**Завдання 3**

У ферментері 3 м3 поживного середовища аерується повітрям у об’ємі 200м3. Повітря було очищене від сторонньої мікрофлори на фільтрі з коефіцієнтом проскоку 10-4%. Стерилізація поживного середовища, що містило 105 кл/мл мікроорганізмів проводилася у режимі: нагрівання від 100 до 120оС на протязі 20хв, витримка 15хв, охолодження від 120 до 100оС на протязі 20хв. Визначте, чи є стерильною вся система у ферментері.

Для розрахунку ефективності режиму стерилізації потрібно визначити кількість мікроорганізмів, що лишилася у середовищі після стерилізації (N). Якщо цей показник менше 1 – режим стерилізації є ефективним і забезпечує знищення всієї мікрофлори.

1.  *C*0*V* exp()

Отже, необхідно визначити значення загального критерію стерилізації, що досягається в процесі стерилізації. Для цього необхідно визначити окремі критерії стерилізації при нагріванні, витримці, та охолодженні середовища у зазначеному режимі.

Нагрівання середовища від 100 до 120◦С відбувається впродовж 20 хв (тобто зі швидкістю 1◦С/хв), тому критерії стерилізації при нагріванні н визначаємо за таблицею. При температурі 120 ◦С вони становлять 7,550.

Охолодження середовища від 120 до 100◦С відбувається впродовж 20 хв (тобто зі швидкістю 1◦С/хв), тому критерії стерилізації при охолодженні ох буде мати аналогічне значення, як і для критерію стерилізації при нагріванні:

*н=**ох=*7,550

Критерій стерилізації при витримці середовища при температурі 120◦С розраховуємо, використовуючи дані табл.1 та формулу  *k*

 *В*  1, 480 15  22, 2

Таким чином загальний критерій стерилізації, що досягається при даному режимі становить:

 *н* *в* *ох*  7,55  22, 2  7,55  37,3

Перевіримо ефект стерилізації (враховуючи, що 1м3 =106 мл):

*N*  *C*0*V* exp()1053106exp(37,3)1,9105 *кл*

Отже, *N*  1,910-5, ( *N* 1) , що вказує на ефективність даного режиму для стерилізації поживного середовища з зазначеними показниками.

Для визначення ефективності очистки повітря при застосуванні певного фільтруючого матеріалу скористаємось формулою

*N = KnC0V10-2*,од

де *Kn* – коефіцієнт проскоку, *C0* – початковий вміст мікроорганізмів у повітрі (його приймаємо на рівні 2000 кл/м3 [4]), V – загальний об’єм пропущеного повітря.

*N = 10-4\*2000\*200\*10-2 = 0,4* ,од.

Як бачимо N < 1. Отже, очистка повітря є ефективною.

Висновок: загальна асептика процесу виробничого культивування, обумовлена ефективною стерилізацією поживного середовища та повітря, є задовільною при заданих параметрах.

**Завдання 1**

Бактерії роду Bacillus дуже ефективні для отримання амілолітичних ферментних препаратів, оскільки вони мають високу активність синтезованих амілаз серед бактеріальних культур. Істотною перевагою бактеріальної α-амілази - її термостабільність. Серед відомих продуцентів амілолітичних ферментів є Bacillus subtilis шт. 82, на прикладі якого буде досліджено раціональний склад поживного середовища. Це аеробні, грампозитивні, рухливі палички, які в якості джерела живлення можуть використовувати білки, вуглеводи, спирти, органічні кислоти.

Однією з умов отримання якісного мікробіологічного препарату є оптимальний склад поживного середовища, оскільки він безпосередньо впливає на продуктивність штамів [1, 2]. При підборі поживного середовища для культивування мікроорганізмів у промислових умовах необхідно враховувати те, що середовище має бути технологічним, дешевим, недефіцитним і в той же час має забезпечувати потреби мікроорганізмів у речовинах. Велике значення при цьому має не тільки концентрація кожного з компонентів середовища, а й їх співвідношення.

Амілази є індуцибельними ферментами, тому для синтезу цих ферментів необхідна присутність у середовищі речовин, що можуть бути субстратами для них - крохмаль, декстрин, мальтоза. Сильно впливає на синтез амілолітичних ферментів концентрація вуглеводів в середовищі. Глюкоамілаза в більші кількості синтезується в присутності 3% крохмалю, а для максимального накопичення альфа-амілази необхідна більш висока концентрація крохмалю.

Особлива роль джерел азотистого живлення в біогенезі амілолітичних ферментів: вони повинні складати приблизно 5% кількості вуглеводів. Вплив азотистих речовин на біосинтез ферментів залежить від природи джерел вуглецю. У деяких культур термофільних продуцентів ферментів синтез амілази стимулюється додаванням казеїнового гідролізату, якщо джерелами вуглецю служать гліцерин, глюкоза, сахароза та крохмаль. Добрими джерелами азоту для багатьох продуцентів амілолітичних ферментів є нітрати натрію і амонію в концентрації близько 1%. Це значно вище, ніж концентрація мінеральних солей азоту, необхідна для росту багатьох мікроорганізмів (0,1%). Таким чином, для росту продуцентів не потрібно високих концентрацій азоту, це необхідно для інтенсифікації процесу біосинтезу ферментів.

До складу цих поживних середовищ при культивуванні продуцентів амілаз обов'язково входять джерела вуглецевого і азотного живлення: кукурудзяний екстракт, дріжджі БВК, дріжджовий екстракт, меляса, кукурудзяна мука тощо, а також мінеральні регулятори росту. З метою збільшення амілолітичної активності продуцента, в середовище додатково вносять сечовину і барду.

Біосинтез амілолітичних ферментів тісно пов'язаний з присутністю солей магнію, фосфору, кальцію. Кількість магнію у вигляді сульфату - 0,05%. Фосфорних солей повинно бути більше - 0,1-0,2% . Кальцій - необхідний елемент у процесі синтезу амілаз, до складу яких він входить. Іони кальцію, які не впливають на активність α-амілаз, значно підвищують стабільність ферменту, до того ж потреба в іонах цього металу зростає з підвищенням температури інкубації. Він стабілізує вторинну і третинну структуру молекул α-амілази, забезпечуючи таким чином її каталітичну активність і разом з тим захищаючи фермент від дії протеолітичних ферментів і теплової денатурації (крохмаль, як специфічний субстрат α-амілази, також має високий стабілізуючий ефект). Кальцій вносять у поживне середовище у вигляді крейди, яка додатково нейтралізує кислоти, які утворюються, та регулює кислотність.

До складу регламентного ферментаційного середовища (АФ) для культивування Bacillus subtilis шт. 82 входять кукурудзяний екстракт, кукурудзяна мука і мінеральні солі. Істотним недоліком є кукурудзяна мука [3, 4], яка є, по-перше, високовартісною сировиною, а по-друге, ускладнює процес обробки біомаси при виділенні цільового продукту з культуральної рідини. У той же час, оскільки амілази відносяться до групи індуцибельних екзоферментів, доцільно в склад середовища ввести досить недорогу сировину, що містить крохмаль: відходи спиртового та зернового виробництва – спиртова барда і крохмальне молочко.

Крохмальне молочко у великих кількостях отримують в процесі відмивання клейковини з пшеничної муки і в подальшому не використовують. У той же час, суспензія містить до 10% розчину, який можна розглядати як джерело вуглеводного харчування при мікробіологічному синтезі.

Спиртова барда, завдяки вмісту клітковини, вуглеводів, білків і мікроелементів, є вторинним сировинним ресурсом. Вона містить вітаміни групи В, в продукті термолізу дріжджів-сахароміцетів знаходяться пептони, пептиди, поліпептиди. Таким чином, зернова барда являє собою цілком повноцінне в біологічному відношенні середовище.

Було проведено дослідження для визначення складу живильного середовища для культивування Bacillus subtilis шт. 82 з використанням відходів спиртового і зернового виробництва.

У складі дослідних поживних середовищ використовували: в одному випадку - крохмальне молочко, в іншому - спиртову барду, як джерел вуглеводного живлення. Склад середовищ, на яких проводили біосинтез, представлений в таблиці 1.

Таблиця 1

Склад контрольної та дослідних поживних середовищ для біосинтезу Bacillus subtilis 82

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Компоненти середовища | Контрольна, г/л | Дослідна 1  (крохмальне молочко),  г/л | Дослідна 2 (спиртова барда),  г/л |
| Кукурудзяна мука | 90,0 | 20,0 | 40,0 |
| Крохмальне молочко | - | 0,4 | - |
| Спиртова барда | - | - | 0,5 |
| Висівки | - | 5,0 | - |
| Кукурудзяний екстракт | 20,0 | 0,5 | 20,0 |
| MgSO4 | - | 4,0 | - |
| CaCl2 | - | 4,0 | - |
| Сечовина | 4,0 | 10,0 | 4,0 |
| (NH4)2HPО4 | 6,0 | 5,0 | 6,0 |
| CaCO3 | - | - | 4,0 |

За основний показник при оцінці впливу складу поживного середовища на процес біосинтезу приймалася ферментативна активність культури. На контрольному середовищі її показник склав 88,7 од / мл, на середовищі з крохмальним молочком - 112,3 од / мл, на середовищі із спиртовою бардою - 134, 8 од / мл.

В іншому дослідженні вивчався вплив заміни кукурудзяної муки в складі живильного середовища на різні концентрації крохмального молочка, що є відходом при виробництві клейковини пшениці. Компоненти і склад напівсинтетичних поживних середовищ для культивування Bacillus subtilis підбирали, виходячи з потреб культури у вуглеводному, азотному живленні, а також факторах росту. Склад різних варіантів напівсинтетичних поживних середовищ наведено в таблиці 2.

Таблиці 2

Склад напівсинтетичних поживних середовищ

для культивування Bacillus subtilis шт. 82

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Компоненти середовища, % | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6(К) |
| Кукурудзяний екстракт | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Крохмальне молочко | 65,0 | 65,0 | 50,0 | 65,0 | 40,0 | - |
| Кукурудзяна мука | - | - | 0,02 | - | 0,02 | 0,09 |
| Висівки | 0,01 | - | - | 0,05 | 0,05 | - |
| MgSO4 | 0,0005 | 0,0005 | 0,0005 | 0,0005 | 0,0005 | - |
| (NH4)2HPО4 | - | 0,01 | 0,01 | - | - | 0,01 |
| CaCl2 | - | 0,0001 | 0,0001 | - | - | 0,0001 |
| Сечовина | 0,04 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 |
| KCl | 0,0015 | 0,0015 | 0,0015 | 0,0015 | 0,0015 | - |
| Вода | До 100 | | | | | |
| Примітка: К -контроль (середовище АФ) | | | | | | |

Культуральна рідина, приготовлена ​​на основі середовища №4, з повною заміною кукурудзяної муки на крохмальне молочко і висівки за амілолітичної активності показала результат, близький до контролю. Культуральна рідина на середовищі №5 з концентрацією кукурудзяної муки в 4,5 рази менше, ніж в контролі, показала підвищення амілолітичної активності на 8,5% в порівнянні з регламентним середовищем. В таблиці 3 приведені результати досліду.

Таблиця 3

Порівняльна характеристика культивування штаму

Bacillus subtilis шт. 82 на різних середовищах

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Назва показнику | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Амілолітична  активність, од/мл | 55,45 | 55,27 | 57,45 | 101,6 | 111,53 | 102,76 |

Таким чином, використання відходів зернового і спиртового виробництва в складі поживних середовищ при отриманні амілолітичних ферментів, дає вихід продукту за ферментативної активності вище контрольних показників, що говорить про можливість використання таких середовищ в напівпромислових і промислових умовах для отримання цільового продукту.

Проаналізувавши всі данні можна дійти до висновку, що для культивування Bacillus subtilis шт. 82 найраціональніше поживне середовище буде зі спиртовою бардою наступного складу, що представлене в таблиці 4. На даному середовищі спостерігається найвища амілолітична активність, при чому знижується вартість середовища за рахунок заміни деякої частини високовартісної кукурудзяної муки на дешеві відходи спиртового виробництва – спиртову барду.

Таблиця 4

Найраціональніше поживне середовище для культивування Bacillus subtilis шт. 82

|  |  |
| --- | --- |
| Компоненти середовища | Концентрація компонентів,  г/л |
| Кукурудзяна мука | 40,0 |
| Спиртова барда | 0,5 |
| Кукурудзяний екстракт | 20,0 |
| Сечовина | 4,0 |
| (NH4)2HPО4 | 6,0 |
| CaCO3 | 4,0 |