**12.** В состав практически любой питательной среды входят такие компоненты, как вода, соединения углерода, азота, фосфора и других минеральных веществ, витамины.

Вода должна отвечать требованиям ГОСТ (чистая, бесцветная, без привкуса, запаха и осадка).

**Источники углерода.** Легкодоступными считаются сахара: глюкоза, сахароза, лактоза, многоатомные спирты: глицерин, маннит и др. Полисахариды: целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал, которые могут быть источниками углерода либо после превращения их в усвояемые микроорганизмами моно- и низкомолекулярные олигосахариды, либо микроорганизмы должны иметь набор ферментов, гидролизующих эти вещества. Такими микроорганизмами являются плесневые грибы родов Aspergillus, Penicillium, бактерии рода Bacillus и другие. Некоторые виды микроорганизмов используют в качестве источника углерода и энергии углеводороды: н-алканы и некото-рые фракции нефти.

**Источники азота**. Азот может содержаться в форме неорганических солей или кислот. Большинство дрожжей хорошо усваивает аммиачные соли, а также аммиак из водного раствора, потребность в нитратах испытывают только некоторые виды дрожжей. Источником азота могут служить и орг. соединения: аминокислоты, мочевина и т.д., которые легко усваиваются микроорганизмами.

**Источники фосфора**. Фосфор является важнейшим компонентом клетки. Он входит в состав АТФ (аденозинтрифосфата), АДФ, АМФ и тем самым обеспечивает нормальное течение энергетического обмена в клетке, а также синтез белков, нуклеиновых кислот и другие процессы биосинтеза. Фосфор вносят в среду в виде солей фосфорной кислоты.

**Источники витаминов и микроэлементов**. Практически все микроорганизмы лучше растут в присутствии витаминов. Эффективной добавкой к питательным средам оказался кукурузный экстракт благодаря наличию в нем витаминов, аминокислот и минеральных элементов в легко ассимилируемых формах. В рецептуры сред включают также дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт, сок картофеля, молочную сыворотку, экстракт солодовых ростков и другие продукты. Микроэлементы в состав питательных сред вводят в микродозах, в противном случае они оказывают ингибирующее действие на микробные клетки.

**13.** Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост, развитие биообъекта, эффективный синтез целевого продукта. Питательные среды могут иметь неопределенный состав, то есть включать биогенные (растительные, животные, микробные) добавки - мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т.д. Каждый конкретный вид микроорганизмов, используемых в биотехнологии, строго избирателен к питательным веществам. Потребность микроорганизма в тех или иных соединениях определяется физиологическими особенностями данного вида микроба, но во всех случаях среда должна быть водным раствором этих веществ и обеспечивать в определенном количестве их приток в клетку. Первоначальную ориентировку в выборе оптимального состава питательной среды, исходя из состава клеточного вещества микроба, сделать можно.

Важнейшим условием приготовления питательных сред является соблюдение правил асептики. Для обеззараживания питательных сред применяют, как известно, химическое воздействие (дезинфекцию), воздействие температуры и других физических факторов (ультразвука, ультрафиолетовых лучей, ультрафильтрации). В биотехнологии широко применяют термические методы обеззараживания питательных сред (автоклавирование, стерилизацию, кипячение и др.).

Посевным материалом (инокулятом) называют чистую культуру микроорганизма, которую получают путем ее последовательного пересева из пробирки в колбу, а затем в аппараты увеличивающегося объема до количества, необходимого для промышленного производства. Приготовление посевного материала состоит из следующих стадий: 1. Получение культуры микроорганизма в микробиологической лаборатории завода. 2. Выращивание микроорганизмов в малом посевном аппарате. 3. Выращивание микроорганизмов в большом посевном аппарате. 4. Накопление культуры микроорганизмов в малом ферментере. Передачу чистых культур из одного аппарата в другой осуществляют в конце логарифмической фазы роста.

Ферментация (культивирование) - это вся совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную питательную среду посевного материала (инокулята) до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие исчерпывания питательных веществ среды.

**14, 7**. Ферментация (культивирование) - совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную питательную среду посевного материала (инокулята) до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие исчерпывания питательных веществ среды.

При **поверхностном** культивировании посевной материал высевают на поверхность питательной среды, распределенной небольшим слоем (около 10 см) в металлических кюветах.

При **глубинном** культивировании погружение клеток микроорганизмов осуществляют за счет постоянного перемешивания в течение всего процесса ферментации. Глубинный способ является более выгодным для промышленности по сравнению с поверхностным способом, так как позволяет осуществлять полную механизацию и автоматизацию процесса, избегать инфицирования технологического процесса посторонней микрофлорой.

При **периодическом** способе культивирования стерильная питательная среда засевается исходной культурой продуцента, и далее в этой же емкости микроорганизмы при определенных условиях проходят через все стадии роста и развития популяции. Когда процесс культивирования заканчивается, емкость для выращивания освобождают, и цикл возобновляется, начиная от засева питательной среды исходной культурой продуцента.

При **непрерывном** способе культивирования микроорганизмы постоянно получают приток свежей стерильной питательной среды, а из аппарата непрерывно отбирается биомасса вместе с образуемыми метаболитами.

Культивирование микроорганизмов, образующих пленку из биомассы, осуществляется в ферментере типа колонки с наполнителем. В качестве наполнителя может использоваться макроноситель (кокс, прутья, стружка, стеклянные шарики и т.д.) и микроноситель (амберлитовые смолы, частички сефадекса и т.д.). Клетки, культивируемые таким образом, называют **иммобилизованными**. **+:** длительность эксплуатации при непрер. ферментации, устойчивость клеток, простота выделения целевого прод, меньше энергозатраты.

**15**. Стадия выделения продукта существенно зависит от того, накапливается продукт в клетках или он выделяется в культуральную жидкость, или же продуктом является сама клеточная масса. Разделение биомассы и культуральной жидкости - сепарация

Если целевым продуктом является биомасса клеток, применяют следующие методы выделения: отстаивание, фильтрация, флотирование, сепарирование и т.д. (механические способы); выпаривание и сушка (физические способы). Процесс **флотирования** клеток осуществляется путем вспенивания культуральной жидкости. Вместе с пеной из культуральной жидкости удаляется и основная масса дрожжей.

Если целевой продукт содержится в самих клетках, то проводят разрушение клеток - дезинтеграцию – физическими (действие ультразвука, замораживания-оттаивания, баллистическую дезинтеграцию), химическими (с помощью толуола, бутанола и др) и ферментативными методами (используют ферменты, способные разрушать определенные структурные компоненты клет. стенок микроорганизмов). Баллистическая дезинтеграция клеток осуществляется в мельницах, куда помещают суспензию клеток и вспомогательные мелющие вещества: песок, стеклянные или полимерные шарики.

Для очистки ферментов применяют избирательную сорбцию (связывание) каолином, трифосфатом кальция, гидроксидом алюминия и другими адсорбентами. Таким образом проводят сорбцию либо фермента, либо балластных белков, которые затем разделяют центрифугированием. Фермент из сорбента отделяют раствором фосфатного буфера.

На последнем этапе продукт отделяют от примесей, концентрируют и стабилизируют. После стабилизации продукта в зависимости от того, каким должен быть конечный продукт: сухим или жидким, его обезвоживают или сразу упаковывают.

К продуктам микробного брожения и метаболизма относятся первичные метаболиты, вторичные метаболиты, ферменты и сама клеточная биомасса (так называемые белки одноклеточных микроорганизмов).

Первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микробов; одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в синтезе коферментов (аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и примидиновые нуклеотиды, витамины)

Вторичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, образующиеся на более поздних стадиях развития культуры, не требующиеся для роста микроорганизмов (антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений, токсины и пигменты).

**16.** Лимонная кислота (С6Н8О7) - трехосновная оксикислота, широко распространена в природе, относительно много ее содержится ягодах, фруктах, особенно в цитрусовых (в лимоне 5-10 %).

Ранее лимонную кислоту выделяли в виде лимоннокислого кальция из продуктов переработки листьев хлопчатника, стеблей махорки, хвои ели и в значительных количествах из плодов лимонов. Однако это производство является крайне дорогим и небольшим по объему. Поэтому лимонная кислота была дефицитным и дорогим продуктом.

Для получения лимонной кислоты используют микроскопические грибы родов Aspergillus, Penicillium, Mucor, Ustina. В настоящее время основными продуцентами лимонной кислоты являются различные штаммы гриба Aspergillus niger, которые отличаются большой скоростью роста, легкостью культивирования и высоким выходом лимонной кислоты по отношению к массе окисляемого углевода. Они устойчивы к внешним воздействиям и имеют обильное конидиеношение.

Образование лимонной кислоты осуществляется в цикле трикарбоновых кислот в результате конденсации оксалоацетата и ацетил КоА при участии фермента цитрат-синтетазы.

Оксалоацетат и ацетил КоА образуются из двух молекул пирувата: одна молекула пирувата подвергается декарбоксилированию с образованием ацетил КоА, вторая - карбоксилируется, давая оксалоацетат. Пируват образуется по фруктозо-бифосфатному пути (пути гликолиза). Все ферменты этого пути, а также пируватдегидрогеназа, пируват-карбоксилаза и цитрат-синтетаза обнаружены у A. niger. В результате рассмотренной реакции одна молекула сахара (С6Н12О6) превращается в одну молекулу лимонной кислоты (С6Н8О7).

Сверхсинтез лимонной кислоты происходит при лимитировании роста грибов-продуцентов минеральными компонентами среды и одновременном избыточным содержанием источника углерода. В условиях лимитирования роста гриба недостатком железа и марганца после полного поглощения из среды дефицитного элемента он прекращает расти, однако продолжает потреблять имеющийся в среде источник углерода. При этом в клетках гриба начинает накапливаться лимонная кислота, которая в дальнейшем выделяется в среду.

**17.** Молочная кислота с 1881 г. производится промышленным способом с помощью молочнокислых бактерий. В СССР было организовано производство молочной кислоты в 1923 г. Для промышленного изготовления молочной кислоты пригодны только гомоферментативные молочнокислые бактерии, образующие до 98 % молочной кислоты. Применяемые штаммы Lactobacillus delbrueckii (дельбрюкки), L. bulgaricus не предъявляют высоких требований к питательной среде и за короткое время дают высокий выход молочной кислоты.

Молочнокислые бактерии преобразуют в молочную кислоту самые разные углеводы, поэтому для промышленного получения этой кислоты используют мелассу, молочную сыворотку, глюкозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, осахаренный крахмал и пр. В каждом случае подбирают наиболее подходящий продуцент. Для сбраживания глюкозы или мальтозы обычно применяют штаммы Lactobacillus delbrueckii, L. leichmannii или L. bulgaricus.

Молочную кислоту в промышленных условиях получают методом анаэробной глубинной ферментации. Концентрация сахара в среде должна быть 5-20 %, температура 44-50 оС, рН 6,3-6,5. Во время ферментации рН среды поддерживают, добавляя мел. Через 6-7 суток культивирования в среде остается 0,5-0,1 % сахаров и 11-14 % лактата кальция. Из 100 г сахаров получают 80-90 г лактата. Осадок мела и коллоиды отделяют фильтрацией. Фильтрат упаривают до концентрации 27-30 %, затем охлаждают до 25-30 оС и выдерживают в кристаллизаторах 36-48 ч. Кристаллы лактата отделяют центрифугированием. Молочную кислоту из лактата получают при помощи серной кислоты.

**18.** Продуцентами уксусной кислоты являются уксуснокислые бактерии рода Acetobacter. Эти бактерии приспособлены к сахаристым и спиртовым субстратам, растут при сильно кислых условиях (рН = 4,0). Недостатком этого продуцента является то, что он может терять свойство образовывать уксусную кислоту, поэтому его постоянно поддерживают в среде с высокой концентрацией спирта и уксусной кислоты и низкой концентрацией питательных веществ. В качестве сырья для получения пищевого уксуса используют виноградное вино, пивное сусло, мед, соки различных фруктов и ягод после спиртового брожения или водный раствор этилового спирта для получения белого уксуса. Кроме спирта среда содержит уксусную кислоту и минеральные соли N, P, S, Mn, K. Иногда добавляют источники витаминов в виде различных экстрактов. Уксусная кислота служит источником углерода и энергии для бактерий.

Уксусная кислота стала первым микробиологическим продуктом, полученным с помощью иммобилизованных клеток. Этот способ может быть непрерывным и периодическим. В течение длительного времени применяется адсорбирование уксуснокислых бактерий на древесной стружке, древесном угле, коксе и других субстратах. Пропуская раствор этанола через генераторы с иммобилизованными бактериями, получают 10-15 %-ный раствор уксусной кислоты. Из 100 л безводного спирта теоретически должно быть получено 103 л уксусной кислоты. На практике выход уксуса из 100 л этанола редко превышает 90 л, что связано с переокислением и неполным окислением этанола бактериями, а также с его испарением.

В столовом уксусе содержится 5-9 % уксусной кислоты. Уксус с концентрацией кислоты 20-30 % получают путем вымораживания исходного раствора. Путем перегонки получают 70-80 %-ную уксусную кислоту, называемую уксусной эссенцией. Ледяная уксусная кислота содержит 98,0-99,8 % кислоты.

**19.** Существует несколько способов получения аминокислот. При производстве аминокислот могут быть использованы отходы мясоперерабатывающей промышленности (отходы обработки животного сырья, кровь и т.д.), яичный белок, казеин молока, клейковина пшеницы, соевый шрот и т.д. При переработке этого сырья все аминокислоты переходят в гидролизат, и для выделения отдельных аминокислот необходима сложная многостадийная очистка. Кроме того, само сырье считается дефицитным и дорогим, поэтому аминокислоты имеют высокую себестоимость.

Химический синтез аминокислот достаточно эффективен, однако его недостатком является то, что в процессе синтеза образуется смесь из биологически активной L-формы и D-изомера аминокислоты. D-форма является балластом, так как не усваивается животными и человеком, а некоторые D-формы аминокислот обладают токсическими свойствами. Разделение изомеров – дорогая и трудоемкая процедура. Синтетически производится незаменимая аминокислота метионин.

В настоящее время большую часть аминокислот производят с помощью микробного синтеза, причем микроорганизмы синтезируют только L-форму. Это значительно облегчает выделение и очистку аминокислот и позволяет получать препараты с низкой себестоимостью. Микроорганизмы, образующие аминокислоты, не накапливают их в клетке, а постоянно выделяют в питательную среду. Поэтому аминокислоты выделяют из фильтрата культуральной жидкости.

Глутаминовая кислота – первая аминокислота, полученная микробным синтезом.

Лизин образуют многие микроорганизмы: бактерии, актиномицеты, сине-зеленые водоросли, некоторые виды микроскопических грибов. В нашей стране в качестве продуцентов лизина используют бактерии родов Corinebacterium, Micrococcus, Brevibacterium. Питательной средой является меласса или уксусная кислота.

Триптофан образуют микроорганизмы бактериального и грибного происхождения: Aerobacter, Bacillus, Escherichia (E. coli), Sacсharomyces (S. сerevisiae), Candida и другие. Наиболее активные продуценты L-триптофана – представители рода Micrococcus, Candida utilis, Bacillus subtilis.

Таким образом, самые различные аминокислоты находят широкое применение во многих отраслях пищевой промышленности, повышая питательную ценность пищевых продуктов, участвуя в улучшении их органолептических показателей и повышая их стабильность при длительном хранении.

**20.** С помощью микроорганизмов можно получать липиды. Продуцируемые микроорганизмами липиды накапливаются внутри клетки в виде запасных гранул. Ряд продуцентов в отличие от продуцентов белка (в частности, дрожжей) требуют асептических условий при выращивании.

Производство липидов с помощью микроорганизмов возможно по двум направлениям: специализированное производство, основанное на направленном биосинтезе липидов микробной клеткой, и получение отхода производства в виде микробного жира при производстве кормовых дрожжей.

В производстве, где главным, целевым продуктом являются микробные липиды, в качестве продуцентов используют дрожжи родов Cryptococcus, Rhodotorula, Lypomyces, Candida. Среди этой группы дрожжей наибольшей продуктивностью обладают следующие виды: Cryptococcus terricolus, Rhodotorula gracilis, R. glutinis, Lypomyces starkeyi, L. lipoferus и др. Микроорганизмы выращиваются при минимальном азотистом питании. В этом случае они накапливают значительные количества (от 35 до 55 % от сухой массы клетки) липидов, состав которых зависит от используемого источника углерода. В липидную фракцию входят фосфолипиды, стерины, свободные жирные кислоты, моно-, ди- и триглицериды, стериновые эфиры и воски. Липиды извлекают экстракцией, а оставшуюся биомассу используют как белковую добавку в корма животных, однако содержание белка в ней в 1,5-2,0 раза меньше, чем в обычных кормовых дрожжах.

Источником получения липидов может быть биомасса дрожжей (в основном рода Candida), накапливаемая при производстве белковых веществ, но содержащая повышенное количество жиров, которые извлекают экстракцией растворителями.

При выращивании кормовых дрожжей на средах с повышенными концентрациями парафинов, на дизельном топливе в биомассе дрожжей накапливается значительное количество липидов, которые являются нежелательным компонентом в готовом продукте, так как они вызывают его прогоркание при хранении. Поэтому липиды из кормовых дрожжей экстрагируют, отработанные дрожжи высушивают, а жиры освобождают от растворителя и направляют на дальнейшую переработку.

В настоящее время значительное количество растительных и животных жиров расходуется на технические нужды. Замена пищевых жиров микробными дает заметный экономический эффект.

**21.** С помощью микробного синтеза в настоящее время получают такие витамины, как некоторые витамины группы В: В12, В2, каротиноиды, витамин D и другие.

**Синтезировать витамин В12** способны уксуснокислые бактерии, грибы и пропионовокислые бактерии. Наибольшее промышленное значение имеют Propionibacterium и Pseudomonas (P. denitrificans).

Концентрат витамина В12 предназначен для обогащения кормов животных. Это однородный порошок коричневого цвета, кисловатый на вкус, имеет характерный запах.

**Витамин В2 (рибофлавин)** можно в небольших количествах выделять из природного сырья. В наибольшем количестве он содержится в моркови и печени трески. Из 1 т моркови получают 1 г витамина, из 1 т печени – 6 г.

Продуцентами данного витамина являются дрожжи, мицелиальные грибы и бактерии. Культивирование проводят глубинным способом при хорошей аэрации. Максимальное накопление витамина происходит вместе с максимумом накопления биомассы на 2-е сутки, причем синтез рибофлавина начинается лишь после фазы интенсивной ассимиляции сахара. Витамином В2 обогащают некоторые сорта белого хлеба, его используют для окраски пищевых продуктов в оранжево-желтый цвет.

**Каротиноиды –** это предшественники **витамина А**, среди которых наиболее активен бета-каротин. В организме человека не синтезируются, поэтому должны поступать извне. В печени каротин превращается в витамин А.

Продуцентами каротиноидов могут быть грибы и дрожжи. В промышленности получают с помощью микроскопического гриба рода Blakeslea (блакеслеа). Культивирование проводят и поверхностным, и глубинным способами на питательных средах сложного состава. Во время ферментации среду интенсивно аэрируют. Образование каротиноидов в культуре микроорганизмов не идет параллельно с образованием биомассы. Интенсивный синтез каротиноидов начинается, когда в среде использован весь азот, а рост культуры уменьшается. В качестве стимуляторов в питательные среды добавляют экстракты цитрусовых и дрожжей.

витамины, синтезированные микроорганизмами, используют не только для повышения пищевой ценности продуктов питания, но также в качестве антиоксидантов, красителей и стабилизаторов цвета.

**22. Ферменты** - высокоактивные соединения белковой природы, являющиеся специфическими катализаторами реакций. Ферменты находятся практически во всех живых объектах: растениях, животных и микроорганизмах. **Ферментные препараты** могут представлять собой смесь ферментов или фермент одного вида, иметь различную степень очистки, могут быть добавлены в сырье или продукт, или использоваться закрепленными на носителе (иммобилизованные ферменты).

Для получения ферментных препаратов пригодны только некоторые растения или отдельные органы растений и животных, способные накапливать значительное количество ферментов.

Из ферментов **растительного происхождения** наиболее широко в пищевой промышленности используют амилазы и папаин. Источником ферментов могут быть пророщенные зерна различных злаков. Условно ферментным препаратом можно считать и ячменный солод, в котором содержится до 1 % амилаз. Растительная протеаза – папаин – содержится в плодах дынного дерева. Папаин, а также протеазы фицин и бромелаин при контакте с мясом в течение 2 ч при комнатной температуре расщепляют белки соединительной ткани – коллаген и эластин. Из растительного сырья получают также фосфатазы, пероксидазы, уреазы, гемицеллюлазы и другие ферменты.

Органы и ткани **животных** (поджелудочная железа, слизистые оболочки желудков и тонких кишок свиней и т.п.), содержащие ферменты, на мясоперерабатывающих комбинатах консервируют и используют для получения ферментов. Из слизистой желудка свиней и крупного рогатого скота получают препарат пепсина. Из поджелудочной железы свиней получают панкреатин, смеси трипсина, химотрипсина, липаз и амилаз. Пепсин, трипсин и химотрипсин применяют для размягчения мяса, однако бόльший эффект получен при обработке мяса панкреатином. Из желудка (сычуга) молодых телят выделяют сычужный фермент (реннин), широко используемый в сыроделии. Сычужный фермент осуществляет процесс превращения жидкого молока в гель (сгусток), а кроме того участвует в протеолизе, происходящем в сыре при созревании.

**23.** В специально созданных условиях микроорганизмы способны синтезировать огромное количество разнообразных ферментов. Они неприхотливы к составу питательной среды, легко переключаются с синтеза одного фермента на другой и имеют сравнительно короткий цикл роста (16-100 часов). Продуцентами ферментов могут быть различные микроорганизмы: бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты. Микроорганизмы могут синтезировать одновременно целый комплекс ферментов, но есть и такие, особенно среди мутантных штаммов, которые являются моноферментными и образуют в больших количествах только один фермент. Микробные клетки содержат или продуцируют более двух тысяч ферментов, катализирующих биохимические реакции, связанные с ростом, дыханием и образованием продуктов. Многие из этих ферментов могут быть легко выделены и проявляют свою активность независимо от того, находятся ли они внутри клетки или в культуральной жидкости.

Производство ферментных препаратов осуществляется и поверхностным, и глубинным способами. При поверхностном способе в качестве продуцентов используются грибы. Основой почти всех сред являются увлажненные пшеничные отруби. Глубинный способ выращивания принципиальных отличий от поверхностного не имеет. Культивирование проводят в жидких средах, а продуцентами могут быть и бактерии.

**Система названия** ферментных препаратов учитывает: основной фермент, источник получения и степень очистки. Чаще классифицируют по основному компоненту в смеси ферментов, присутствующих в данном препарате: амилолитические, протеолитические, липолитические и т.д.

Наименование каждого препарата включает сокращенное название основного фермента, затем добавляется видовое название продуцента, закан-чивается название препарата суффиксом "ин". Например, амилолитические препараты, получаемые из культур Aspergillus oryzae и Bacillus subtilis, называются соответственно амил-ориз-ин (амилоризин) и амил-о-субтил-ин (амилосубтилин).

При глубинном способе культивирования после названия ставится буква Г, а при поверхностном - П. После букв Г или П может стоять цифра, обозначающая степень чистоты препарата. Индекс 2х обозначает жидкий неочищенный концентрат исходной культуры; 3х - сухой ферментный препарат, полученный высушиванием распылением неочищенного раствора фермента. Индекс 10х означает сухие препараты, полученные осаждением ферментов орг. р-лями или методом высаливания; цифрами 15х, 18х, 20х обозначают препараты, частично освобожденные не только от балластных веществ, но и от сопутствующих ферментов; выше 20х - высокоочищенные и даже гомогенные ферментные препараты.