікроорганізмів.
41. Закономірності безперервного культивування мікроорганізмів.
42. Математична модель росту клітин при безперервному культивуванні мікроорганізмів.

## ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА.....	3
ВСТУП.....	5
Розділ 1. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ ПРО МІКРООРГАНІЗМИ .....	14
1.1. Місце мікроорганізмів у системі живого світу	
Особливості мікроорганізмів.....	14
1.2. Морфологічна характеристика мікроорганізмів .....	17
1.2.1. Структура еукаріотичної клітини.....	17
1.2.2. Будова прокаріотичної клітини .....	22
1.2.3. Ультрамiкроби.....	27
1.3. Хімічний склад клітин мікроорганізмів .....	29
1.3.1. Елементний склад клітини.....	29
1.3.2. Вода.....	30
1.3.3. Органічні компоненти клітини.....	31
1.4. Ферменти.....	37
1.4.1. Природа ферментів й особливості ферментативного	
каталізу .....	37
1.4.2. Структура, механізм дії й властивості ферментів .....	40
1.5. Метаболізм мікроорганізмів. Загальні поняття про обмін	
речовин й енергії .....	42
1.6. Взаємозв'язок мікроорганізмів і навколишнього	
середовища .....	44
1.6.1. Абіотичні фактори зовнішнього середовища .....	44
1.6.2. Біотичні фактори зовнішнього середовища.....	49
Розділ 2. КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ .....	52
2.1. Загальні дані про ріст і розвиток мікроорганізмів.....	52
2.2. Способи культивування мікроорганізмів.....	55
2.3. Закономірності росту періодичної культури	
мікроорганізмів.....	60
2.4. Безперервне культивування мікроорганізмів.....	63
2.5. Математичний опис процесів безперервного	
культивування мікроорганізмів .....	67

Розділ 3. ОСНОВНІ ПРИНЦИПИ ПРОМИСЛОВОГО ЗДІЙСНЕННЯ ПРОЦЕСІВ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ .....	72
3.1. Технологія готування живильних середовищ для вирощування мікроорганізмів .....	73
3.1.1. Харчування мікроорганізмів.....	73
3.2. Стадія підтримки чистої культури й одержання посівного матеріалу .....	91
3.3 Стадія ферментації .....	95
3.3.1. Особливості процесів тепломасопереносу в біореакторах .....	95
3.3.2. Системи перемішування й аерації біореакторів.....	98
3.3.3. Системи теплообміну біореакторів.....	103
3.4. Стадія виділення й очищення цільових продуктів біосинтезу .....	107
3.5. Одержання товарних форм продуктів мікробного синтезу.....	110
3.6. Поняття про іммобілізацію ферментів і клітин мікроорганізмів .....	111
3.6.1. Методи іммобілізації біокаталізаторів .....	113
 Розділ 4. СПЕЦІАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ Й БІОХІМІЯ ХАРЧОВИХ ВИРОБНИЦТВ.....	124
4.1. Основні типи біохімічних процесів, використовуваних в харчових і бродильних виробництвах.....	124
4.1.1. Біохімічне перетворення органічних речовин, що не містять азоту.....	124
4.1.2. Біохімічне перетворення органічних речовин, які містять азот.....	130
4.2. Основи мікробіологічного й санітарно-гігієнічного контролю у харчовій промисловості.....	133
4.2.1. Джерела сторонніх мікроорганізмів у харчових виробництвах .....	133
4.2.2. Патогенна мікрофлора. Санітарно-показові мікроорганізми.....	138

4.2.3. Загальні принципи мікробіологічного й санітарно-гігієнічного контролю в харчовій промисловості...	140
4.3. Дезінфекція у харчовій промисловості .....	144

## Розділ 5. МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ

ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА МІКРОБНОЇ БІОМАСИ .....	149
5.1. Мікробіологія та біохімія дріжджового виробництва .....	149
5.1.1. Історія використання мікроорганізмів для одержання харчового білка .....	149
5.1.2. Основні стадії технологічного процесу .....	150
5.1.3. Особливості культур дріжджів, використовуваних у виробництві .....	154
5.1.4. Мікроорганізми – шкідники дріжджового виробництва ..	155
5.2. Мікробіологічний і санітарно-гігієнічний контроль дріжджового виробництва .....	158
5.2.1. Мікробіологічний контроль виробництва дріжджів .....	158
5.2.2. Санітарно-гігієнічний режим виробництва дріжджів .....	161

## Розділ 6. МІКРОБІОЛОГІЧНІ І БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЇ

ОДЕРЖАННЯ ПРОДУКТІВ БРОДІННЯ .....	164
6.1. Мікробіологія й біохімія пивоварного виробництва .....	164
6.1.1. Сировина й основні стадії технологічного процесу .....	164
6.1.2. Характеристика виробничих дріжджів .....	167
6.1.3. Мікроорганізми – шкідники пивоварного виробництва .....	169
6.2. Мікробіологічний і санітарно-гігієнічний контроль пивоварного виробництва .....	173
6.2.1. Мікробіологічний контроль виробництва пива .....	173
6.2.2. Санітарно-гігієнічний режим пивоварного виробництва .....	175

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ .....	179
-------------------------	-----

## ДОДАТОК. Завдання на виконання контрольної роботи

для студентів заочної форми навчання .....	181
--	-----

Навчальне видання

**ЗІНЧЕНКО Марія Георгіївна**

**БІОХІМІЧНІ І МІКРОБІОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ХАРЧОВОЇ  
ТА БРОДИЛЬНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ**

Навчальний посібник

Роботу рекомендував до видання В.І. Тошинський

Редактор Л.А. Пустовойтова

План 2007 р., поз. 97.

Підп. до друку \_\_.\_\_.09. Формат 60×84 1/16.

Папір друк. № 2. Друк – ризографія. Гарнітура Times.

Ум. друк. арк. 8,0. Обл.-вид. арк. 9,8.

Наклад 300 прим. Зам. № \_\_. Ціна договірна

---

Видавничий центр НТУ «ХП»

Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 116 від 10.07.2000 р.

---

Друкарня НТУ «ХП». 61002, Харків, вул. Фрунзе, 21