

# Производственное культивирование микроорганизмов

Факторы, влияющие на  
биосинтез ферментов

Факторы, влияющие на биосинтез ферментов :

- Влажность питательной среды
- Аэрирование растущей культуры
- Длительность культивирования
- рН среды
- Температура культивирования

# Влияние влажности питательной среды

- Рост начинается при влажности свыше 30%
- При 40-45% - способствует обильному спороношению
- 53-68% - наибольшее накопление ферментов
- Важен продуцент, состав питательной среды, ее сыпучесть (рыхлость), интенсивность аэрации, длительность культивирования

# Аэрирование растущей культуры

- Преследует три цели: снабжение МО кислородом, удаление газообразных продуктов обмена, частичное снятие или отвод тепла
- При поверхностном культивировании расход воздуха для снятия тепла примерно в 100 раз превышает физиологическую потребность МО
- Очень важно при глубинном культивировании – ***Trichoderma longibrachiatum*, колба на 750 мл, при 200 мл питательной среды протеолитическая активность примерно 25% от мах, при 25 мл-близка к 100 %.**
- Количество воздуха определяется степенью растворения кислорода в среде, зависит от вязкости среды и конструктивных особенностей ферментера.

## Длительность культивирования

- Зависит от состава среды, способов ее подачи, степени аэрирования, от свойств продуцента, от величины посевной дозы
- Подпитка в начальной стадии роста – сокращение на 30-40%
- ***Bacillus mesentericus*** - 36 час.
- ***A. awamori*** – 150 час.

## Влияние pH среды

- При ПК –
- pH 4,5-5,0-5,6
- Увлажнение питательной среды растворами соляной, серной и молочной кислот
- При ГК
- Грибы и дрожжи – pH 3,8-5.6
- Бактерии - 6,2-7,4
- Обязательно определять pH среды после стерилизации!!!

## Влияние температуры культивирования

- Для большинства МО 28-32 С
- ***B.mesentericus*** 37 С
- ***B.diastaticus*** 60-65 С
- ***A.oryzae*** 28-30 С
- Культивирование при высоких Т создает селективные условия для развития МО и позволяет снизить требования к стерильности процесса

# Поверхностное культивирование

- культивирование в поверхностном слое питательной среды. Применяется для выращивания строгих аэробов - грибов рода *Aspergillus*, *Rhizopus* и др.

## Виды поверхностного культивирования

### На плотных средах

(влажность 56 – 65%):

отруби, отходы пивоваренного производства - солодовые ростки, просяная и соевая мука и т.д

Для аэрации вносятся опилки (10-20%), разрыхляющие среду.

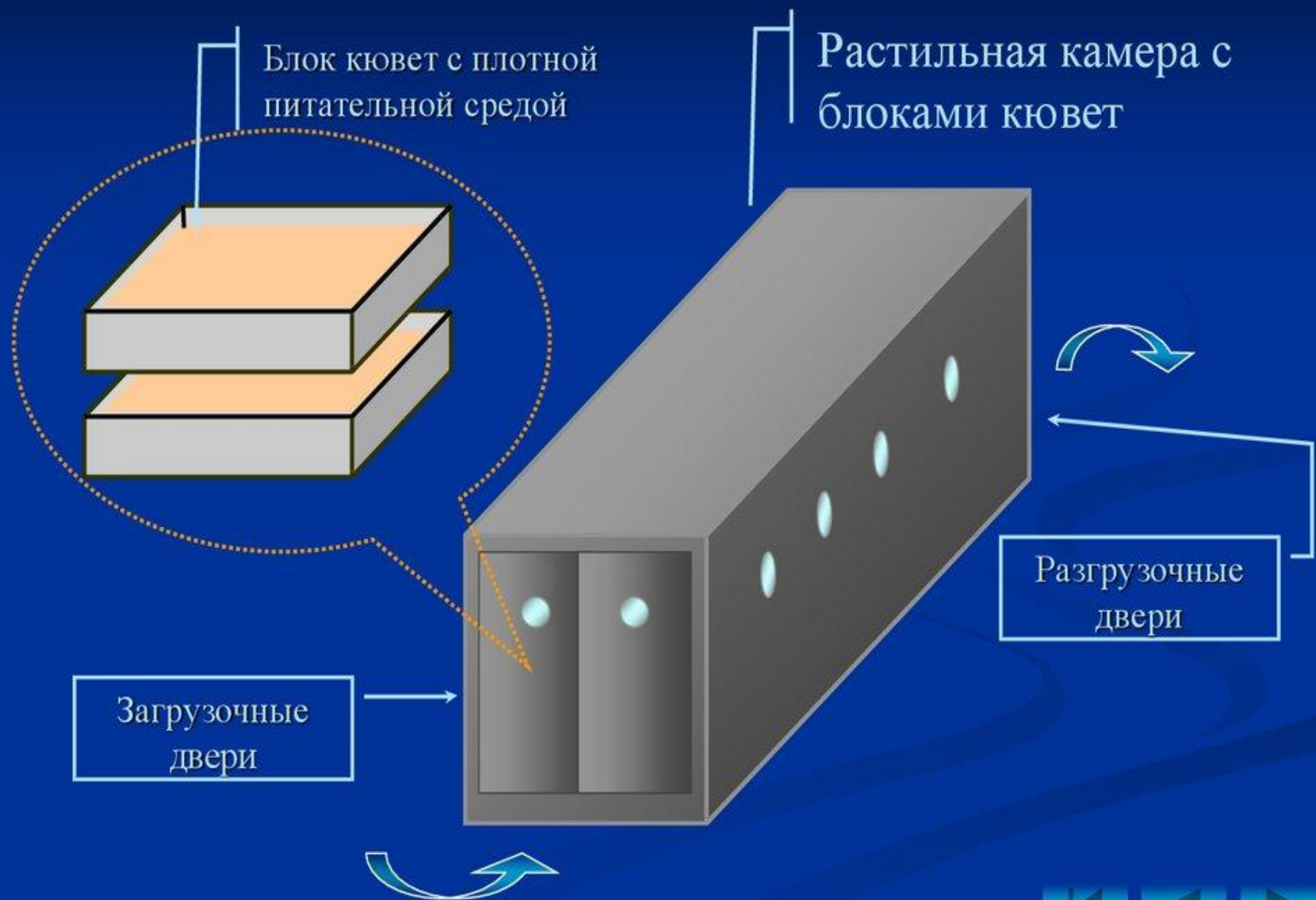
### В жидких средах

микроорганизмы развиваются в верхнем слое жидкости.

неполное использование питательной среды, слабое развитие продуцента, будет, незначительный выход целевого продукта

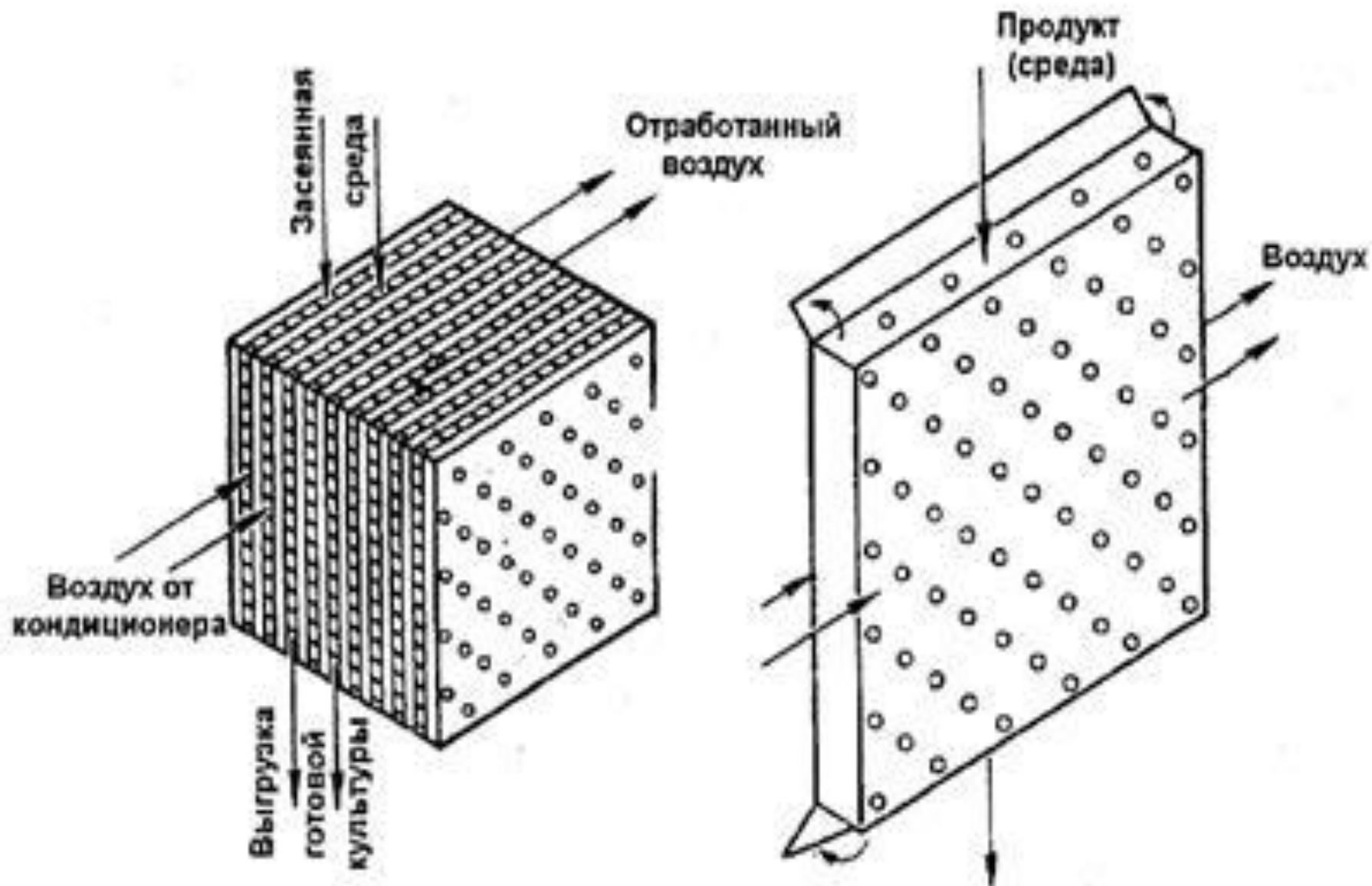


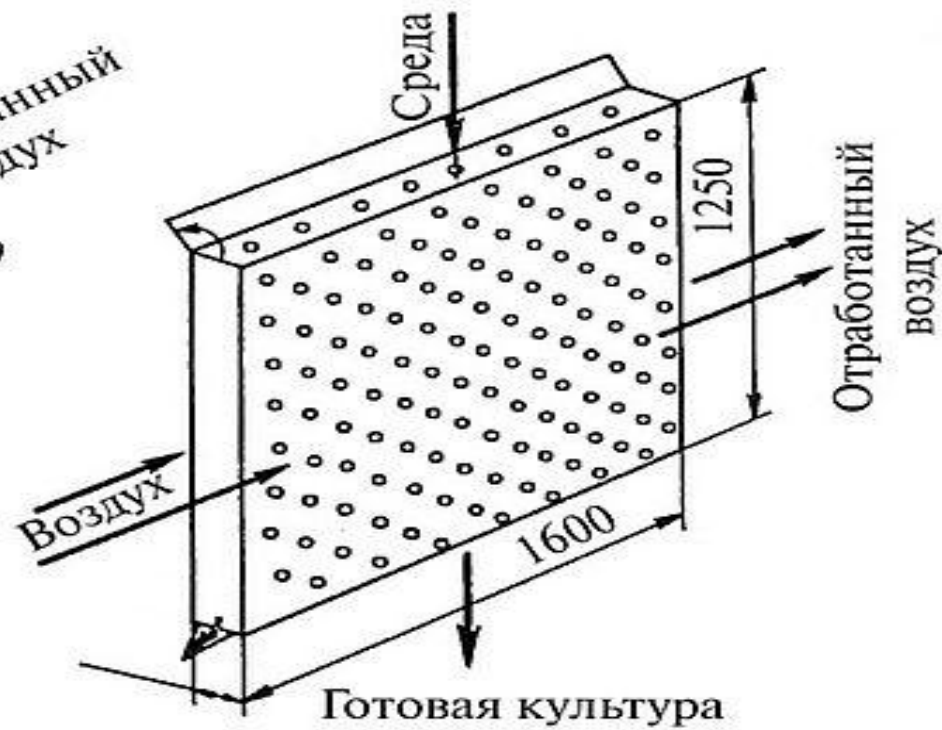
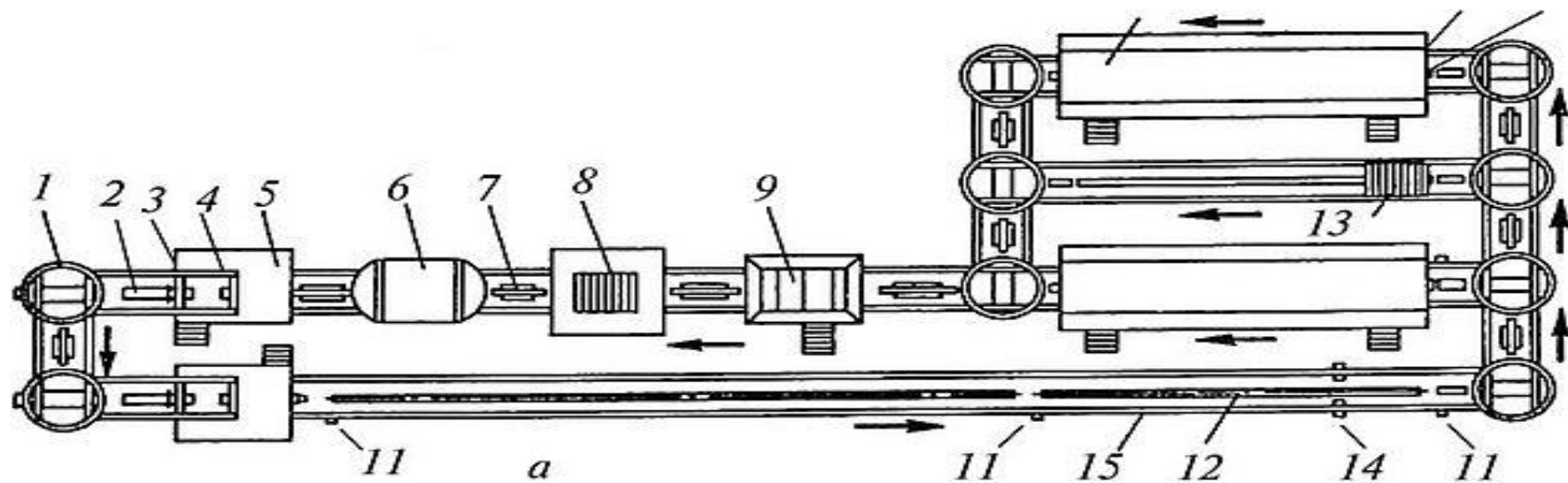
# Устройства для поверхностного культивирования



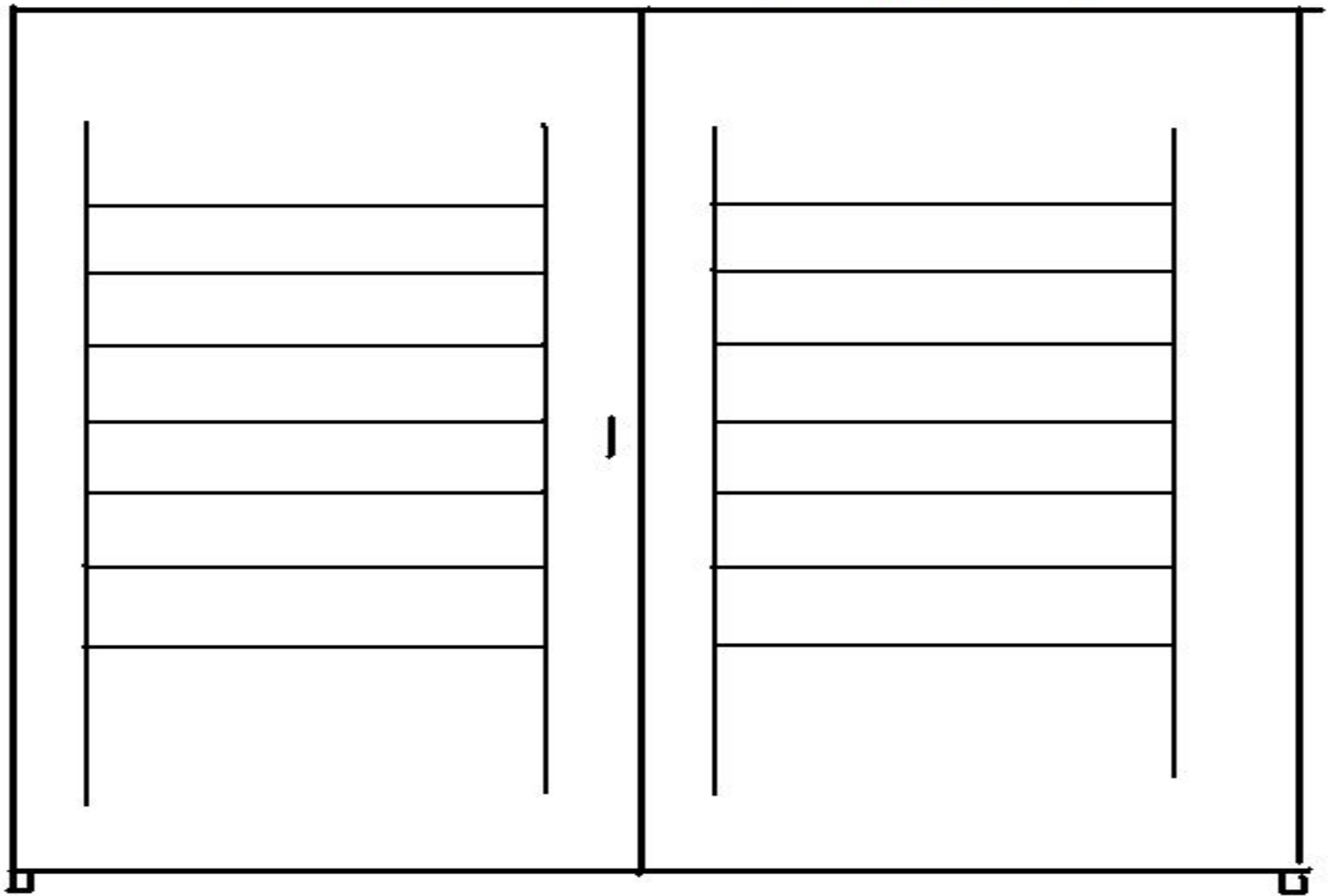
## Кюветный способ

- Кювета – лист металла с перфорированным дном , 0,25-0,50 кв.м и 20-50 мм;
- Перфорация – узкие длинные щели в шахматном порядке;
- Стерильные кюветы заполняют средой 2-2,5 см и ставят в растительную камеру высотой 2 м, 18 ярусов, первая кювета на 20-25 см от пола;

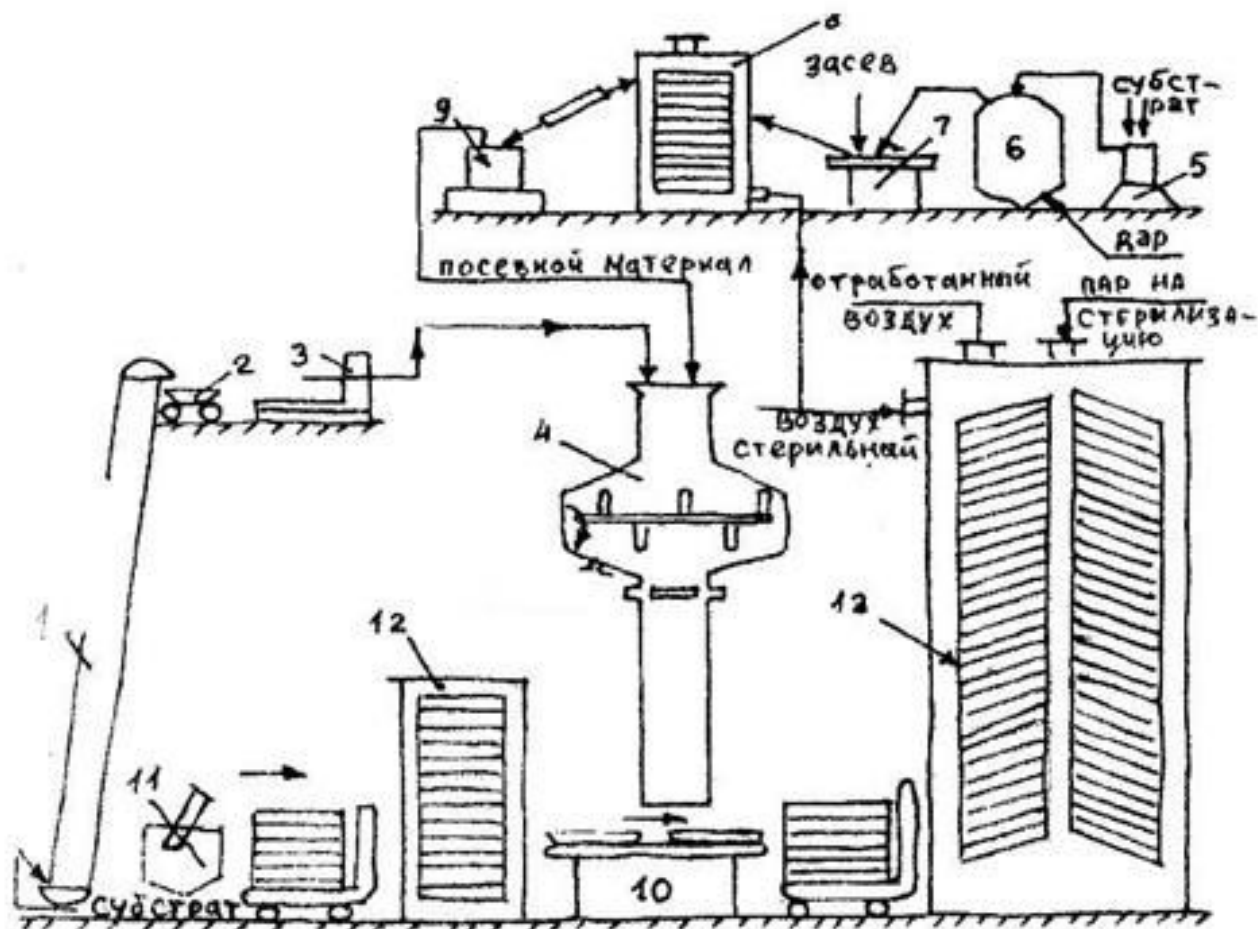




**T = 30-32 °C**







1 – нория, 2 – тележка для перевозки субстрата, 3 – дозирующие весы, 4 – стерилизатор питательной среды, 5 – дозатор питательной среды, 6 – стерилизатор питательной среды, 7 – аппарат для засева кювет, 8 – камера для выращивания посевного материала, 9 – дозатор посевного материала, 10 – раздаточный стол, 11 – ванна для мытья кювет, 12 – камера для выращивания кювет.

# Поверхностный метод культивирования продуцентов ферментов

- При поверхностном методе культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды. Мицелий полностью обволакивает и довольно прочно скрепляет твердые частицы субстрата, из которого получают питательные вещества. Поскольку для дыхания клетки используют кислород, то среда должна быть рыхлой, а слой культуры-продуцента небольшим.
- Выращивание производственной культуры происходит обычно в асептических условиях, но среду и кюветы необходимо простерилизовать. Перед каждой новой загрузкой также необходима стерилизация оборудования.
- Преимущества поверхностной культуры: значительно более высокая конечная концентрация фермента на единицу массу среды (при осахаривании крахмала 5 кг поверхностной культуры заменяют 100 кг культуральной жидкости), поверхностная культура относительно легко высушивается, легко переводится в товарную форму.



## Режим работы растительной камеры

- Загрузка, культивирование -20-72 час;
- Подсушка культуры сухим теплым воздухом 3-4 часа;
- Выгрузка, уборка и мойка камеры, обработка аммиаком, формалином и паром – 3 часа;
- Проветривание – 3час;
- Полный технологический цикл **36-90** часов в зависимости от вида продуцента;
- Культура измельченная-бункер-шнек-сушилка-фасовка-склад
- Вместимость камеры 500 кг по сухим отрубям

## Основные параметры поверхностного способа получения ферментов

Параметры стадии	Значения параметров
Продуценты	Микроскопические грибы родов <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Mucor</i> , <i>Fusarium</i>
Компоненты питательной среды	Пшеничные отруби, солодовые ростки, свекловичный жом, пивная дробина, опилки ( $W = 58...60\%$ )
Температура культивирования	$30...32 \rightarrow 28...30\text{ }^{\circ}\text{C}$
Режим аэрации	Кондиционированный воздух $W$ от 98...99 до 92...94 % и температурой от 30...32 $^{\circ}\text{C}$ до 28...30 $^{\circ}\text{C}$ , расход 0,1...0,2 м <sup>3</sup> / кг·ч
Продолжительность культивирования	От 36 до 52 ч в зависимости от продуцента
Содержание ферментов	0,006...0,007 % от массы сухих веществ

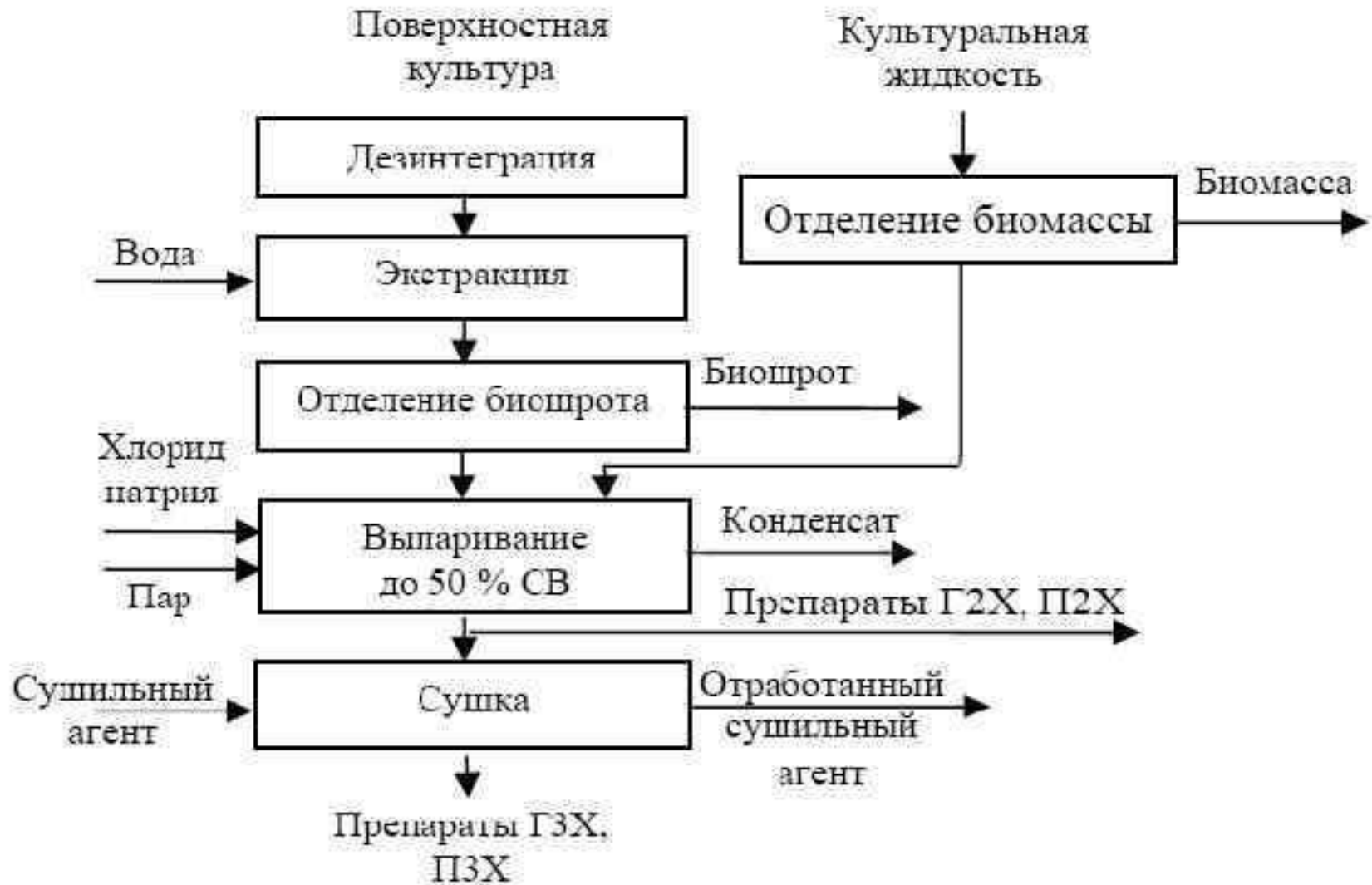
# Поверхностное культивирование продуцентов

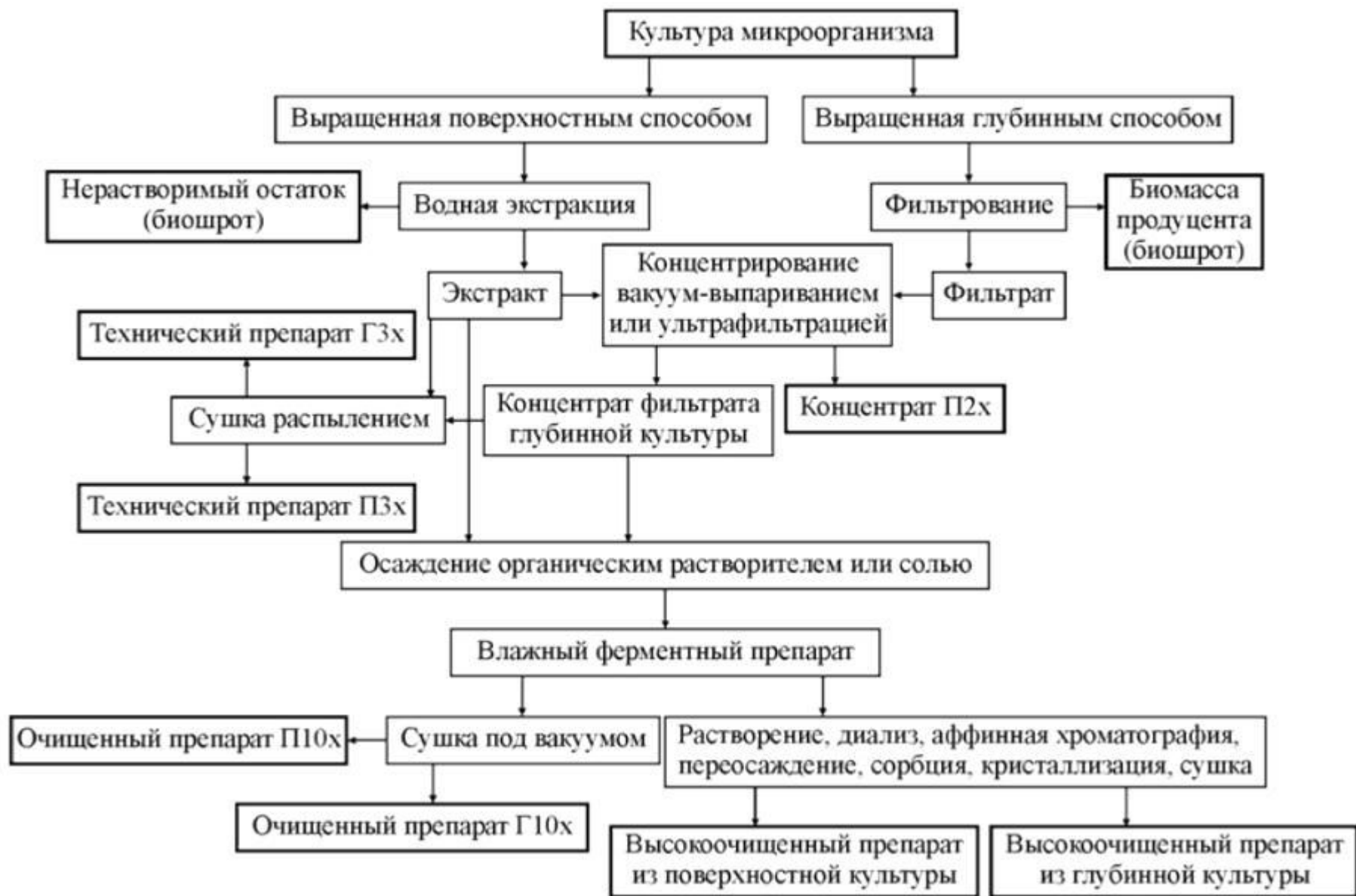
- Культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды.
- Среда должна быть рыхлой, а слой культуры-продуцента небольшим.
- Выращивание производственной культуры происходит в асептических условиях.
- Преимущества поверхностной культуры: значительно более высокая конечная концентрация фермента на единицу массу среды, легко высушивается, легко переводится в товарную форму.
- Посевной материал может быть трёх видов: культура, выросшая на твердой питательной среде; споровый материал; мицелиальная культура, выращенная глубинным способом.
- Основу питательной среды составляют пшеничные отруби. Для повышения активности ферментов можно добавлять свекловичный жом, соевый шрот, крахмал, растительные отходы.
- Стерилизуют среду паром при помешивании (температура - 105-140 С, время 60-90 минут). После этого среду засевают и раскладывают ровным слоем в стерильных кюветах в растительных камерах. Культивируют в течение 36-48 часов.

# Примеры производственного культивирования продуцентов ферментов поверхностным способом

Тип препарата	Продуцент	Состав среды	Параметры ферментации
Препараты $\alpha$ -амилазы	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus</i>	Пшеничные отруби с добавлением до 25% солодовых ростков; влажность среды (40-50)%	$t = (40-45)^\circ\text{C}$ $\tau = (36-48)$ час. $\text{pH}_{\text{нач.}} = 4,0-5,0$
Пектолитические препараты	<i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus foetidus</i>	Жом свекловичный (66-70%), отруби (30-35%), добавки $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , $\text{NH}_4\text{Cl}$ , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; влажность среды (55-60)%	$t = 30^\circ\text{C}$ первые час., затем $24^\circ\text{C}$ $\tau = (36-48)$ час. $\text{pH}_{\text{нач.}} = 4,0-5,0$
Целлюлолитические препараты	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Trichoderma lignorum</i> <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Пшеничные отруби (60-80%), солодовые ростки (20%), добавки свекловичного жома; лузги зерновых; соломы и др.; влажность среды (60-65)%	$t = (35-40)^\circ\text{C}$ $\tau = (55-65)$ час. $\text{pH}_{\text{нач.}} = 4,0-4,5$
Гемичеселлюлазные препараты	<i>Aspergillus foetidus</i> <i>Trichoderma roseum</i>	Зерновая шелуха (45%), солодовые ростки (45%), дрожжевой автолизат (10%); влажность среды (55-60)%	$t = (23-25)^\circ\text{C}$ $\tau = (50-65)$ час. $\text{pH}_{\text{нач.}} = 5,0-5,5$
Препараты протеиназ	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	Пшеничные отруби с добавлением до солодовых ростков, соевой муки и др.;	$t = (40-45)^\circ\text{C}$ $\tau = (36-48)$ час. $\text{pH}_{\text{нач.}} = 5,6-6,2$

# Схема получения препаратов неочищенных ферментов (препаратов с индексами П2Х, Г2Х, П3Х, Г3Х)





# Принципиальная технологическая схема получения ферментов

