

Стадии
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
ПРОЦЕССА. СОСТАВЫ
ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
МИКРООРГАНИЗМОВ

СТАДИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

- Большое разнообразие биотехнологических процессов, нашедших промышленное применение, приводит к необходимости рассмотреть общие, наиболее важные проблемы, возникающие при создании любого биотехнологического производства. Процессы промышленной биотехнологии разделяют на 2 большие группы: производство биомассы и получение продуктов метаболизма. Однако такая классификация не отражает наиболее существенных с технологической точки зрения аспектов промышленных биотехнологических процессов. В этом плане необходимо рассматривать стадии биотехнологического производства, их сходство и различие в зависимости от конечной цели биотехнологического процесса.

- Биотехнологические производства являются весьма перспективными, что обусловлено их компактностью, крупномасштабностью, высоким уровнем автоматизации и высокой производительностью труда.
- Процессы биотехнологических производств разнообразны, но все они имеют пять общих основных стадий, которые различаются по целям и принципам их достижения. Общая биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза приведена на рис. 1.
- **1) Получение посевного материала.** Посевной материал представляет собой чистую культуру микроорганизмов-продуцентов, размноженную в лабораторных условиях при оптимальном составе питательной среды и режиме выращивания. Культуры микроорганизмов-продуцентов заводы получают из коллекций в пробирках на агаризованных питательных средах или в ампулах. Чистая культура микроорганизма может постоянно или по мере необходимости использоваться в производстве. Сначала культуру размножают в лаборатории, затем в цехе чистых культур и инокуляции, далее направляют на культивирование.



- **2) Приготовление питательной среды** – включает смешивание компонентов и стерилизацию. Основу питательных сред для культивирования микроорганизмов составляют источники углерода. Существуют микроорганизмы, способные потреблять углерод только из высокомолекулярных соединений, например белков и пептидов, в то же время многие бактерии и дрожжи утилизируют простейшие углеродосодержащие соединения - метан, этанол, углекислоту. Кроме углерода клетки микроорганизмов нуждаются в источниках азота, фосфора, макро- и микроэлементов. Вещества этого рода находятся в питательных средах в виде солей, в некоторых случаях азот и фосфор могут усваиваться из органических источников, например автолизатов и гидролизатов микробного или животного происхождения.
- Смешивание питательных веществ проводится в реакторах с мешалкой. Растворимые компоненты среды предварительно растворяют в воде. Нерастворимые компоненты (например, кукурузную, соевую муку, мел) – суспензируют. Составление среды считается законченным, если в результате произведено тщательное измельчение ее твердых компонентов.
- Завершающий этап приготовления питательной среды – стерилизация. Наиболее широкое распространение получила термическая стерилизация. Важнейшей проблемой при этом является сохранение питательных свойств среды, так как большинство субстратов, особенно углеводы, оказываются термически нестабильными. Некоторые субстраты не требуют стерилизации, так как сами обладают асептическим действием: метанол, этанол, уксусная кислота и др.

- **3) Ферментация** (культивирование) - это вся совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и стерилизованную питательную среду инокулята (посевого материала) до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие исчерпывания питательных веществ среды. Существует два типа ферментаций: получение биомассы микроорганизмов и получение ценных веществ, возникающих в ходе
- роста или на последующих стадиях развития культуры.
- **4) Выделение целевого продукта.** Стадия выделения и очистки 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* - осуществляется несколькими методами (флотация, фильтрация, центрифугирование). Если целевой продукт содержится в самих *клетках*, то проводят разрушение клеток - дезинтеграцию - физическими, химическими и химико-ферментативными способами.
- Выделение продукта из *культуральной жидкости или гомогената* разрушенных клеток проводят путем его осаждения, экстракции или адсорбции. Затем выделенный продукт *концентрируют* ультрафильтрацией, выпариванием или обратным осмосом. После стабилизации продукта в зависимости от того, каким должен быть конечный продукт: сухим или жидким, его обезвоживают или сразу упаковывают и отправляют на хранение и далее - потребителю.



Питательная среда

Питательная среда — вещество или смесь веществ, применяемая для культивирования макро- и микроорганизмов. Существует множество стандартных биологических питательных сред.

Требования, предъявляемые к средам

быть **питательными**, то есть содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят *факторы роста* — витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать.

иметь **оптимальную** концентрацию водородных ионов — рН, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.



Для большинства патогенных бактерий оптимальна слабощелочная среда (рН 7,2—7,4). Исключение составляют холерный вибрион — его оптимум находится в щелочной зоне (рН 8,5—9,0) и возбудитель туберкулёза, нуждающийся в слабокислой реакции (рН 6,2—6,8). Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН, среды должны обладать *буферностью*, то есть содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена. быть **изотоничными** для микробной клетки; то есть осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальная среда, соответствующая 0,5 % раствору натрия хлорида.

быть **стерильными**, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды.

плотные среды должны быть **влажными** и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию.

обладать определённым **окислительно-восстановительным** потенциалом, то есть соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 . Например, анаэробы размножаются при RH_2 , не выше 5, а аэробы — при RH_2 не ниже 10.

быть по возможности **унифицированным**, то есть содержать постоянное количество отдельных ингредиентов.

Желательно, чтобы среды были *прозрачными* — удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

Классификация

По исходным компонентам:

натуральные среды — готовят из продуктов животного и растительного происхождения (мясо, асцит, костная мука, кормовые дрожжи, сгустки крови и др.)

синтетические среды — готовят из определённых химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворённых в дважды дистиллированной воде

По консистенции (степени плотности):

жидкие

полужидкие

плотные

Плотные и полужидкие среды готовят из жидких, к которым прибавляют агар-агар или желатин. Кроме того, в качестве плотных сред применяют коагулировавшие яичные или сывороточные белки, картофель, среды с силикагелем. *Некоторые микроорганизмы используют желатин как питательное вещество — при их росте среда разжижается.*

По составу:

простые: мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), питательный желатин,

сложные — готовят, прибавляя к простым средам аминокислоты, витамины, микроэлементы и другие вещества.

По назначению:

основные — служат для культивирования большинства микроорганизмов, например МПБ, МПА, бульон, шоколадный агар, пептонная вода.

специальные — служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах.

элективные (избирательные) — служат для выделения определённого вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Среда становится элективной при добавлении к ним определённых антибиотиков, солей, изменения pH. Жидкие элективные среды называют средами *накопления*.

дифференциально-диагностические — позволяют отличить один вид микробов от другого по ферментативной активности.

консервирующие — предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала.

Приготовление сред

Посуда для приготовления сред

Посуда для приготовления сред не должна содержать посторонних веществ, например щелочей, выделяемых некоторыми сортами стекла, или окислов железа, которые могут попасть в среду при варке её в ржавых кастрюлях. Лучше пользоваться стеклянной, эмалированной или алюминиевой посудой. Перед употреблением посуду необходимо тщательно вымыть, прополоскать и высушить. Новую стеклянную посуду предварительно кипятят 30 минут в 1-2% растворе хлороводородной кислоты, после чего в течение часа прополаскивают в проточной воде.

Сырьё

Исходным сырьём для приготовления большинства сред служат продукты животного и растительного происхождения, а также готовые полуфабрикаты.

Этапы приготовления

варка: среды варят на открытом огне, водяной бане, автоклаве или варочных котлах.

установление рН: ориентировочно производят с помощью индикаторной бумаги, для точного определения пользуются потенциометром или компаратором. При стерилизации рН снижается на 0,2, поэтому сначала готовят более щелочной раствор.

осветление производят, если при варке среды мутнеют или темнеют. Для этого используют белок куриного яйца или сыворотку крови.

фильтрация жидких и расплавленных желатиновых сред производят через влажный бумажный или матерчатый фильтры. Фильтрация агаровых сред затруднена — они быстро застывают. Обычно их фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

разливают среды не более чем на $\frac{3}{4}$ ёмкости, так как при стерилизации могут намочить пробки и среды утратят стерильность.

стерилизация: режим стерилизации зависит от состава среды и указан в её рецепте.

контроль

для контроля *стерильности* среды ставят на 2 суток в термостат, после чего их просматривают.

химический контроль окончательно устанавливает рН, содержание общего и амминого азота, пептона, хлоридов.

для *биологического* контроля несколько образцов среды засевают специально подобранными культурами, и по их росту судят о питательных свойствах среды.

- При получении питательных сред основное внимание должно уделяться источникам азота. Все искусственные питательные среды, как изготовляемые в лаборатории, так и выпускаемые централизованно, имеют азотсодержащие вещества. В качестве азотистого субстрата для изготовления питательных сред служат в основном белки животного происхождения — молоко, казеин, мясо, рыба, мясокостная мука и др. С не меньшим успехом для этой цели используют дрожжи, а также белки растительного происхождения — соевые бобы, горох, ячмень, кукурузу и т. п. В синтетических средах, составляемых из строго определенных химических веществ, источниками азотистого питания являются различные аминокислоты. Для нормального развития микроорганизмов питательные среды должны содержать минеральные вещества (железо, медь, марганец и др.), соединения хлора, фосфора, натрия, калия, кальция, магния и др., а также вещества, называемые факторами роста. К последним относятся в основном витамины группы В. Они выполняют функцию регуляторов и стимуляторов обмена веществ у микробов, главным образом для построения активных групп ферментов. Их отсутствие ведет к нарушению обмена и прекращению роста.

- Питательные среды могут иметь различное назначение. Имеются питательные среды для культивирования чистых культур микроорганизмов, питательные среды, которые применяют для количественного учета или выделения определенных видов микроорганизмов из образца, обсемененного большим количеством посторонней микрофлоры.

- Классификации питательных сред для культивирования бактерий. Классификация сред для бактерий.
Искусственные питательные среды для бактерий.
Естественные среды для выращивания бактерий. Среды классифицируют по консистенции, составу, происхождению, назначению и загрязнённости материала. При классификации питательных сред по консистенции питательные среды разделяют на плотные (твёрдые), полужидкие и жидкие. При классификации питательных сред по составу выделяют белковые, безбелковые и минеральные среды. При классификации питательных сред по происхождению среды разделяют на искусственные и естественные (природные).
Искусственные питательные среды для бактерий
Искусственные среды разделяют на животные [например, мясопептонный агар (МПА) или мясопептонный бульон (МПБ)] и растительные (например, настои сена и соломы, отвары злаков, дрожжей или фруктов, пивное сусло и др.).

- Естественные среды для выращивания бактерий
Естественные питательные среды могут содержать компоненты животного (например, кровь, сыворотка, жёлчь) или растительного (например, кусочки овощей и фруктов) происхождения. По назначению выделяют консервирующие среды (для первичного посева и транспортировки), среды обогащения (для накопления определённой группы бактерий), среды для культивирования {универсальные простые, сложные специальные и для токсинообразования), среды для выделения и накопления (консервирующие, обогащения и селективные) и среды для идентификации (дифференциальные и селективно-дифференциальные).
Классификации питательных сред по загрязнённости материала Если материал слабо загрязнён посторонней микрофлорой, то для выделения чистых культур применяют простые (по составу) среды. При обильной контаминации сапрофитами используют специальные или селективные (для отдельных видов), селективные (только для отдельных бактерий), дифференциально-диагностические (для облегчения идентификации) среды.