

Міністерство освіти і науки України  
Дніпродзержинський державний технічний університет



І.В. Бондар, В.М. Гуляєв

# Промислова мікробіологія. Харчова і агробіотехнологія

*Навчальний посібник*

Дніпродзержинськ  
ДДТУ  
2004

І.В. Бондар, В.М. Гуляєв Промислова мікробіологія Харчова і агробіотехнологія. Навчальний посібник для студентів спеціальності 7.092901 – “Промислова біотехнологія.”. Дніпродзержинськ, видавництво ДДТУ, 2004. – 280 стор.

*В навчальному посібнику розглянуті основні біотехнологічні процеси виробництва в галузі харчової та агробіотехнології, наведена характеристика сучасного стану цих напрямків в біотехнології на Україні та пріоритетів розвитку, вказані шляхи утилізації та знешкодження відходів у відповідних біовиробництвах, приведена характеристика мікроорганізмів – продуцентів, обладнання, сировинної бази, розглянуті методи та шляхи вдосконалення біовиробництв.*

Рецензенти: Пирог Т.П. – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувач кафедри біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій (м. Київ);  
Клещов М.Ф. – доктор технічних наук, професор, завідувач кафедри біотехнології і аналітичної хімії Національного технічного університету „ХПІ” (м. Харків)

Рекомендовано Міністерством освіти і науки України як навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів, лист від 29.07 2004 року, № 14/18.2–1835.

Друкується за рішенням Вченої ради Дніпродзержинського державного технічного університету, протокол № 9 від 22.04.2004 р.

# Частина 1. БІОТЕХНОЛОГІЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

## Глава 1. ВИРОБНИЦТВО ХАРЧОВИХ КИСЛОТ

При вивченні біотехнологій органічних кислот слід розрізняти леткі та нелеткі кислоти. Стосовно деяких кислот цей поділ носить дещо умовний характер. Так, наприклад, молочна кислота, яка широко застосовується в народному господарстві, і має дуже важливе значення для медицини певною мірою летка, але її завжди відносять до фракції нелетких кислот. Молочна кислота утворюється в процесі зброджування вуглеводнів, і кількість останніх визначає швидкість її утворення.

Оцтова кислота має найбільше народногосподарське значення серед летких кислот. Оцет використовують як приправу до різних блюд, а також для виготовлення маринадів, гірчиці, соусів та ін.

Біосинтетична пропіонова кислота, яка широко застосовується в харчовій та фармацевтичній промисловості в якості консерванта, утворюється в результаті пропіоновокислого зброджування середовищ, що містять глюкозу, пропіоновокислими бактеріями *P. acnes*, *P. freudenreichii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionici*, *P. granulosum*.

Кінцеві продукти ферментації (пропіонат і ацетат) можна не відокремлювати, постільки обидві кислоти мають консервуючі властивості.

Молочна і пропіонова кислоти утворюються в анаеробних умовах, в той час як деякі інші органічні кислоти, такі як лимонна, глюконова та ітаконова і деякі інші утворюються в результаті окислювального (аеробного) процесу.

Маслянокисле бродіння викликають представники роду *Clostridium*. Воно відбувається в ґрунті, водоймах, силосних ямах.

В промисловості маслянокисле бродіння використовується для отримання масляної кислоти, а також зустрічається як побічне небажане явище.

Близьким за хімізмом варіантом маслянокислого зброджування являється ацетонобутилове бродіння. Маслянокислі і ацетонобутилові бактерії дуже схожі за морфолого-фізіологічними властивостями.

При ацетонобутиловому бродінні із попередників масляної кислоти утворюється ацетон і бутанол.

Цей вид бродіння викликається *Clostridium aurolutylicum*. Співвідношення продуктів маслянокислого і ацетонобутилового бродіння залежить не лише від видової приналежності мікроорганізмів, а і від умов, за яких воно відбувається (кислотності середовища, характеру джерела вуглецевого живлення та ін.).

В цьому розділі наводяться особливості біотехнологій отримання ряду харчових кислот (оцтової, молочної, глутамінової та ін.), які мають найважливіше народногосподарське значення.

## 1.1. Виробництво харчового оцту

### 1.1.1. Загальна характеристика виробництва

Виробництво оцту, як і виробництво вина, є одним із найстаровинніших технологічних процесів, освоєних людиною. Але якщо у виробництві вина за останні декілька тисячоліть не відбулося принципових змін (окрім сучасного обладнання), то у виробництві оцту в 70-ті роки ХХ сторіччя відбулася ціла революція.

Головним компонентом харчового оцту є оцтова кислота. Отримувати її можна двома способами: хімічним — із продуктів сухої перегонки деревини та мікробіологічним — в результаті оцтового збродження спиртовмісних рідин, таких, як: виноградне вино, сидр, пивне сусло, зброджений мед та соки різних фруктів або водний розчин етилового спирту (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH).

В таких рідинах окислення етанолу до оцтової кислоти в більшості випадків здійснюють оцтовокислі бактерії *Acetobacter aceti*. Реакція окислення виглядає наступним чином:



В результаті неповного аеробного окислення в готовому продукті опиняється не лише оцтова кислота, але і невелика кількість складних ефірів, альдегідів та інших органічних сполук. Завдяки присутності цих речовин харчовий оцет набуває властивого йому смаку та приємного аромату. Розбавлена ж водою оцтова кислота, отримана хімічним шляхом, не має таких властивостей.

Її використовують коли смак продукту не має першочергового значення.

Вважається, що в харчовій промисловості та в побуті краще використовувати оцет, виготовлений біотехнологічним шляхом.

*Оцет — простий у використанні консервант, який дозволяє зберігати частину вирощеного врожаю в консервованому вигляді та забезпечувати продуктами харчування протягом року.*

Біохімічний оцет впливає на процеси обміну речовин в організмі людини, що сприяє швидкому засвоєнню білків та вуглеводів.

В залежності від середовища, на якому культивуються оцтовокислі бактерії (ОКБ), розрізняють спиртовий, яблучний та вишневий оцет.

Оцет одержують періодичним або неперервним циркуляційним способом; періодичним або неперервним глибинним способом.

Перевага глибинного способу: можливість швидко перейти на виробництво іншого сорту оцту; більш висока (майже втричі) продуктивність; відсутність наповнювача, що дає змогу звільнитися від накопичення слизу та деяких форм ОКБ, які негативно впливають на вихід оцтової кислоти.

### **1.1.2. Історія виробництва**

Технологія виробництва оцту має цікаву та складну історію. Ще в першому тисячолітті до нашої ери винороби та пивовари помітили, що якщо вино або пиво залишити у відкритій ємності, вони часто скисають. Скисання обумовлене окисленням спирту до оцтової кислоти, яке здійснюють строго аеробні оцтовокислі бактерії. Спонтанне скисання вина лежить в основі тра-

диційного методу отримання оцту. (На французькій мові слово “оцет”, *vinagre*, означає буквально “кисле вино”).

Виробництво оцту все ще залишається в основному емпіричним процесом. Удосконалення, введені на протязі ХІХ сторіччя, стосувалися в основному механічних, а не мікробіологічних аспектів виробництва.

Один із самих “стародавніх” способів виробництва оцту прийнято називати “орлеанським”. В дерев’яні бочки особливої форми, розміщені в утепленому приміщенні в декілька рядів одна над одною, на початку процесу заливають 10—12 дм<sup>3</sup> готового нефільтрованого оцту. Ця порція слугує закваскою, адже в нефільтрованому оцті міститься достатньо велика кількість бактерій.

До оцту доливають близько 10 дм<sup>3</sup> профільтрованого вина, і так до тих пір, доки бочка не заповниться до половини об’єму. Після цього близько 40 дм<sup>3</sup> готового продукту зливають, а до залишку — знову добавляють фільтроване вино, і цикл повторюється. Весь цикл триває від тижня до місяця. Продукт має таку високу якість, що цей неефективний спосіб до цього часу використовується у виноробних районах Франції.

Поряд з орлеанським способом існує метод, описаний німецьким вченим Бургавом (Borghave) в 1972 році. Нині ця технологія відома під назвою “методу Шуценбаха”. Сутність методу полягає в тому, що спиртовмісну рідину (в описі Бургава це розчин хлібного спирту) пропускали зверху вниз через об’єм, заповнений ретельно вимоченими в оцті крупними стружками. Ця технологія була значно більш продуктивною, ніж орлеанський спосіб, і в цілому світі вона використовується до цього часу.

І все ж до робіт Пастера в середині XVIII сторіччя не було зрозуміло, за рахунок чого вино перетворюється в оцет. Пастер у великій статті “Дослідження властивостей оцту” (“Etude sur le vinaigre”) показав, що стерильний розчин спирту у воді на відкритому повітрі практично не окислюється, а утворення оцтової кислоти відбувається завдяки роботі оцтовокислих бактерій.

Для того, щоб спирт окислювався більш ефективно, в рідині необхідно створювати оптимальні умови для їх розвитку.

Найкраще оцтовокислі бактерії відчують себе за температури близько 30 °C та при концентрації спирту, що не перевищує 12—14 %. Сучасні дослідження показали, що максимальна швидкість росту *A. aceti* досягається при більш низькій концентрації спирту. Характерною особливістю цих бактерій являється їх висока потреба в кисні. Тривалий час вважали, що із-за низької розчинності кисню у воді (та в розчині етилового спирту) бактерії можуть розвиватися лише на поверхні рідини або в тонкій плівці.

Це не суперечило й промислового досвіду, що склався на той час. За орлеанським методом бактерії розвиваються в основному в верхньому шарі рідини у вигляді слизу, а за методом Шуценбаха рідина стікає тонким струменем по поверхні стружки. Продуктивність апаратури як за одним, так і за іншим методом звичайно складає від 2 до 8 кг 100 % оцтової кислоти з 1 м<sup>3</sup> об'єму апарату на добу.

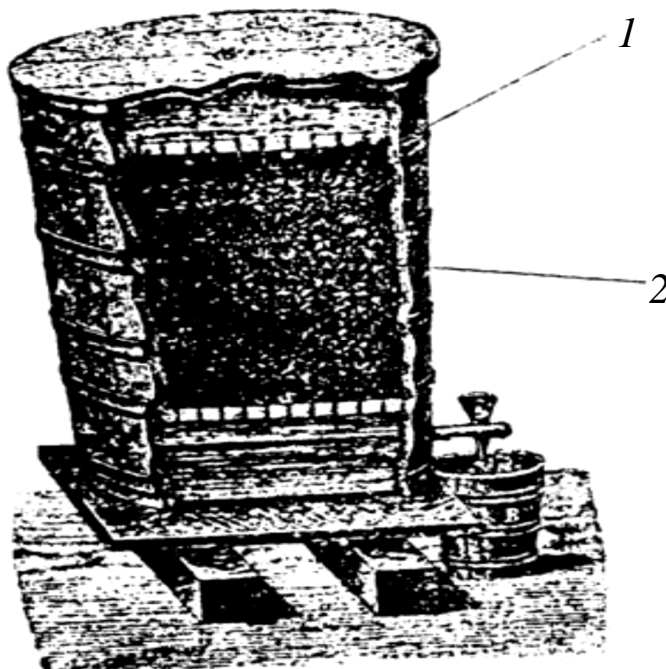
Основним апаратом, в якому отримують оцтову кислоту за методом Шуценбаха, є дерев'яний чан конічної форми. На відстані 200—300 мм від основного днища в ньому встановлюють горизонтальну перфоровану перегородку. Верхня частина апарату на 2/3 заповнюється стружками, які зрошуються поживним



для бактерій середовищем, що містить деяку кількість оцтової кислоти (частіше всього це 6 %-ний розчин) та невелику кількість амонійних та фосфатних солей. По мірі протікання розчину бактерії, іммобілізовані на стружці, окислюють спирт до оцтової кислоти. В нижній частині апарату накопичується готова продукція — 9 %-ний оцет. В процесі окислення виділяється тепло, яке підвищує температуру в апараті до 30—35 °С. В результаті різниці температур створюється досить інтенсивна конвекція. Повітря надходить в патрубки під несправжнім днищем, проходить через апарат і виходить у верхній його частині. Так здійснюється аерація, необхідна для ацидофільних бактерій.

Декілька слів необхідно сказати про стружку. Це не просто відходи від обробки деревини. Для завантаження в апарат підходить лише букова стружка, закручена в рулон діаметром від 2 до 5 см та висотою від 3 до 6 см. Суворі вимоги пред'являються і до деревини. Вона повинна бути без будь-яких слідів цвілі. Тобто стружка для оцтового виробництва — досить таки дорога річ. В апарат Шуценбаха завантажуються 1—1,5 м<sup>3</sup> стружок. На одному підприємстві працюють десять таких апаратів (рис.1).

Продуктивність апаратури при роботі за цим способом низька і становить не більше 1,5 кг оцтової кислоти на 1 м<sup>3</sup> стружок на добу (в перерахунку на 100 %-ну оцтову кислоту). При цьому вихід оцту (від теоретично можливого при використанні заданої кількості етилового спирту) не перевищує 75 %. Процес ведеться безперервно, протягом десятиріч, без зміни бактерій та стружки. Висока кислотність розчину, який заливається в апарат, необхідна для того, щоб інші бактерії не змогли “оселитись” в апараті та пошкодити таким чином продукт.



*Рис. 1.* Апарат Шуценбаха: 1 — дерев'яна конічна ємність; 2 — шар букових стружок

Це дає можливість вести виробництво оцту без дотримання стерильних умов. Єдиний супутник оцтовокислих бактерій в цьому процесі — дрібні нематоди — вугриці. Вони споживають бактерії та легко переносять високі концентрації оцтової кислоти. Оцет очищають від них фільтруванням після пастеризації, в результаті якої вони гинуть та випадають в осад.

### **1.1.3. Апаратурне оформлення процесу**

На сучасних підприємствах в більшості випадків виробництво оцту ведуть циркуляційним способом Фрінгса. Ця технологія має багато спільного з методом Шуценбаха. За нею також використовуються апарати, наповнені стружками, на стружках також

імобілізуються оцтовокислі бактерії і маса стружок також зрошується живильним розчином, що містить спирт, оцтову кислоту та мінеральні солі. Однак маються і суттєві відмінності між цими двома методами. Перш за все, це стосується розмірів апаратів. На деяких підприємствах ємність заповнення стружками робочої камери досягає  $60 \text{ м}^3$  (рис. 2), через спеціальну розподільну систему подають 10 %-ний розчин спирту із швидкістю, що в декілька разів перевищує швидкість за методом Шуценбаха.

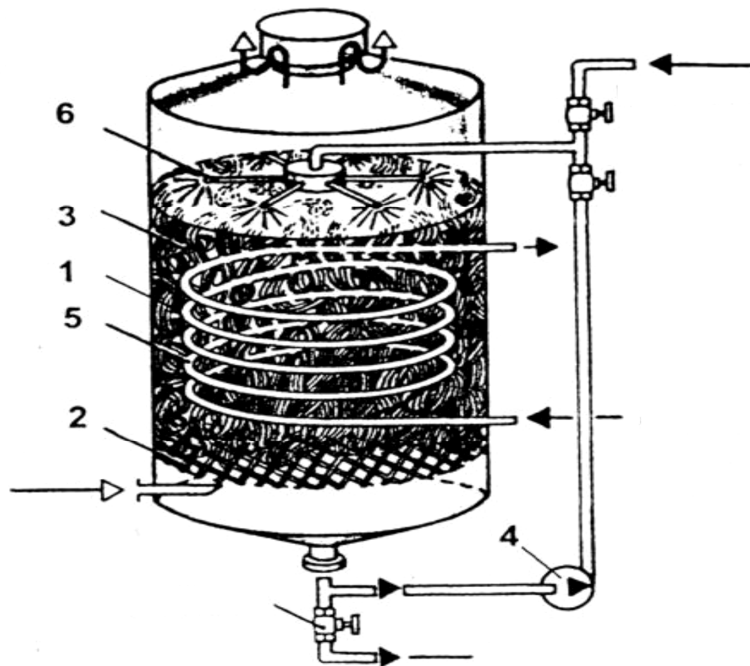


Рис. 2. Апарат Фрінгса: 1 — корпус; 2 — несправжнє перфороване днище; 3 — шар букових стружок; 4 — циркуляційний насос; 5 — змійовик системи термостатування; 6 — розподільний пристрій

За допомогою насоса розчин багаторазово циркулює через апарат до тих пір, доки весь спирт не окислиться і не утвориться 9 %-ний розчин оцтової кислоти. Близько 10 % спирту в ході цього процесу втрачається. Цикл триває 5—6 діб, після чого знову повторюється.

В апаратах великого ємності виділення тепла настільки інтенсивне, що в них потрібно вбудовувати спеціальні теплообмінники. Найчастіше в робочій камері розміщують змієвики, по яким циркулює охолоджена вода, але іноді доводиться вбудовувати ще й додаткові, виносні теплообмінники, які встановлюють зовні апарату в циркуляційному контурі.

При отриманні оцту циркуляційним способом питома продуктивність досягає 6—8 кг кислоти за добу з 1 м<sup>3</sup> робочої ємності апарату.

Але і цей метод має істотні недоліки, головним з яких є розмір апаратів. На початку шістдесятих років ХХ сторіччя оцтові бактерії почали культивувати в спеціальних апаратах — ферментерах, за методом періодичного зануреного культивування.

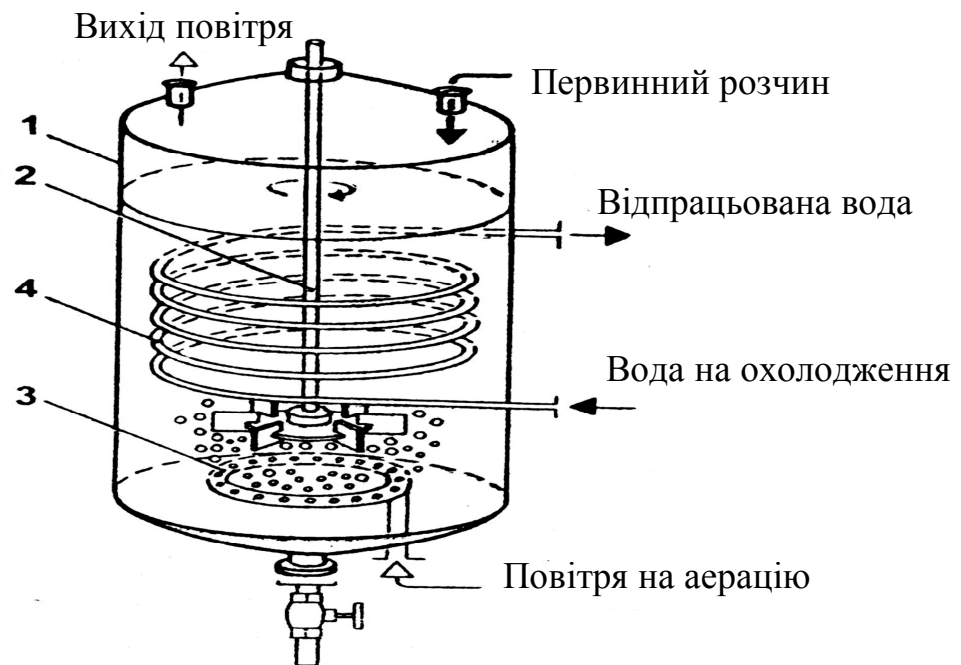


Рис. 3. Схема ферментера для виробництва оцту: 1 — корпус з нержавіючої сталі; 2 — пристрій, що перемішує; 3 — аератор (барботер); 4 — змієвик системи термостатування

Ферментери для зануреного культивування оцтовокислих бактерій — це ємності, вироблені із неіржавіючої сталі, всередині яких розміщуються перемішуючі устрої та аератори різних конструкцій.

Процес отримання оцту при періодичному зануреному способі заключається в наступному. Від попереднього циклу в апараті залишається рідина (близько  $1/3$  робочого об'єму апарату), яка слугує засівним матеріалом для наступного циклу. В апарат заливається до робочого об'єму живильна суміш, що містить оцтову кислоту та спирт. Перемішуючий устрій інтенсивно перемішує суміш, а через аератор безперервно подається повітря.

На початку циклу умови життя для бактерій різко змінюються, і в результаті деякий час не відбувається їх помітного росту (лаг — фаза життєвого циклу). По закінченню лаг — фази, концентрація спирту починає зменшуватися, а кислоти — навпаки, зростати. Деякий час в апарат порціями додають розчин спирту. Після того як концентрація оцту досягне 9—10 %, близько  $2/3$  об'єму рідини відбирається як готовий продукт, і цикл повторюється.

Продуктивність апаратів для зануреного культивування в декілька разів вища, ніж апаратів, заповнених стружками, в них значно нижчі втрати етанолу. Крім того, відпадає необхідність використання стружки із деревини.

Важливо й те, що при зануреному культивуванні зростає культура виробництва.

На початку 70-х років минулого сторіччя серед групи співробітників кафедри “Машини й апарати мікробіологічних виробництв” в Московському інституті хімічного машинобудування (тепер це Московський державний університет інженерної еколо-

гії), очолюваної професором Петром Івановичем Ніколаєвим, виникла ідея сумістити в промисловому масштабі мікробіологічні методи з прийомами постановки та ведення процесів, добре розроблених в хімічній технології. Для цього був проведений цілий комплекс досліджень. Вчені зіштовхнулися з парадоксом: незважаючи на те, що процес добре відомий вже як мінімум протягом двох з половиною тисячоліть, але до середини ХХ сторіччя він залишався в основному емпіричним. До цього моменту удосконалення технологій стосувалося перш за все устрою апаратів, а мікробіологічні аспекти розроблялися досить слабо.

В 60-ті роки почали з'являтися роботи, присвячені фізіології та біохімії оцтовокислих бактерій. Вони були напрямлені на вивчення впливу концентрації кисню та складу середовища живлення, включаючи як мінеральний фон, так і вплив етанолу та самої оцтової кислоти.

В той же час на кафедрі мікробіології Ленінградського університету під керівництвом професора М.С. Лойцянської були проведені дослідження систематики, морфології та фізіології цих бактерій. Були виділені штами цих бактерій, здатні рости в дуже простому за складом середовищі, яке має значну окислювальну активність, що явилось досить корисним для промислового виробництва оцту.

Оптимальна температура для росту *Acetobacter aceti* — 25-30 °С. Джерелом азоту для оцтовокислих бактерій являються мінеральні солі, передусім амонійні.

Ацетобактерії самі синтезують всі необхідні вітаміни і тому ростуть в живильних середовищах без цих сполук.

Кращою сполукою вуглецю для бактерій роду *Acetobacter* слугує оцтова кислота. Добре ростуть вони також в середовищах, що містять етиловий спирт або молочну кислоту, перетворюючи їх в оцтову. Ацетобактерії інтенсивно ростуть на поверхні рослин, головним чином на квітах та плодах та як вторинна мікрофлора на загниваючих залишках рослин за аеробних умов одразу за першочерговим збродженням цукрів дріжджами.

Клітини оцтовокислих бактерій ацидофільні, вони ростуть при досить низьких значеннях рН (близько 4,0) з оптимумом рН між 5,0 та 6,0.

Два роди оцтовокислих бактерій — *Glukonobacter* та *Acetobacter* відрізняються за характером розташування джгутиків та за ступенем окислення субстрату.

У бактерій групи *Glukonobacter* не функціонує цикл трикарбонових кислот, і вони не здатні окислювати ацетат, замість цього вони окислюють етиловий спирт (та інші субстрати, які можуть перетворюватися в ацетат) та накопичують в стехіометричних кількостях оцтову кислоту. У зв'язку з цим у виробництві оцтової кислоти бактерії групи *Glukonobakter* називаються недоокислювачами.

У бактерій групи *Acetobacter* цикл трикарбонових кислот функціонує, і тому вони можуть окислювати ацетат до  $\text{CO}_2$ .

При рості на середовищах, що містять спирт, ці бактерії швидко перетворюють його в оцтову кислоту, яка потім з меншою швидкістю окислюється до кінця і завдяки цій властивості такі бактерії отримали назву переокислювачів.

За винятком цієї відмінності, окислювальний метаболізм всіх оцтовокислих бактерій подібний та має ряд незвичних влас-

тивостей. Цукри окислюються до  $\text{CO}_2$  виключно за пентозофосфатним шляхом, тому що шлях Етнера-Дудорова, характерний для аеробних хемогетеротрофів, у бактерій цієї групи не діє. Метаболізм пірвіноградної кислоти також незвичний; в той час як у більшості аеробів піруват окислюється до ацетил-КоА та  $\text{CO}_2$ , оцтовокислі бактерії декарбоксілюють його до ацетальдегіду неокислювальним шляхом. Окрім первинних спиртів, що окислюються з накопиченням відповідних карбонових кислот (прикладом чого слугує окислення етилового спирту до оцтової кислоти), оцтовокислі бактерії здатні окислювати до кетонів багато вторинних спиртів. При цьому окислюються лише поліспирти.

З сучасної точки зору, окислення етанолу оцтовокислими бактеріями *Acetobacter aceti* — двохфазний процес. Етанол окислюється алкоголь- та альдегідгідрогеназами з утворенням оцтової кислоти та двох молекул  $\text{НАДН}_2$ . (Цей фермент відповідає за перенесення водню в ланцюзі дихання).

Алькогольдегідрогеназа *Acetobacter aceti* містить недавно відкриту простетичну групу метоксантин, або піролохінолінхінол. Цей фермент знаходиться на зовнішній стороні плазматичної мембрани та каталізує окислення етанолу до оцтової кислоти. Метоксантин частково потрапляє в живильне середовище та в харчовий оцет, обумовлюючи його жовтуватий відтінок.

Дослідженнями Ю.Л. Ігнатова було показано, що накопичувана в процесі окислення оцтова кислота різко знижує окислювальну активність бактерій та зменшує питому швидкість росту клітин. Цей факт дозволив П.І. Ніколаєву із співробітниками організувати процес отримання оцтової кислоти в батареї з декількох апаратів в безперервному режимі методом зануреного культиву-



вання. В результаті була створена оригінальна технологічна схема, за якою процес отримання 9 %-ної оцтової кислоти проводять в чотирьох—п'яти послідовно розташованих ферментерах (рис. 4).

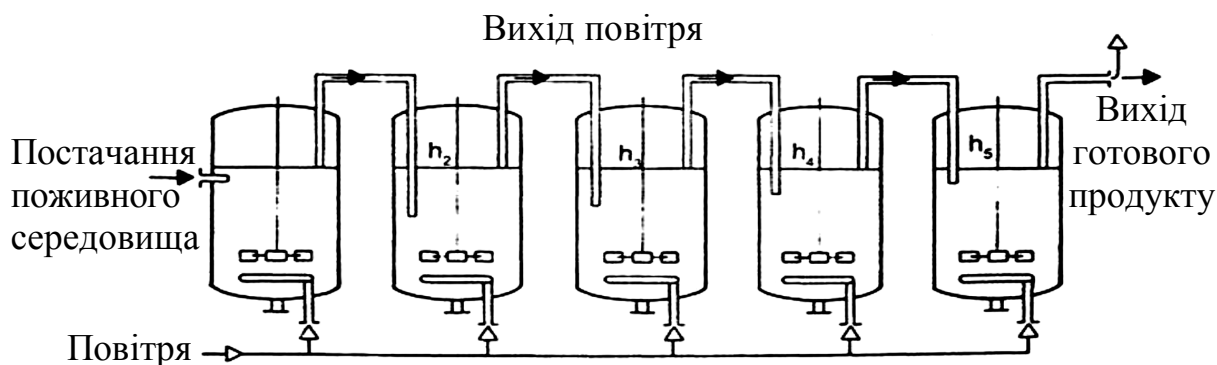


Рис. 4. Схема установки для отримання оцту у безперервному режимі

Перебіг рідини з апарата до апарата відбувається завдяки різниці тиску у “повітряній подушці”, що виникає за рахунок різного занурення труб, що перетікають  $h: h_2 > h_3 > h_4 > h_5$ .

В такій батареї в перших двох, за ходом рідини, апаратах при порівняно низькій концентрації оцтової кислоти бактерії розмножуються з більшою швидкістю при високій окислювальній активності, що забезпечує високу продуктивність процесу. В останніх за ходом рідини апаратах, що працюють, навпаки, при високих концентраціях оцтової кислоти, продуктивність знижується, в них відбувається в основному доокислення залишків спирту, що міститься в розчині.

Загальна продуктивність всіх апаратів батареї значно вища, ніж одного апарату, в якому синтезується оцет 9 %-ної концентрації. Ю.Л. Ігнатов показав, що продуктивність одиниці робочого об'єму апарату, який працює за батарейним способом, може досягати 49,4 кг оцтової кислоти з  $1 \text{ м}^3$  на добу.

Розроблений спосіб був швидко впроваджений на декількох заводах. Зараз за цією технологією працюють оцтові цехи в Горлівці та Дніпродзержинську, експериментальний харчокомбінат в Балашисі, завод в Словаччині.

Технологічна схема виробництва харчового оцту складається із наступних стадій:

- Розведення чистої культури оцтовокислих бактерій (ОКБ) на живильному середовищі Лойцянської або середовищі Геннеберга: спочатку культуру оцтовокислих бактерій вирощують в пробірках з агаризованим середовищем Лойцянської, а через 3—4 діб здійснюють серію послідовних пересівань оцтовокислих бактерій на свіжі середовища живлення, поступово збільшуючи кількість інокульованих пробірок з культурою оцтовокислих бактерій вдвічі. Отримавши необхідну кількість пробірок, плівку бактерій із поверхні агаризованого середовища пересівають на рідке середовище Лойцянської, розлите в колби Ерленмейера ємністю 800 см<sup>3</sup> по 250 см<sup>3</sup>. Інокуляцію проводять із розрахунку 10 пробірок на 1 колбу. В кожну колбу з рідким поживним середовищем одразу ж після інокуляції додають по 5 см<sup>3</sup> етилового спирту 96 %-ної концентрації. Найкращою сировиною для оцтовокислого бродіння являється етиловий спирт, отриманий із зерно-картопляної сировини. Може використовуватися як ректифікат, так і спирт-сирець. Але при підвищеному вмісті в спирті сивушних олій виробничий процес порушується.

Інокульовані колби поміщають у термостат, що має температуру (30±1) °С. Через одну—дві доби на поверхні поживного середовища з'являється тонка плівка, що містить культуру оцтовокислих бактерій. Визначення кислотності культуральної рідини

в колбах проводять титриметричним методом. Після досягнення 1 %-ної кислотності інокулянт в колбах передають на наступну стадію технологічного процесу.

- Вирощування культури оцтовокислих бактерій в апаратах-культиваторах ємністю 30 дм<sup>3</sup>, що містять по 7 дм<sup>3</sup> живильного середовища.

Середовище в апаратах (середовище № 1) містить (в перерахунку на 1 дм<sup>3</sup> середовища): спирту етилового 96 %-ного — 1,4 %, оцтової кислоти 80 %-ної концентрації — 2 %, амонію фосфорнокислого однозаміщеного — 0,9 г, калію фосфорнокислого однозаміщеного — 0,35 г, магнію сірчанокислого — 0,35 г.

Інокуляцію стерильного середовища культурою оцтовокислих бактерій здійснюють: 100 см<sup>3</sup> інокулянту із колб на 1 дм<sup>3</sup> живильного середовища. В апаратах постійно підтримується стабільний температурний режим в межах (30±2) °С та здійснюється постійна подача стерильного повітря із розрахунку 0,40—0,35 дм<sup>3</sup> повітря на 1 дм<sup>3</sup> поживиноного середовища за 1 хв. Вирощування оцтовокислих бактерій в апараті здійснюється при постійному перемішуванні культуральної рідини мішалкою. Після досягнення культурою оцтовокислих бактерій експоненціальної стадії росту поживне середовище в апараті закаламучується, концентрація оцтової кислоти в середовищі збільшується до 4,0—4,2 %. Починаючи з цього часу, в середовище живлення необхідно здійснювати дозовану подачу живильного середовища, що містить близько 7,2—8,0 % суміші спирту та кислоти для того, щоб концентрація оцтової кислоти в культуральній рідині залишалася постійною.

Середовище (№ 2), яке додають до культуральної рідини в процесі вирощування, має наступний склад (на 1 дм<sup>3</sup> середовища):

спирт етиловий 96 % — 100 см<sup>3</sup>;  
оцтова кислота 80 % — 175 см<sup>3</sup>;  
КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> — 3,5 г;  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> — 7 г;  
MgSO<sub>4</sub> — 3,5 г.

Після повного заповнення культиватора поживним середовищем культуральну рідину передають до апарату ємністю 1,5 м<sup>3</sup>.

- Вирощування культури оцтовокислих бактерій в апараті ємністю 1,5 м<sup>3</sup>.

Склад поживного середовища в апараті ємністю 1,5 м<sup>3</sup> відповідає складу середовища в культиваторі. Коефіцієнт заповнення апарату поживним середовищем — 0,55. Інокуляцію середовища живлення в апараті проводять повним об'ємом культуральної рідини з одного культиватора (за винятком 7 дм<sup>3</sup>, які залишають в культиваторі для проведення наступного циклу інокуляції за описаною вище схемою).

Вирощування культури оцтовокислих бактерій в апараті ємністю 1,5 м<sup>3</sup> проводять таким же самим чином, як і в апараті ємністю 30 дм<sup>3</sup>. Але на цій стадії технологічного процесу масова частка оцтової кислоти в апараті повинна постійно підтримуватися, починаючи з експоненціальної стадії росту, на рівні 4 %.

- Вирощування культури оцтовокислих бактерій в батареї з апаратів ємністю 9 м<sup>3</sup>.

В робочих ферментерах ємністю 9 м<sup>3</sup> готують по 3,5 м<sup>3</sup> середовища живлення № 1. Середовища живлення у всіх ферментерах батареї інокують оцтовокислими бактеріями, вирощеними в апаратах ємністю 1,5 м<sup>3</sup>.

В період засіву всі ферментери батареї функціонують обособлено.

Вирощування оцтовокислих бактерій в ферментерах проводять таким же самим чином як і в культиваторах, та в апаратах ємністю  $1,5 \text{ м}^3$ .

Після того, як ємність культуральної рідини в першому ферментері з батареї досягне  $6 \text{ м}^3$  а концентрація оцтової кислоти  $4,2\text{—}5,0 \%$ , частину культуральної рідини з апарату передають до наступного за ним ферментера, а з нього — до третього, та за ланцюгом, до останнього апарату в батареї.

Таким чином, перший апарат батареї являється генератором оцтовокислих бактерій і безперервно постачає всі апарати в батареї активною культурою.

Технологічний процес проводять таким чином, щоб вміст оцтової кислоти в останньому з батареї апараті становив  $9,0 \%$  або вище, а вміст етилового спирту  $0,1\text{—}0,3 \%$ . Максимальна швидкість потоку культуральної рідини між ферментерами батареї не повинна перевищувати  $500 \text{ дм}^3$  за годину.

В процесі оцтовокислого бродіння температура культуральної рідини від ферментера до ферментера знижується від  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  до  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Зменшується також і аерація з  $0,35\text{—}0,4 \text{ м}^3$  повітря на  $1 \text{ м}^3$  середовища на хвилину до  $0,1\text{—}0,15 \text{ м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{хв}$  в останньому апараті. Для підтримання в  $2\text{—}4$  апаратах батареї необхідної концентрації спирту в них подають поживне середовище з  $40 \%$ -ним етанолом.

З останнього в батареї апарату проводять відбір оцту з концентрацією оцтової кислоти не нижче  $9,0 \%$  і не вище  $9,2\text{—}9,3 \%$ .

Як уже зазначалося вище, в процесі виробництва оцту єдиними супутниками оцтовокислих бактерій являються вугриці та

незначна кількість молочних паличок. Позбавитися від присутності цих нематод а також, одночасно, від завислих часток та довести оцет до необхідної концентрації дозволяють технологічні операції висолювання та пастеризації. Вибір процедури при проведенні технологічного обробітку оцту обумовлюється умовами конкретного виробництва.

При висолюванні до оцту додають 1—2 % харчової солі. Сіль попередньо розчиняють в невеликій кількості води або оцту.

Концентрований розчин солі змішують з оцтом в купажній ємності. Суміш витримують протягом одної — двох діб до повного осідання завислих часток та загибелі вугриць.

Альтернативним до методу висолювання являється пастеризація оцту при 85—90 °С з наступним освітленням за допомогою бентонітових глин з невеликою кількістю лимонної кислоти.

Із бентонітових глин готують 2 % водну суспензію, яку змішують з попередньо освітленим оцтом.

Освітлення оцту проводять змішуванням 1000 дм<sup>3</sup> оцту з 2,5 кг повітряно — сухого бентоніту. Суміш оцту з бентонітом ретельно перемішують протягом 30—40 хвилин. При утворенні великої кількості завислих пластів вугриць суміш залишають для освітлення на 10—12 годин, попередньо провівши визначення кислотності.

Одночасно з висолюванням або після пастеризації проводять купажування оцту — тобто доводять його кислотність до необхідного рівня, передбаченого вимогами регламенту виробництва.

Купажування оцту здійснюється шляхом його розведення водопроводною водою (при високій концентрації оцтової кислоти) або шляхом укріплення оцту харчовою оцтовою кислотою

більш високої концентрації (при низькій концентрації оцтової кислоти).

Стандартизований оцет фільтрують через бентонітові глини або через інші фільтри.

Готовий оцет розливають у пляшки, маркують та передають на реалізацію споживачу.

#### **1.1.4. Технологічні витрати**

Технологічний процес виробництва оцту за безперервним способом супроводжується втратами етилового спирту (до 10 %), які відбуваються в результаті наступних причин:

- Втрати від недоокислення спирту. Ці втрати спирту обумовлені особливостями технологічного процесу — окислення спирту в оцет може відбуватися лише в присутності спирту, в останньому із ферментерів в батареї постійно повинен бути етиловий спирт в концентрації 0,1—0,3 %;

- Втрати від переокислення оцтової кислоти до вуглекислого газу та води — ці втрати залежать від умов виробництва та від надлишку повітря в ферментерах. Ступінь окислення визначається за концентрацією вуглекислого газу у повітрі, яке відводиться із ферментерів. Це визначення проводять за допомогою газоаналізаторів.

- Втрати в результаті випарювання спирту та оцтової кислоти та вилученням пари з ферментерів разом з відпрацьованим повітрям. Ці втрати частково вдається зменшити за допомогою адсорберів.

До складу технологічних витрат слід віднести також витрати, які носять назву “невизначених” — вони пов’язані з утворенням альдегідів, ефірів та інших органічних сполук.

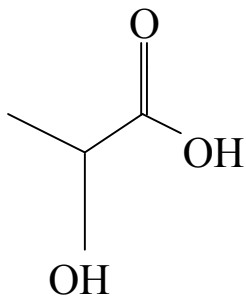
### Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте основні фізико-хімічні властивості оцтової кислоти.
2. Які поживні середовища застосовуються на різних стадіях технологічного процесу виробництва оцтової кислоти?
3. Надайте характеристику основних стадій виробництва кислоти.
4. Які основні причини технологічних витрат існують у виробництві оцтової кислоти?

## 1.2. Технологія виробництво молочної кислоти

### 1.2.1. Характеристика кислоти

Молекула молочної кислоти ( $C_3H_6O_3$ ) має структурну формулу:





Молочна кислота при кімнатній температурі являється твердою речовиною, яка за атмосферного тиску плавиться, утворюючи сиропоподібну рідину. Молекула молочної кислоти існує у вигляді двох оптичних ізомерів: L-молочної кислоти (від латинського “*livo*” — лівий) та D-молочної кислоти (від латинського “*dextro*” — правий). Кожна із цих форм являється дзеркальним (хіральним) відображенням іншої.

D-молочна кислота утворюється при дії бактерій на м'ясний екстракт, а L-молочну кислоту отримують зброджуванням цукрози в присутності *Bacillus acidi levolaktiti*. Суміш обох форм молочної кислоти можна виділити із кислого молока.

Молочна кислота — це одноосновна кислота. В кристалічному вигляді ця кислота може бути отримана при обережному випарюванні водного розчину молочної кислоти. Водні розчини молочної кислоти являються врівноваженою системою, яка складається з молочної кислоти та її ангідридів; чим більша концентрація водного розчину, тим більше в ньому ангідридів молочної кислоти. Але ангідриди — це менш цінні сполуки ніж сама молочна кислота. На харчові підприємства, як правило, молочна кислота надходить у вигляді розчинів, що мають концентрацію 40—80 % (I, II та III гатунку). Молочна кислота III гатунку використовується лише для інверсії цукрів.

При зберіганні молочної кислоти, як і інших органічних кислот, може відбуватися втрата кристалізаційної води, що спричиняє утрату товарної маси.

Молочна кислота широко поширена в природі. Порівнюючи молекулярні формули молочної кислоти  $C_3H_6O_3$ , та глюкози  $C_6H_{12}O_6$ , неважко зрозуміти причину її розповсюдженості — мо-

лекула молочної кислоти, по суті, є не чим іншим, як половиною молекули глюкози. Дійсно, поширеним джерелом молочної кислоти являються процеси анаеробної ферментації цукрів та дії ферментів на системи, що містять глюкозу.

Свіже молоко швидко заселяється бактеріями, що діють на молочний цукор — лактозу; бактерії забезпечують себе енергією, розщеплюючи лактозу та виділяючи молочну кислоту.

Потім, під впливом кислоти краплі жиру в молоці коалесцирують і молоко звертається. Під час приготування йогурту процес прискорюють та регулюють, додаючи до молока змішану культуру бактерій *Lactobacillus bulgaricus* та *Streptococcus thermophilus*, які утворюють молочну кислоту.

Кислий смак маринованих огірків також обумовлений молочною кислотою. Квашену капусту готують, витримуючи свіжу капусту в розсолі, який пригноблює ріст одних бактерій і тим самим стимулює розвиток інших, спочатку *Leuconostoc mesenteroides*, а потім *Lactobacillus plantarum*. Ці бактерії утилізують глюкозу та продукують молочну кислоту, яка і надає квашеній капусті своєрідного гострого присмаку.

Молочна кислота також утворюється із глюкози під дією ферментів, що містяться в пітних залозах людини (тому піт і має кислий смак), та при дії бактерій на збагачену глюкозою поверхню піхви. Крім того, молочна кислота накопичується у м'язах, якщо вони вичерпали весь свій запас кисню і не здатні метаболізувати глюкозу аеробним шляхом. Тому спринтер може несвідомо використовувати анаеробне джерело енергії, яке слугувало ще його далеким предкам, і таким чином забезпечити себе енергією, яка вивільнюється при розрізанні молекул глюкози на дві моле-

кули молочної кислоти. На жаль, в результаті цього, в м'язах збільшується концентрація кислоти, яка утруднює їх функціонування (людина відчуває це як загальну слабкість та біль у м'язах), та може призвести до судоми.

В організмі людини молочна кислота приймає участь в ефектах, які супроводжують стан сильного сп'яніння. Оскільки вся метаболізуюча активність печінки буде затрачена на переробку етанолу, цей орган вже не буде здатним до зв'язування молочної кислоти. В цій ситуації молочна кислота може потрапити в кровоносну систему та підвищити кислотність м'язів. При цьому людина буде відчувати себе такою ж втомленою, як і спортсмен (але вже з іншої причини).

Молочна кислота також може впливати на осадження твердих речовин в організмі, особливо солей сечової кислоти (похідної пурину).

Звичайно, такі солі виділяються разом із сечею, але молочна кислота інгібує їх виділення, завдяки чому солі сечової кислоти можуть відкладатися у суглобах, викликаючи подагру. Такі накопичення молочної кислоти утворюються в малих суглобах, особливо в метатарзально-фалангіальному суглобі великого пальця стопи; утворенню накопичень сприяють багаті пуринами харчові продукти та напої, включаючи класичних супутників подагри — червоні вина та портвейн.

Останнім часом значно розширилося використання молочної кислоти. Це обумовлено зростанням попиту в традиційних галузях її застосування, а також використання її для виробництва різних поверхнево-активних та фармацевтичних речовин. Слід зазначити, що в процесі виробництва молочної кислоти утворю-

ється сіль молочної кислоти — лактат кальцію. Кальцій в цій солі міститься в органічно зв'язаному вигляді, тому легко засвоюється організмом людини. Тому через це іноді технологічний процес виробництва молочної кислоти змінюють з метою отримання солей лактату кальцію або лактату натрію.

Кальцію лактат — це білий дрібний порошок майже без запаху. Він повільно розчиняється в холодній воді, швидко — в гарячій. Кальцій, що входить до складу лактату кальцію, має високу біологічну активність, він незамінний для будови кісток, зубів, бере участь у роботі м'язів, ендокринних залоз, формуванні імунітету, виявляє протизапальну дію, знижує чутливість організму до алергенів. Поки що в медичній літературі немає одностайної думки щодо добової потреби кальцію для людини. Національний інститут здоров'я США рекомендує до 1500 мг/добу з метою профілактики остеопорозу (*Journal of the american college of nutrition*, vol.13., № 5, 1994). За найсприятливішого харчування засвоєння кальцію, як правило, не перевищує 50 % від спожитого.

В Україні рівень споживання кальцію значно нижчий норми, тому дефіцит кальцію за відсутності необхідного харчування доцільно компенсувати його препаратами. Додавання кальцієвої солі молочної кислоти в хлібобулочні вироби, а також у кондитерські, м'ясні, овочеві й фруктові консерви, соки, джеми, повидла, варення, желе підвищує харчову й лікувально-профілактичну цінність харчових продуктів.

Іншу сіль молочної кислоти — лактат натрію та саму молочну кислоту використовують як буферні суміші в м'ясопереробних та хлібопекарських галузях. За даними фірми "Purak", ці солі знижують водну активність, а внесення від 2 до 4 % лактату

натрію забезпечує емульсійну стабільність сосисок. Їх використовують також у технологічних лініях, пов'язаних з нарізанням шинки, ковбас, бекону тощо для запобігання розвитку гнилісних мікроорганізмів. Пари молочної кислоти мають бактерицидну активність, зокрема щодо стафілококу. Обробка м'яса і м'ясних продуктів водними розчинами молочної кислоти забезпечує рН 4—4,5, що значно підвищує рівень чистоти, запобігає розвитку гнилісних мікробів, тривалість зберігання при температурі 4 °С збільшується в два-три рази. В рибній промисловості, за зарубіжними даними, молочну кислоту використовують як консервант, у хлібопекарстві — для профілактики картопляної хвороби й поліпшення смаку виробів з пшеничного борошна. Підкислення середовища молочною кислотою сприяє розвитку ферментативної активності дріжджів, прискорює дозрівання тіста, запобігає розвитку сторонніх мікроорганізмів. Тісто, виготовлене із молочною кислотою, досягає через 2,5—3 години. При цьому готові вироби з такого тіста більш пористі, у них кращі м'якуш, аромат, смак, вони стійкі до черствіння.

За рубежом молочну кислоту досить широко використовують у молокопереробній галузі, особливо у виробництві сирів.

Крім харчової галузі, молочну кислоту застосовують і в інших галузях економіки. У текстильній вона входить до складу фунгіцидних протигрибкових препаратів, якими обробляють різні тканини.

Технічна молочна кислота використовується для виділення вапна із шкір (декальцинування). Під час війни молочна кислота заміняла гліцерин при обробітку тканин, паперу, клею, тютюну, на її основі отримували засіб для прання білизни.

Провідні американські, західноєвропейські та японські фірми, що випускають харчову продукцію, акцентують увагу на тому, що молочна кислота — надійний природний консервант, вона поліпшує смак готових виробів, профілактично діє й лікує деякі захворювання шлунка й кишечника, заміняє оцтову й лимонну кислоти. За рубежом простежується тенденція до ширшого використання молочної кислоти замість оцтової. Виробництво молочної кислоти на Україні здійснюється вже більше 50 років. Її виготовляють згідно з вимогами ГОСТу 490-79 “Кислота молочна харчова. Технічні умови”. Діючий стандарт поширюється на кислоту, одержану збродженням цукровмісної (цукор-сирець, цукор-пісок, патока рафінадна, меляса бурякова) і лактовмісної сировини (сироватка молочна) молочнокислими бактеріями *Lactobacillus delbrukii*, *L. plantarum* та ін.

### **1.2.2. Характеристика продуцентів**

Молочнокислі бактерії відносяться до числа гомоферментативних термофільних бактерій з оптимумом розвитку 48—50 °С. Всі молочнокислі бактерії — факультативні анаероби і добре ростуть на поверхні твердого середовища в контакті з повітрям. Але вони не здатні синтезувати АТФ за рахунок дихання, тому що у них відсутні цитохроми та інші ферменти, що містять гем.

Навіть при вирощуванні на дуже багатих середовищах колонії молочнокислих бактерій завжди залишаються невеликими (не більш декількох мм в діаметрі). Вони ніколи не бувають піг-

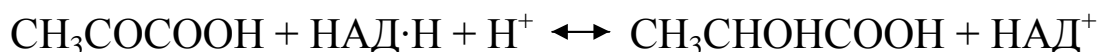
ментованими і в результаті відсутності цитохромів завжди мають крейдяно-білий колір. Невеликий розмір колоній цих бактерій пояснюється, головним чином, низьким економічним коефіцієнтом росту, а це, в свою чергу, пояснюється тим, що вони існують за рахунок зброджування.

Інша важлива фізіологічна особливість молочнокислих бактерій — їх висока стійкість до кислоти, що обумовлено особливостями метаболізму цих бактерій. Ріст всіх молочнокислих бактерій триває до тих пір, доки в результаті бродіння величина рН не впаде до 5 або нижче. Здатність молочнокислих бактерій витримувати досить великі концентрації молочної кислоти має важливе селективне значення, тому що ця властивість дає їм можливість успішно конкурувати з більшістю інших бактерій в середовищах, багатих поживними речовинами.

Синтетичні можливості молочнокислих бактерій досить обмежені. Всі ці організми мають складні потреби у факторах росту: вони потребують вітамінів групи В та значної кількості амінокислот. В результаті таких складних вимог до поживних речовин молочнокислі бактерії звичайно культивують на середовищах, що містять пептон, дріжджевий екстракт або інші гідролізати рослинного або тваринного матеріалу. В якості джерела енергії живильні середовища повинні містити зброджувані вуглеводи.

Гомоферментативні організми перетворюють глюкозу майже кількісно в молочну кислоту за шляхом Ембдена-Мейєргофа.

Молочнокислі бактерії відрізняються у відношенні утворених ними ізомерів молочної кислоти, що визначається стереоспецифічністю лактатдегідрогеназ, які здійснюють відновлення пірувату:



Деякі види містять лише D-лактатдегідрогеназу і тому утворюють D-ізомер молочної кислоти, інші містять лише  $\alpha$ -лактатдегідрогеназу і утворюють L-ізомер (таблиця 1).

Таблиця 1. Порівняльна характеристика мікроорганізмів за здатністю синтезувати L(+) та D(-) — ізомери молочної кислоти

Продуцент	Частка ізомерів в загальному вмісті молочної кислоти, %	
	L(+)	D(-)
<i>Streptococcus lactis</i>	Близько 100	—
<i>Streptococcus cremoris</i>	Близько 100	—
<i>Streptococcus faecalis</i>	Близько 100	—
<i>Lactobacillus helveticus</i>	70	30
<i>Lactobacillus lactis</i>	—	100
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60	40
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	—	100
<i>Lactobacillus casei</i>	Близько 100	—
<i>Leuconostoc cremoris</i>	—	Близько 100

Певні види мають обидві лактатдегідрогенази різної стереоспецифічності, що призводить до утворення рацемічної молочної кислоти.

Штами *Lactobacillus*, за винятком *Lactobacillus casei*, синтезують, в основному, D(-) — молочну кислоту або суміш ізомерів. Термофільні штами *Streptococcus* синтезують винятково L(+) — молочну кислоту.



Встановлено, що умови культивування, наприклад температура, тривалість та склад живильного середовища, не впливають на конфігурацію молекули молочної кислоти.

В ряді наукових досліджень встановлено, що із двох ізомерів L(+) молочна кислота являється основним продуктом метаболізму в організмі людей та тварин. Кількість L(+) — молочної кислоти, яка утворюється в ході анаеробного гліколізу із глюкози або глікогену в тканинах м'язів організму людини, яка знаходиться в стані спокою, становить близько 100 мг/год на 1 кг маси тіла. Швидкість перетворення ендогенної L(+) — молочної кислоти в організмі людини вагою 70 кг, яка виконує фізичну роботу протягом 5 годин та споживає 40 % (від максимальної потреби) кисню, складає 230 г/добу.

В протилежність L(+) — молочній кислоті інший оптичний ізомер — D(-) — молочна кислота, являється проміжним продуктом розпаду гліцину в ході окислювального циклу перетворення амінокислот. Незважаючи на те, що D(-) — ізомер молочної кислоти може синтезуватися певними бактеріями шлункового тракту, незначна кількість ендогенної D(-) — молочної кислоти не відіграє помітної ролі в процесах метаболізму. В літературі описані випадки ацидозу кишечника у деяких пацієнтів, причиною якого було утворення значної кількості D(-) — молочної кислоти в результаті порушення життєдіяльності мікрофлори кишечника.

Згідно з літературними даними, знаходження L(+) — молочної кислоти в організм людини в складі продуктів молочнокислого зброджування звичайно не призводить до порушень процесів метаболізму та життєдіяльності кишкової мікрофлори.

L(+) — молочна кислота відіграє важливу роль в окислювальних процесах обміну речовин, а також в процесах синтезу глюкози, глікогену, амінокислот та проміжних продуктів циклу трикарбонових кислот. Природне збагачення L(+) — молочною кислотою продуктів харчування в ході молочнокислого зброджування підвищує їх поживну цінність.

D(–) — молочна кислота гірше переноситься організмом людини, тому що її перетворення відбувається значно повільніше, ніж у L(+) — молочної кислоти і, крім того, остання здатна сповільнювати дане перетворення. В зв'язку з цим, рядом дослідників на основі багаточисленних експериментів рекомендована максимальна норма споживання екзогенної D(–) — молочної кислоти, яка надходить до організму людини разом з продуктами харчування — вона повинна складати не більше 65 мг/день на 1 кг маси тіла. Всесвітньою організацією охорони здоров'я (FAO/WHO) в 1967 році була встановлена більш висока максимальна норма — 100 мг/(кг·день).

В інших документах FAO/WHO — Codex Alimentarius, які встановлюють норми для харчових добавок, дозволених для виробництва продуктів дитячого харчування, допускається використання лише L(+) — молочної кислоти, вміст якої повинен становити не більш 1,5 г/100 г сухого продукту на зерновій основі для немовлят віком до 1 року та дітей до 3 років, а також не більше 0,2 г/100 см<sup>3</sup> готового до споживання продукту у випадку консервів для дітей віком до 3 років.

З огляду на роль, яку відіграє L(+) — ізомер молочної кислоти в організмі людини, зрозуміло, наскільки велике значення має правильний вибір штамів для синтезу цієї сполуки. Для зброджу-

вання підготованого живильного середовища використовують спеціальні культури термофільних молочнокислих бактерій *Thermobacterium cereale* (*Lactobact. delbrukii*).

У виробництві молочної кислоти використовують штам БДШ (бактерії Дельбрюка—Шапошнікова), виділений В.І. Шапошніковим та А.Я. Мантейфель, та штам 83, виділеним в 1954 році С.М. Сосіною та співробітниками Мінського заводу молочної кислоти.

### 1.2.3. Особливості технології

В 1963—1964 рр. із безперервного виробництва молочної кислоти був виділений штам 419 (В.Г. Свирида, О.Л. Клячкіна, та ін.). За морфологічними ознаками ці штами дуже схожі між собою.

Для зброджування сульфїтних щолоків використовуються молочнокислі бактерії виду *L. plantarum*. Вони зброджують гідролізати, які містять пентози (ксилозу, арабінозу) приблизно з однаковим виходом молочної та оцтової кислот. Сировиною для виробництва молочної кислоти слугує товарний цукор, картопляний та кукурудзяний крохмаль, меляса, рафінадна та кукурудзяна крохмальна патока, молочна сироватка, зернові культури, гідролізати деревини, сульфїтні щолоки.

Найбільш доступною є крохмалевмісна сировина (патока, злакові культури). Технологія переробки цих субстратів в молочну кислоту була розроблена В.М. Шапошніковим та А.Я. Мантейфель. Вона базується на зброджуванні середовищ термофільними молочнокислими бактеріями виду *Lactobacterium cereale*.

Бродіння молочної кислоти здійснюють бактерії *Lactobacterium bulgaricum*, *Streptococcus lactis*.

Одним із видів сировини у виробництві молочної кислоти являються гідролізати деревини та сульфідні щолоки.

Їх зброджують сумішшю декількох штамів гомо- та гетероферментативних бактерій. При такому зброджуванні отримують суміш молочної, оцтової та інших кислот. Молочну кислоту із цієї суміші виділяють відгоном.

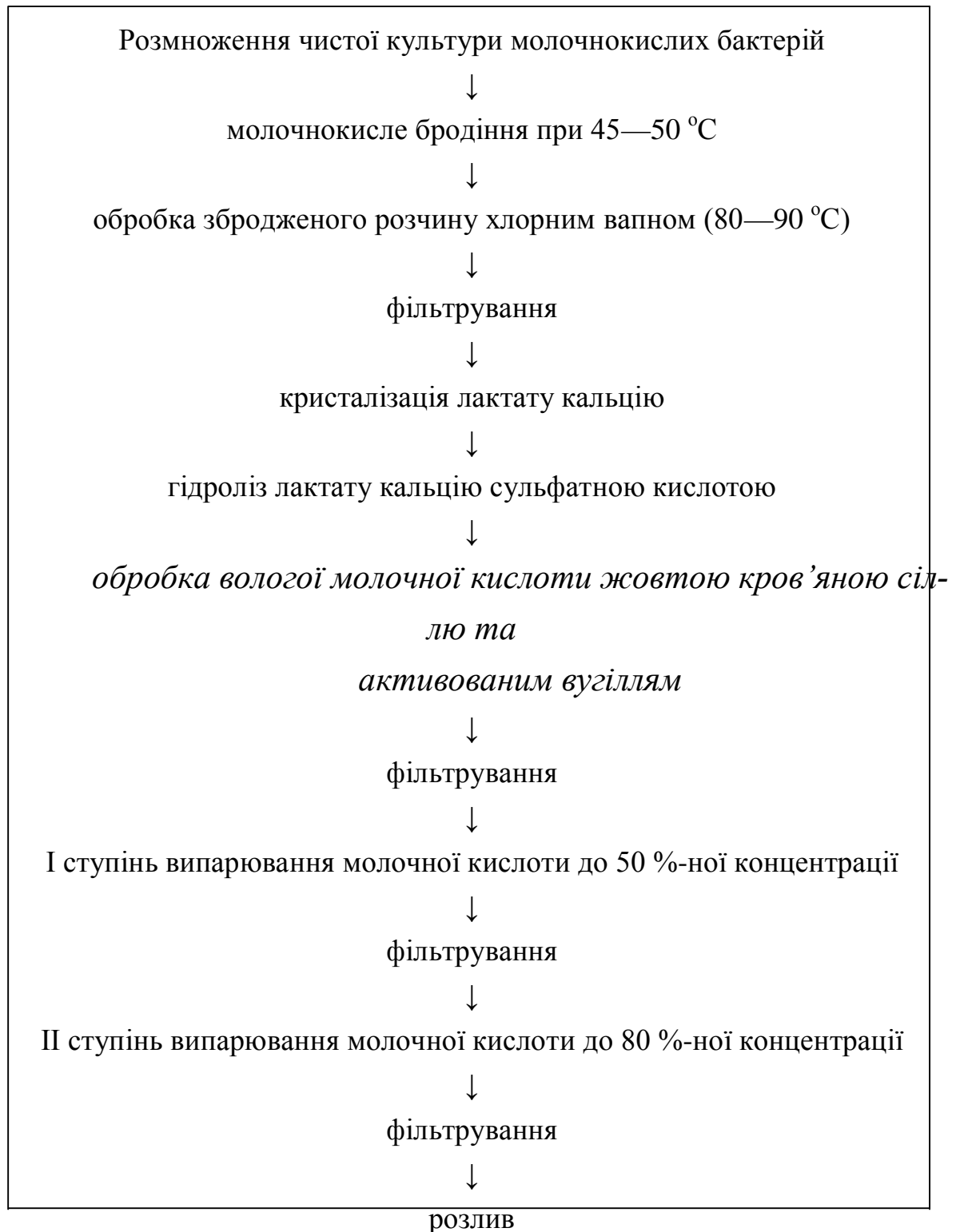
Підготовка поживного середовища із м'яса та цукрової патоки заключається у наступному: спочатку їх освітлюють та розводять водою до 10-12 % -ної концентрації, а потім інвертують за допомогою сірчаної або хлористоводневої кислоти. В це середовище вводять необхідні для живлення бактерій сполуки фосфору у вигляді суперфосфату або інші поживні речовини у вигляді водного екстракту солодових зародків. Після нейтралізації середовища до рН 6,5 та введення 2 % крейди (по відношенню до цукру), його стерилізують, а потім зброджують.

При використанні крохмалевмісної сировини здійснюють оцукрювання крохмалю кислотою, ферментами солоду або пліснявих грибів.

В якості джерела азотного живлення в середовище вводять муку із насіння бобових рослин (горох, квасоля, соя та ін.) або водний екстракт із солодових зародків.

Оцукрене середовище направляють на бродіння. Під час ферментації до поживного середовища декілька разів на добу (3-4 рази) додають крейду (з метою підтримки стабільного рівня рН в межах 6,3-6,5).

Мікробіологічне виробництво молочної кислоти проводять за наступною схемою:



*Рис. 5.* Схема мікробіологічного виробництва молочної кислоти

Молочнокисле зброджування проводять при постійній температурі у межах 49?50 °С. Зниження температури до 46?48 °С викликає різке послаблення біохімічної активності культури бактерій та сприяє розвитку сторонньої мікрофлори. Підвищення температури до 53?55 °С також викликає інактивацію культури та уповільнення бродіння. Позитивний вплив на молочнокисле бродіння мають високоактивні речовини. З цією метою до поживного середовища додають екстракт зародків солоду. При нормальному бродінні за добу бактеріями зброджується близько 1—1,5 % цукрів, а весь цикл бродіння закінчується за 7—11 діб.

Значна роль в технології виробництва молочної кислоти відводиться обробці зброженого розчину та фільтруванню. Для відокремлення крейди та колоїдів зброжений розчин нагрівають до 80—90 °С, а потім змішують з хлорним вапном до слабколужної реакції. Суміш витримують протягом 3—5 годин для відстоювання.

Для вилучення грубої зависі та твердих часток шар відстою з розчином лактату кальцію декантують.

Розщеплення лактату кальцію здійснюють після його центрифугування. Для запобігання обвуглюванню лактату сірчаною кислотою процедуру розщеплення лактату кальцію з метою виділення вільної молочної кислоти проводять при температурі 60—70 °С.

Для відокремлення іонів заліза отриману вологу молочну кислоту при температурі 60—70 °С оброблюють жовтою кров'яною сіллю. При цьому в осад випадає берлінська синь.

Знебарвлення молочної кислоти здійснюється методом адсорбції за допомогою активованого вугілля. Упарювання проду-

кту відбувається на вакуум-апаратах при тиску 10—15 кПа та за-  
лишковому тиску пари 0,2 МПа.

### **Контрольні запитання**

1. Охарактеризуйте основні хімічні та фізичні властивості молочної кислоти.
2. Яку роль відіграє молочна кислота в організмі людини?
3. Яка роль молочної кислоти в процесах сквашування, маринування, силосування, в інших процесах?
4. Як використовується молочна кислота в медицині та у виробництві антисептиків?
5. Яке застосування знайшли солі молочної кислоти — лактат кальцію та лактат натрію в народному господарстві та медицині?
6. Які вимоги пред'являються до якості молочної кислоти харчового призначення?
7. Які штами молочнокислих бактерій застосовуються у промисловому виробництві молочної кислоти на харчовій сировині; на сульфітному щолоці?
8. Який внесок В.Н. Шапошнікова, А.Я. Мантейфеля та ін. вчених у технологію виробництва молочної кислоти?
9. Дайте характеристику основних компонентів живильних середовищ із крохмалевмісної сировини для біосинтезу молочної кислоти.
10. Назвіть основні стадії біотехнології виробництва молочної кислоти або її солей на харчовій сировині.

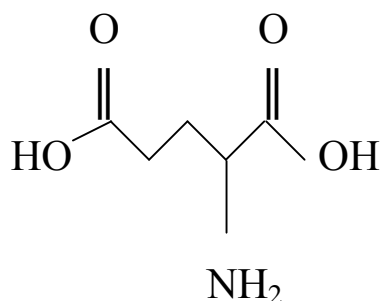
11. Для чого у технології виробництва молочної кислоти застосовується жовта кров'яна сіль, хлорне вапно, активоване вугілля?

### 1.3. Мікробіологічний синтез глютамінової кислоти

#### 1.3.1. Характеристика кислоти

Амінокислоти широко застосовуються в харчовій промисловості — як підсилювачі смаку та аромату, антиоксиданти та харчові добавки; в сільському господарстві — в якості кормових добавок; в медицині — для терапії післяопераційних хворих; в хімічній промисловості — для синтезу полімерів та виробництва косметичних засобів. За оцінками, кожного року в світі виробляється близько 800000 т амінокислот вартістю більше 5 млрд. доларів. При цьому більше половини об'єму виробництва припадає на  $\alpha$ -глютамінову кислоту, яка використовується для отримання широко відомого підсилювача смаку та аромату — глютамату натрію (мононатрієва сіль глютамінової кислоти — МНГ,  $C_5H_8O_4NNa$ ).

Структурна формула глютамінової кислоти :





МНГ утворюється при старінні м'яса в результаті розпаду білків. Самій МНГ властивий лише слабкий присмак м'яса, але суміш мононатрієвої солі глютамінової кислоти та інозинмонофосфату (ІМФ) має інтенсивний смак м'яса; більш того, саме присутністю цієї суміші і обумовлений смак м'яса. МНГ підсилює чутливість рецепторів солоного та гіркого смаку, які знаходяться на язичці, але точний механізм її дії поки що не встановлений.

Різні харчові продукти містять МНГ та ІМФ в різних співвідношеннях; відповідно вони відрізняються і за смаком. В яловичині вдвічі більше МНГ, ніж у свинині, хоча за вмістом ІМФ ці продукти майже не відрізняються. Гриби також багаті білками, що містять глютамінову кислоту: цим і пояснюється їх слабкий м'ясний присмак та властивість покращувати смакові якості багатьох страв.

Деякі мікроорганізми (в тому числі *Micrococcus* і *Brevibacterium*) в багатому аміаком середовищі виділяють в це середовище глютамінову кислоту. Така "ферментація" аміаку являється зараз звичайним промисловим методом отримання МНГ.

### **1.3.2. Характеристика промислових продуцентів молочної кислоти**

Промисловим продуцентом глютамінової кислоти та її солей на вітчизняних заводах являється культура *Corinebacterium glutamicum* та *Brevibacterium spp.*

Це безспоріві грамнегативні бактерії, що свого часу були виділені із ґрунту. Звичайно для підсилення продуктивності цих мікроорганізмів використовують мутагенез з наступним відбором штамів — суперпродуцентів глутамату натрію. Такий спосіб отримання штамів вимагає багато часу, однак ефективність його невелика. Більш перспективним являється альтернативний (генноінженерний) підхід, який заключається у виділенні і зміні альтернативних генів, які кодують ключеві ферменти певних біохімічних реакцій.

Нині великі надії покладаються на створення плазмідних векторів, спеціально призначених для експресії в *Corinebacterium* та *Brevibacterium spp.* Планується створити човникові вектори *E. coli* — *Corinebacterium*. Та їх частина, яка походить із плазмід *E.coli*, може містити гени стійкості до тетрацикліну, хлорамфеніколу або канаміцину. Оскільки *E.coli* і *Corinebacterium spp.* чутливі до цих антибіотиків, ці гени можуть слугувати селективним маркером для обох мікроорганізмів.

Але ефективний метод трансформації *C. glutamicum* до цього часу не розроблений.

Це пояснюється тим, що багато генів *C. glutamicum* неефективно експресуються в *E. coli*; частота трансформації при введенні ДНК в *C.glutamicum* звичайним способом або електропорацією дуже низька. Проникнення екзогенної плазмідної ДНК в протопласти дещо полегшується в присутності поліетиленгліколю. Але, поки що на відчизняних підприємствах використовують штами, створені традиційними методами селекції та відбору.

### 1.3.3. Особливості технології

Ефективність синтезу глютамінової кислоти культурою *Corinebacterium glutamicum* значною мірою залежить від компонентів та їх кількості у ферментаційному середовищі. Поживне середовище для синтезу глютамінової кислоти містить бурякову мелясу, кукурудзяний екстракт, сечовину, хлорид амонію, сірчано-кислий магній, калій фосфорнокислий однозаміщений. Питомі норми витрат сировини, матеріалів, хімікатів, води, пари та електроенергії на тону моногідрату глютамату натрію приведені в таблиці 2.

**Таблиця 2. Питомі норми витрат сировини, матеріалів, хімікатів, води, пари та електроенергії на тону моногідрату глютамату натрію**

Найменування	Одиниця виміру	Питомі норми затрат
Меляса	т	6,0
Кукурудзяний екстракт	т	0,0024
NaOH	т	0,3
NaOH, технічний	т	0,2
NH <sub>4</sub> Cl	т	0,004
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	т	0,015
Сечовина	т	0,075
MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	т	0,09
Крейда хімічно осаджена	т	0,3
Пропанол ГО-400	т	0,045
Спирт етиловий технічний	дм <sup>3</sup>	42,0
Пара	гКал	50
Електроенергія	кВт/год	25000
Вода технічна (витрати обігового водопостачання)		

Синтез глютамінової кислоти в значній мірі залежить від концентрації меляси у ферментаційному середовищі. Так, при концентрації меляси від 2 до 4 % фізіологічні параметри за глютаміновою кислотою дорівнюють нулю, а всі вуглеводи використовуються для росту бактеріальної маси. Із зростанням концентрації спостерігається процес наростання кількості біомаси, поступово зростає фізіологічна активність культури за синтезом глютамінової кислоти .

Максимальної активності культура досягає при концентрації цукру у фундаментаційному середовищі  $100,64 \text{ г/дм}^3$ , після чого цей показник зменшується, і тим помітніше, чим вища концентрація цукру в середовищі.

Коефіцієнт використання цукрів за біомасою являється максимальним при мінімальній концентрації вуглеводів. З підвищенням їх концентрації коефіцієнт використання зменшується.

Разом з тим, як свідчать літературні дані, на середовищах із вмістом цукру до  $100 \text{ г/дм}^3$  розмноження культури в основному завершується протягом 24 годин.

У наступні 24 години приріст бактеріальної біомаси становить не більш 10 % від її залишкової кількості в культуральній рідині. При більш високій концентрації цукру розмноження культури уповільнюється і приріст біомаси на другу добу ферментації становить від 30 до 50 %.

Синтез глютамінової кислоти має зворотну залежність. За першу добу ферментації вона накопичується в незначній кількості, а після другої доби спостерігається різке зростання її концентрації. Таким чином, глютамінова кислота є типовим вторинним метаболітом, синтез її не пов'язаний із ростом культури. Тому,

для підвищення концентрації глютамінової кислоти в культуральній рідині культуру необхідно вирощувати при більш низьких концентраціях вуглеводів у середовищі. Коли ріст завершений, необхідно додавати компоненти для синтезу глютамінової кислоти, тобто вносити поживні речовини на другій стадії процесу. Використання в живильному середовищі хлористого амонію стимулює ріст культури *Corinebacterium glutamicum* значно краще, ніж інші джерела азоту, але забезпечує менший вихід глютамінової кислоти. Тому на стадії вирощування культури слід використовувати хлористий амоній, а на стадії ферментації — сечовину. Відомо, що продуцент глютамінової кислоти має властивість за певних умов змінювати направленість синтезу й продукувати глютамін за рахунок глютамінової кислоти. Тому, регулюючи вміст біотину (він повинен бути достатньо низьким), відносно високі концентрації хлористого амонію, іони цинку та слабкокислі значення рН можна досягти збільшення вмісту глютамінової кислоти за рахунок глютаміну. Заміна хлористого амонію в посівному середовищі на діамонійфосфат також дає можливість зменшити витрати глютамінової кислоти на синтез глютаміну.

Згідно з літературними даними, великий вплив на синтез глютамінової кислоти має кукурудзяний екстракт. Максимальної кількості глютамінової кислоти можна досягти при використанні посівної культури, вирощеної на середовищі з кукурудзяним екстрактом у кількості 0,6 %. Вплив кукурудзяного екстракту на приріст біомаси негативний: при збільшенні дози екстракту з 0,3 до 0,45 та 0,6 %; на стадії посівної культури кількість біомаси зменшується. Але питома продуктивність культури за глютаміновою кислотою із збільшенням дози екстракту зростає від 0,748 (в

середовищі без екстракту) до 1,584 (при дозі екстракту 0,6 %). Тобто, кукурудзяний екстракт у посівному середовищі для культури *Corinebacterium glutamicum* є джерелом енергетичних ресурсів, які забезпечують високу продуктивність при ферментації. Тому, збільшуючи дозу кукурудзяного екстракту в посівному середовищі, можна підвищити продуктивність за глютаміновою кислотою. Технологічний процес отримання глютамінової кислоти показано на апаратурно-технологічній схемі (рис. 6).

Вирощеною в лабораторних умовах культурою *Corinebacterium glutamicum* 3144 засівають посівне середовище в інокуляторі 1, де проводять її культивування протягом 18?24 годин. Об'єм посівного матеріалу в інокуляторі повинен бути не меншим 5 % від ємності середовища в ферментері.

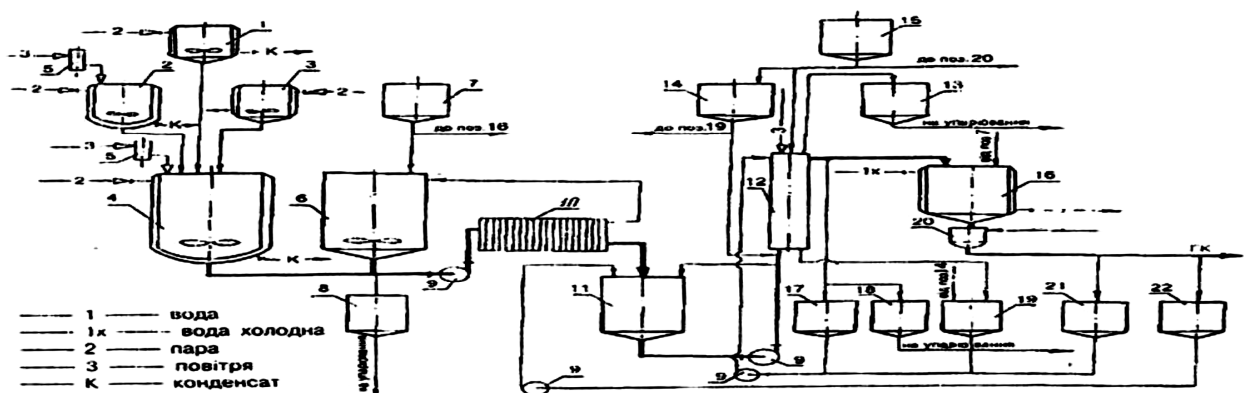


Рис. 6. Апаратурно-технологічна схема процесу отримання глютамінової кислоти

Вирощений в інокуляторі посівний матеріал передають по заздалегіть простерилізованому трубопроводі в ферментатор 4; ферментацію проводять із підживленням стерильним концентратом поживного середовища з апарата-сателіта 2.

Після закінчення ферментації культуральна рідина з біомасою надходить в реактор з мішалкою 6, в якому підкислюється концентрованою сірчаною кислотою до величини рН 1,5?2.

Для попередження сильного піноутворювання і нагрівання кислоту вводять невеликими порціями із періодичним перемішуванням протягом 30?40 хв.

Потім підкислена культуральна рідина подається на мікрофільтраційне обладнання 10 для відокремлення осаду у вигляді біомаси й мінеральних домішок 8.

Отриманий фільтрат збирається в спеціальний збірник 11, звідки подається на іонітний фільтр 12.

Внаслідок великої висоти іоннообмінника фільтрат культуральної рідини надходить на іоннообмінну колонну знизу вгору, що запобігає ущільненню гранул сорбенту. Пропускання фільтрату культуральної рідини закінчується після повного насичення катіоніту глютаміновою кислотою. Паралельно проводиться контроль за вмістом сухих речовин, глютамінової кислоти, показника заломлення і рН рівноважного розчину. Відібраний нативний розчин збирається в збірник 13, звідки подається на упарювання разом з елюатом, призначеним для скидання. Після закінчення процесу сорбції глютамінової кислоти частина фільтрату, яка знаходиться у фільтрі разом з несорбованою глютаміновою кислотою, скидається з колони у збірник 19 до оголення смоли й використовується в наступному циклі сорбції.

Для повного вичавлювання фільтрату з міжгранульного простору проводиться продування колони повітрям. Проведення такої операції зменшує витрати води на відмивання смоли елююванням глютамінової кислоти. Відмивання смоли дистильованою

водою 15 проводиться згори вниз до повного відокремлення кала будь-яких домішок культуральної рідини (контроль за показниками мутності й кольоровості). Після цього проводиться десорбція із смоли глютамінової кислоти 2 Н розчином аміаку. При цьому відбувається розділення елюату на бідні та багаті фракції. Бідні фракції складаються з початкових та кінцевих об'ємів елюату з концентрацією глютамінової кислоти не більше 15—20 г/дм<sup>3</sup>. Багаті фракції з вмістом глютамінової кислоти від 30 до 120 г/дм<sup>3</sup> збираються в реактор-кристалізатор 16.

У зв'язку з тим, що вміст аміаку в збагаченому елюаті становить не більше 0,6—0,67 %, з технологічної схеми виключається малопродуктивна операція з випарювання аміаку й довипарювання багаті частини елюату. Тому наступна стадія — кристалізація глютамінової кислоти. Для цього збагачена суміш повільно підкислюється до рН 3,2—3,4 концентрованою сірчаною кислотою, і при перемішуванні й поступовому зменшенню температури до 10—15 °С витримується протягом 15—18 годин до утворення кристалів глютамінової кислоти. Процес кристалізації завершується при накопиченні глютамінової кислоти в маточному розчині до 17—20 г/дм<sup>3</sup>. Потім проводиться відокремлення кристалів і їх промивання дистильованою водою.

Маточний розчин і промивні води збираються в проміжні ємності 21 і 22, з яких потім передаються: маточник — у цикл сорбції, промивні води — на повторне використання.

Через те, що отримані кристали глютамінової кислоти характеризуються високим ступенем чистоти (99 %) з технологічної схеми виключається стадія перекристалізації (розчинення кристалів глютамінової кислоти, обробка розчину активованим вугіл-



лям, кристалізація, відокремлення кристалів і відмивання їх водою). Після закінчення десорбції з катіоніту глютамінової кислоти відбувається скидання з колони розчину аміаку 13, з якого він згодом використовується як перша порція елюату в наступному циклі елюції, що зменшує як витрати глютамінової кислоти, так і кількість стоків.

Потім колона знову заповнюється 2Н розчином аміаку з метою регенерації смоли, тобто переведення її в  $\text{NH}_4^+$  — форму й виведення з неї барвників і мінеральних речовин 18. Після закінчення регенерації (розчин, що виходить, повинен мати світлий колір) розчин аміаку, що знаходиться у фільтрі, зливають у ємкість 19, а колона відмивається водою до величини рН 8,5—9 і в такому вигляді смола знову використовується для сорбції глютамінової кислоти. Більша частина промивних вод збирається в апарат 17, доводиться аміаком до 1Н розчину і знову використовується в наступному циклі в процесі десорбції і регенерації смоли.

За даною технологічною схемою повністю усувається частина стоків шляхом їх повторного використання в результаті повернення в робочий цикл, а решту стоків можна використати для отримання вторинних продуктів (корма для худоби й добрива).

Описаний спосіб одержання глютамінової кислоти та її солей характеризується такими технологічними показниками:

- концентрація глютамінової кислоти в культуральній рідині, г/дм<sup>3</sup>, не менше — 40,0;
- тривалість процесу ферментації — 52—66 год;
- коефіцієнт заповнення ферментатора — 0,6;
- тривалість вирощування посівного матеріалу — 24 год;
- тривалість повного обігу ферментатора — 72 год;

- витрати стерильного розчину сечовини на ферментацію —  $0,057\text{м}^3$ ;
- тривалість повного обігу збірника сечовини — 36 год;
- кількість завантажень ферментатора за тиждень — 2;
- вихід продукту, % до синтезованого, не менше — 65.

За даною технологією спеціалістами УкрНДІспиртбіопродукту розроблено вихідні вимоги на проектування промислового виробництва глютамінової кислоти та її солей на Лохвицькому спирткомбінаті та Лужанському експериментальному заводі.

### **Контрольні запитання**

1. Яке застосування знайшла глютамінова кислота в харчовій промисловості, медицині, хімічній промисловості?
2. Дайте характеристику промислових продуцентів глютамінової кислоти та її солей.
3. Які сучасні генно-інженерні підходи до створення штамів—нафтопродуктів глютамінової кислоти ви знаєте?
4. Які компоненти входять до складу живильних середовищ для виробництва глютамінової кислоти?
5. Яка залежність існує між синтезом біомаси та накопиченням глютамінової кислоти?
6. Чому на різних стадіях біосинтезу глютамінової кислоти використовуються різні джерела азотного харчування?
7. Як впливає кукурудзяний екстракт на ріст біомаси та на синтез глютамінової кислоти?
8. Охарактеризуйте особливості технології виробництва глютамінової кислоти та назвіть основні технологічні показники.

## 1.4. Технологія виробництва лимонної кислоти

### 1.4.1. Історія відкриття і виробництво

Лимонна кислота відкрита в 1784 році К. Шеєлем в лимонному соку. Вона зустрічається у вільному стані в соку різних плодів і фруктів, особливо її багато в лимонах, а також в смородині, вишні, малині, виноградному соку і т. д. Також вона зустрічається в органах людей і тварин, синтезується мікроорганізмами.

В 1891 році німецький вчений Велер, а в 1917 році Кері виявили здатність ряду грибів продукувати лимонну кислоту.

Приблизно до 1923 року лимонну кислоту отримували переважно із незрілих лимонів та тютюнового листа.

Сік, отриманий будь-яким шляхом, очищали від білкових та інших домішок, фільтрували і нейтралізували крейдою або вапняним молочком при кип'ятінні.

При цьому випадав цитрат кальцію, який розщеплювали сульфатною кислотою, а отриману лимонну кислоту очищали перекристалізацією.

Лише після того, як було відкрито утворення лимонної кислоти пліснявими грибами родів *Aspergillus* (*A. niger*, *A. clavatus*, *A. fumaricus*), *Penicillium* (*P. chrisogenum*, *P. citrinum*) та ін., вдалося, користуючись мікроорганізмами, виробити лимонну кислоту шляхом поверхневого бродіння.

В 1923 році американською фірмою Пфайзер було організовано перше мікробіологічне виробництво лимонної кислоти.

Радянським вченим Буткевичем В.С. (Москва) було зроблено принципово важливе відкриття — при культивуванні *A. niger* в присутності карбонату кальцію при активній кислотності середовища, близькому до 7,0, гриби накопичують переважно глюконову та щавлеву кислоту, а за умов високої кислотності без карбонату кальцію, синтезують практично одну лимонну кислоту.

Цей факт, підтверджений пізніше радянським вченим Костичевим, виявився принципово важливим при організації промислового виробництва лимонної та глюконової кислот не лише в нашій країні, але і за кордоном.

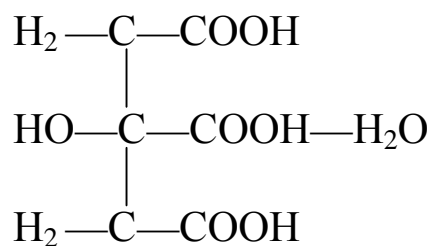
В 30-ти роки в СРСР було почато виробництво лимонної кислоти за допомогою грибу *A. niger*. Використовуючи цей пліснявий грибок, лимонну кислоту протягом багатьох років виробляли методом поверхневого бродіння. Протягом приблизно 60 років (починаючи з 1938—1942 рр.) лимонну кислоту почали виробляти у все більшому об'ємі глибинним методом. Таким чином, і в цьому випадку також перейшли від відкритого до закритого методу бродіння. Це дало можливість механізувати і автоматизувати процес, ефективніше використовувати робочі площі і знизити собівартість готового продукту, скоротити загальну тривалість технологічного циклу, полегшити дотримання асептичних умов за умов промислового виробництва.

Нині лідерами з виробництва лимонної кислоти являється Китай, США, Франція, Росія та інші країни. В значній кількості вона виробляється і в Україні.

### 1.4.2. Вимоги, які пред'являються до харчової лимонної кислоти

Харчова лимонна кислота призначається для використання в кондитерській, консервній, пиво-безалкогольній та інших галузях харчової промисловості.

Емпірична формула кислоти  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , а структурна



Молекулярна маса (за міжнародними атомними масами 1971 р.) — 21,014.

Згідно з вимогами ГОСТу 908 “Кислота лимонна харчова. Технічні умови.” лимонна кислота, яка виробляється в результаті ферментації цукрів грибом *Aspergillus niger*, повинна відповідати наступним вимогам:

- за органолептичними показниками вона повинна представляти безбарвні кристали або білий порошок без грудочок (для кислоти першого ґатунку допускається жовтуватий відтінок), мати кислий смак, не мати запаху та володіти сиплою та сухою структурою;
- масова частка лимонної кислоти в препараті, у перерахунку на моногідрат, %, повинна бути не менше 99,5 % та не більше 101,0 %.

Масова частка золи в товарному продукті не повинна перевищувати 0,07—0,35 % (у залежності від гатунку: екстра, вищий та перший).

### **1.4.3. Характеристика мікроорганізмів — продуцентів лимонної кислоти**

Продуцентами лимонної кислоти являються багато грибів роду *Aspergillus* (*A. awamory*, *A. clavatus*, *A. fumaricas* та ін.), роду *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. luteum* та ін.) а також *Mucor*.

Нині в якості продуценту лимонної кислоти використовують різні штами грибу *A. niger* (перш за все штам Р-3), які дають вихід лимонної кислоти 98—99 % в розрахунку на утилізовану цукрозу і яким властива підвищена осмотолерантність (при початковому вмісті цукру в поживному середовищі близько 12 %). Синтез лимонної кислоти грибом-продуцентом здійснюється звичайно на середовищах з високою концентрацією вуглеводів (5—20 %), при низьких значеннях рН та при достатній аерації.

Лимонну кислоту також можна отримувати із н-парафінів за допомогою дріжджевих організмів роду *Candida* — *C. lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. oleophilia*, *C. guilliermondii*, *C. zeylanoides*, *C. parapsilosis*. Однак всі ці мікроорганізми являються умовно патогенними. Крім того, вони утворюють на н-алконах трео-*Ds*-ізолимонну кислоту.

Накопичення лимонної кислоти може досягти 200 г/л і вище при виході кислоти від використаного парафіну понад 140 %.

В нашій країні культивують *C. lipolitica*. Культивування *C. lipolitica* здійснюють в ферментерах при активному перемішуванні і аерації середовища. Технічні солі, цитрати і ізоцитрати, які отримують в результаті таких процесів, використовують при виробленні миючих та інших засобів.

#### 1.4.4. Особливості технологічного процесу

Лимонна кислота являється інтермедіатом метаболізму в циклі трикарбонових кислот при неповному окисненні вуглецевих сполук в аеробних умовах. Її надсинтез відбувається при лімітуванні середовища залізом та фосфором, при одночасному надлишку в середовищі джерела вуглецю і при низьких значеннях рН.

Лимонна кислота накопичується спочатку в клітинах продуцента, а потім виділяється в культуральне середовище.

Основною сировиною для біосинтезу лимонної кислоти являється меляса, в якій міститься багато заліза, тому при підготовці сировини залізо осаджують за допомогою жовтої кров'яної солі (кальцій залізистосинеродистий технічний або калій залізистосинеродистий технічний за ГОСТ 6816).

Окрім цієї сполуки та меляси поживне середовище містить ряд солей та кислот:

калій фосфорнокислий однозаміщений за ГОСТ 4198;

калій фосфорнокислий двозаміщений за ГОСТ 3772;

сульфат цинку за ГОСТ 4174;

сульфат магнію за ГОСТ 4523;

амоній хлористий технічний за ГОСТ 2210;  
вапно, крейда, хлорид кальцію технічного за ГОСТ 450;  
амоній щавлевокислий за ГОСТ 5712;  
кислота щавлеву технічна та ін. сполуки. Використовується також і цукор.

Відомі два способи ферментації *A. niger* — поверхневий та глибинний. Перший із них здійснюють на підприємствах малої та середньої потужності на рідкому середовищі і у вигляді твердофазної ферментації на щільному середовищі (наприклад в Японії).

#### **1.4.5. Культивування на поверхні твердого середовища**

Цей спосіб культивування, як правило, здійснюється за трьох-ступеневою схемою. На першій стадії гриб *A. niger* вирощують на поверхні скошеного сусло-агару (або іншого середовища) в пробірках, на інших стадіях його розмножують на твердому або рідкому середовищі в колбах Ерленмейєра або в алюмінієвих кюветах з метою отримання конідій, які збирають аспіраційним способом, підсушують в термокамері при 28—30 °С та змішують із активованим вугіллям. Цей посівний матеріал надалі використовують для засіву зернового субстрату (рису, пшениці та ін.), який знаходиться в металевих кюветах.

Під час ферментації рН субстрату знижується до 1,8—2,0. Після закінчення процесу лимонна кислота разом із невеликою кількістю одночасно синтезованих глюконової та щавлевої кислот екстрагується водою, а потім осаджується у вигляді солі ка-



льцію. У зв'язку з тим, що зернові висівки багаті залізом та іншими мікроелементами, використовують штами *A. niger*, толерантні до високих концентрацій металів.

#### **1.4.6. Поверхнєве культивування на рідкому середовищі**

Цей спосіб реалізується в неглибоких кюветах із алюмінію площею 8,5—12 дм<sup>2</sup> з висотою бортиків від 7 до 20 см (рис. 7). Кювети розташовують на стелажах в термостатованих “бродильних камерах” (по 8—10 штук на стелаж). Ці кювети мають зливний штуцер. “Бродильні камери” обладнані притічно-витічною вентиляцією. Температура в камерах підтримується в межах (35±1 °С), висота поживного середовища, яке містить мелясу, 6—12 см. Середовище містить високу концентрацію цукру (близько 12 %). Під час ферментації рН середовища поступово знижується з 6,8—7,0 до 4,5 протягом перших трьох діб, і до 3,0 — до кінця процесу (8—9 доба). Максимальне кислотоутворення відбувається на 5—6 добу, а максимальна інтенсивність росту міцелію спостерігається на 4-ту добу, що супроводжується активним тепловиділенням та утворенням діоксиду вуглецю.

Із трьох варіантів технологічного процесу (періодичний, змінний та доливний) найкращим являється доливний, при якому на 6—7 добу при концентрації цукру в середовищі на рівні 3—4 % під плівку доливають стерильний свіжий розчин меляси (без поживних солей) в кількості 30—35 % від початкового об'єму. В результаті цього тривалість ферментації збільшується з 8—9 до 12 діб. В кінці ферментації культуральну рідину зливають з-під

плівки, плівку промивають стерильною водою і під неї заливають свіже поживне середовище із меляси (без солей). Ферментація триває ще 4—6 діб.

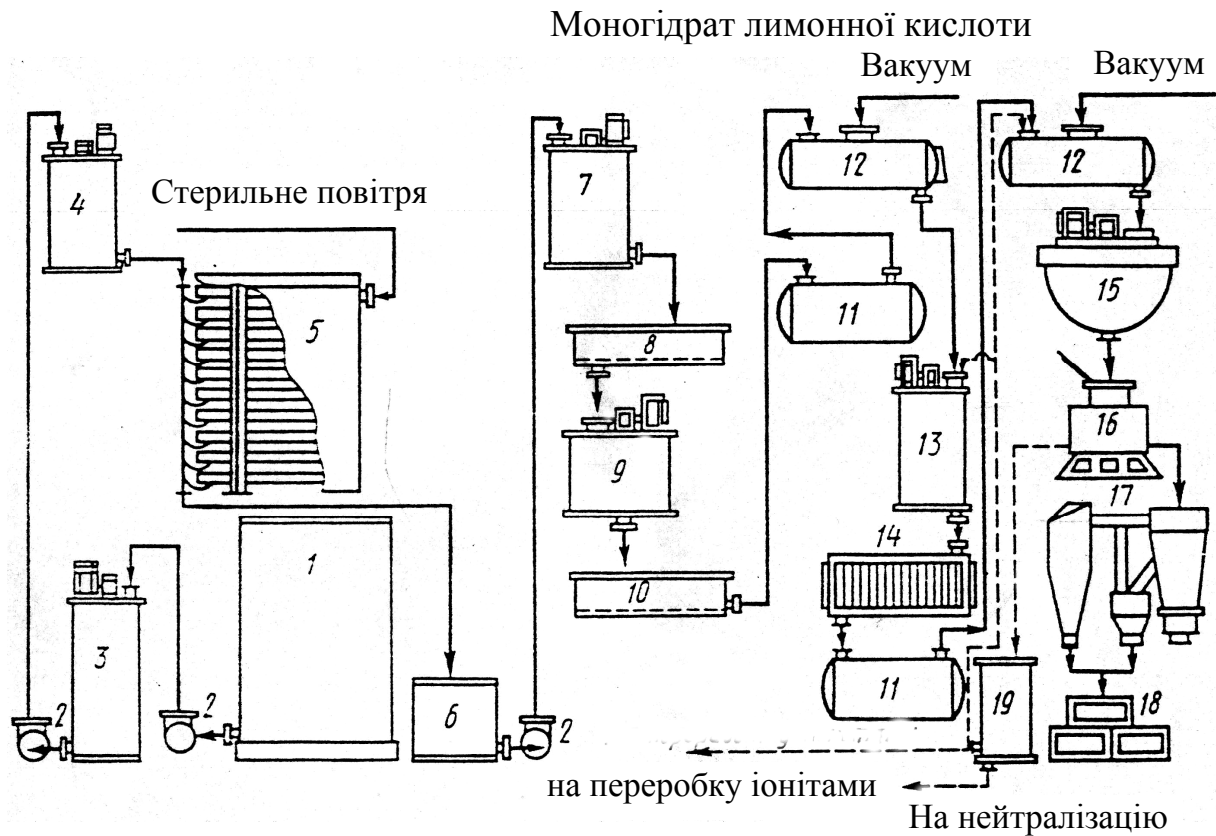


Рис. 7. Технологічна схема одержання лимонної кислоти з меляси поверхневим способом: 1 — цистерна для меляси; 2 — відцентрові насоси; 3 — реактор для розведення меляси; 4 — стерилізатор; 5 — бродильна камера; 6 — збірник зброджених розчинів; 7 — нейтралізатор; 8 — нутч-фільтр; 9 — расщеплювач; 10 — нутч-фільтр; 11 — збірник-монтежу; 12 — вакуум-апарат; 13 — дисольвер; 14 — фільтр-прес; 15 — кристалізатор; 16 — приймач; 17 — сушарка; 18 — готова продукція; 19 — збірник фільтрату

Глибинне культивування — це найбільш молодий спосіб виробництва лимонної кислоти, який має ряд суттєвих переваг — він більш ефективний, його легше механізувати та автоматизувати.

Штами *A. niger*, які використовують для поверхневого культивування, непридатні для глибинного культивування. Най-

більш поширеним в нашій країні являється мутантний штам грибу *A. niger* № 288/9.

За цим способом процес ферментації включає дві стадії: 1) поетапне вирощування інокуляту в інокуляторі та в посівному апараті при безперервному перемішуванні протягом 20—36 год при температурі  $(31 \pm 1)$  °С. Ємність посівного апарату становить приблизно 1/10 ємності ферментера; 2) вирощування міцелію та накопичення лимонної кислоти в ферментері протягом 5—10 діб на мінерально-м'яясному середовищі, що містить 3—4 % цукрів.

На цій стадії здійснюють трьохразовий долив  $(26 \pm 1)$  % розчину м'яся з метою доведення кінцевої концентрації цукру в середовищі до 12—15 %.

М'яся слугує джерелом вуглецю в середовищі, однак перед використанням її звільняють від іонів заліза, магнію та інших металів за допомогою жовтої кров'яної солі (фероціаніду калію). Збродження м'яся в кислоту завершується наступним відділенням міцелію шляхом фільтрації.

Культуральна рідина містить суміш органічних кислот — лимонну, шавлеву, глюконову, неутілізовані цукри у приблизному співвідношенні 45—50: 3 : 1 : 7.

Відікремлення лимонної кислоти із культуральної рідини базується на її властивості утворювати малорозчинну сіль — трьохкальцієвий цитрат, який отримують нейтралізуючи розчин вапняковим молочком —  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  або крейдою —  $\text{CaCO}_3$ , і доводячи рН до 6,8—7,0.

Трьохзаміщений цитрат кальцію разом з оксалатом кальцію випадає в осад, а глюканат кальцію залишається в розчині. Осад промивають гарячою водою. Промитий цитрат кальцію роз-

кладають сульфатною кислотою, в результаті реакції отримують розчин лимонної кислоти та гіпс ( $\text{CaSO}_4$ ), який випадає в осад. Розчин лимонної кислоти після відділення гіпсу направляють на двохстадійне упарювання в вакуум-апарати. На першій стадії кислоти розчини випарюють до густини 1,24—1,26, що відповідає концентрації лимонної кислоти близькій до 70 %.

Розчин лимонної кислоти після першого випарювання обробляють активним вугіллям.

В процесі випарювання розчинів лимонної кислоти випадає гіпс (який не тільки забруднює розчини, але й відкладається на поверхні нагріву, знижуючи коефіцієнт її тепловіддачі).

Гіпс відділяється від розчину на фільтрпресі, а фільтрований розчин для подальшого концентрування надходить на друге упарювання під розрідженням до густини близько 1,35—1,38 (69—71 % мас. безводної кислоти). Потім розчин відфільтровують на контрольному фільтрпресі і спрямовують в кристалізатор.

Останнім часом розроблена досить ефективна технологія очищення розчинів лимонної кислоти їх фільтрацією через іонітну установку. Застосування іонообмінної очистки розчинів лимонної кислоти призводить до того, що практично повністю видаляються мінеральні домішки та частково органічні, знижується зольність кристалічної лимонної кислоти в 10 разів, стабілізується якість готового продукту та підвищується випуск кислоти вищого гатунку з 30 до 60 %, виключається використання ферроціаніду калію для осадження важких металів, ліквідується механічна очистка поверхні випарних апаратів, підвищується температу-

ра початку кристалізації і тим самим підвищується вихід кристалів до 10—12 %.

Завершуючи операції технологічного процесу — кристалізація, центрифугування і висушування лимонної кислоти багато в чому визначають якість та вихід лимонної кислоти. Кристалізація відбувається при безперервно працюючій мішалці та закінчується, коли температура маси, що кристалізується, знижується майже до температури охолоджувача (холодна вода або розсіл). Температурний режим кристалізації: охолодження від 70 до 37 °С проводять зі швидкістю 10 °С за годину. При кінцевій температурі розчин витримують 30 хв для дозрівання кристалів.

Враховуючи схильність лимонної кислоти утворювати сильно пересичені водні розчини за відсутності центрів кристалізації при температурі близько 37 °С в кристалізатори вводять затравку у вигляді дрібних кристалів лимонної кислоти розміром близько 0,25 мм в кількості 0,05 % (за масою розчину, що кристалізується).

Сучасна технологія передбачає одноступеневу безперервну кристалізацію лимонної кислоти. В цьому випадку очистка розчину лимонної кислоти рекомендована в три етапи: знебарвлення активованим вугіллям, катіонний іонообмінник, аніонний іонообмінник. Для більшої ефективності використовується попереднє нагрівання розчину перед випарною станцією.

Отримані кристали після вібраційної сушарки фракціонуються. Кристали, які не відповідають стандарту щодо розміру, накопичуються, і за існуючою технологією розчиняються, а розчин подають на випарку. Ці кристали можуть бути використані як затравка для наступної кристалізації.

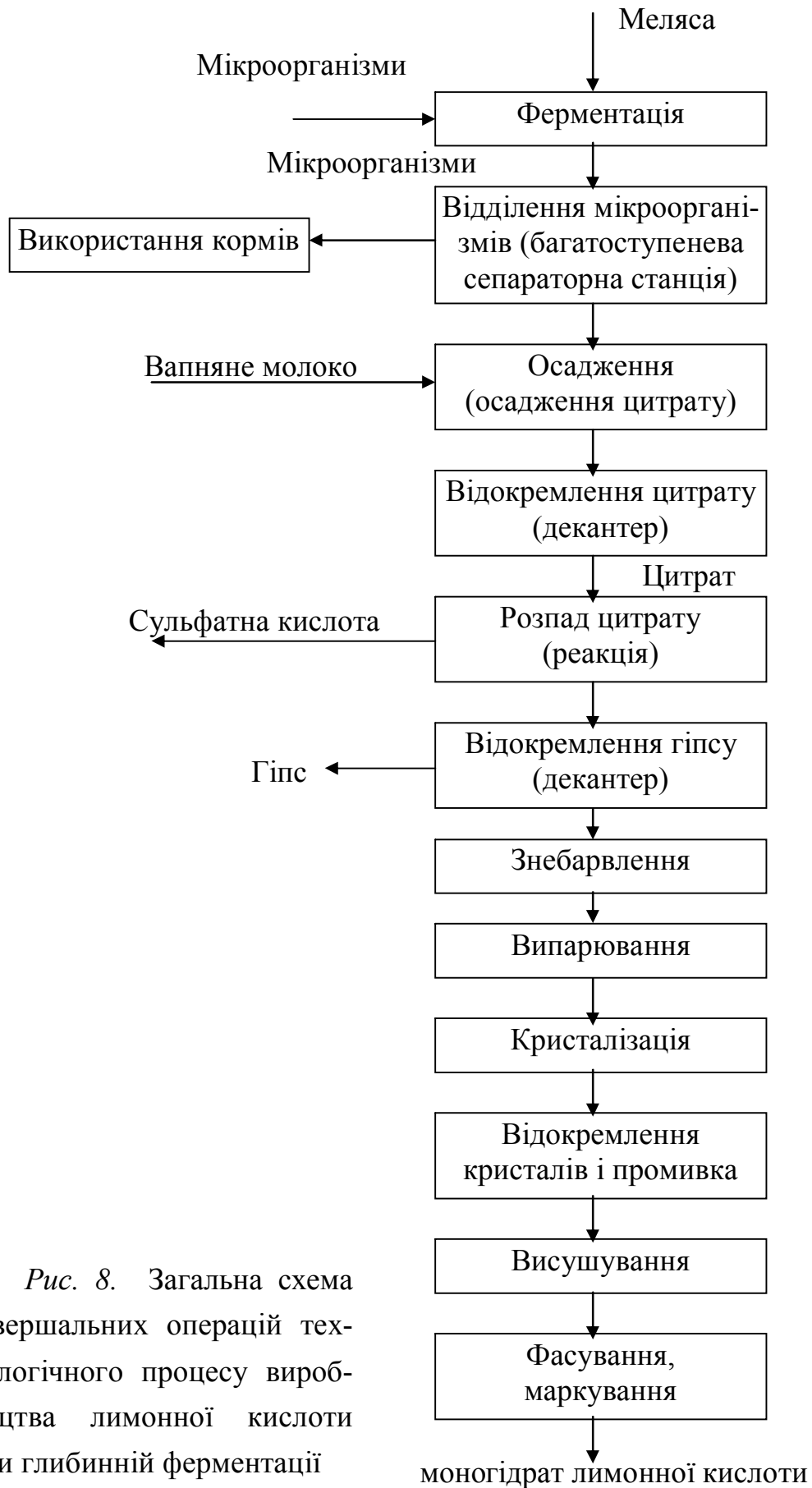


Рис. 8. Загальна схема завершальних операцій технологічного процесу виробництва лимонної кислоти при глибинній ферментації

В загальному процесі виробництва лимонної кислоти звертає увагу велика кількість технологічного обладнання: декантерів, центрифуг, сепараторів, кристалізаторів. Так, наприклад, для відокремлення і промивки міцелію при глибинному культивуванні використовують соплові сепаратори. Для відокремлення щавлевої кислоти, переведеної вапняним молоком в оксалат кальцію, використовують самоопорожняючі сепаратори. Для відокремлення трикальцій-цитрату, який утворюється після осадження лимонної кислоти, і для відокремлення гіпсу після розпаду цитрату кальцію, використовуються декантери. Легка фаза, яка виходить із переливу декантера і в якій знаходиться лимонна кислота, випарюється і кристалізується, як описано вище.

Висушені кристали надходять у продаж як моногідрат лимонної кислоти. Завершальні операції технологічного процесу виробництва лимонної кислоти показані на схемі (рис. 8).

#### **1.4.7. Застосування лимонної кислоти**

Галузі застосування лимонної кислоти різноманітні. Це харчова промисловість, яка використовує лимонну кислоту для виготовлення лимонадів, фруктових напоїв, фруктових вин, вермуту, карамелі із фруктовим соком, морозива та повидла. В якості харчових добавок використовується чиста лимонна кислота (E 330 — *Citric acid*) та її солі: цитрат натрію (E 331 — *Sodium citrates*) та цитрат калію (E 332 — *Potassium citrates*) та цитрат кальцію (E 333 — *Calcium citrates*).

Основними технологічними функціями цих сполук являються регуляція кислотності, антиоксидантні функції (для ли-

монної кислоти), емульгуючи, стабілізуючі властивості та здатність до комплексоутворення.

Перерахування галузей застосування у фармацевтичній промисловості, кормовиробництві та техніці лимонної кислоти зайняло б досить багато часу.

Лимонна кислота наразі і в майбутньому одна із найважливіших кислот, які отримують ферментативним шляхом.

### **Контрольні запитання**

1. Назвіть переваги і недоліки глибинного і поверхневого способів виробництва лимонної кислоти. Який спосіб доцільно застосовувати на підприємствах малої і середньої потужності (до 2,5 тис. тон лимонної кислоти на рік)?

2. Чому у виробництві лимонної кислоти методом твердофазної ферментації використовують штами *A. niger*, резистентні до високих концентрацій заліза та інших металів?

3. Охарактеризуйте основні переваги доливного способу виробництва лимонної кислоти.

4. Яку роль відіграє жовта кров'яна сіль у виробництві лимонної кислоти?

5. Порівняйте різні способи очищення розчинів лимонної кислоти.

6. На яких стадіях технологічного процесу виробництва лимонної кислоти використовуються декантери, сепаратори, центрифуги, випарні апарати?



## **Глава 2. БІОТЕХНОЛОГІЯ НАПОЇВ**

### **2.1. Соки та напої, отримані шляхом зброджування**

#### **2.1.1. Характеристика продуктів**

Необхідність створення біотехнології виробництва овочевих та молочних соків та напоїв була обумовлена значними втратами біологічно-активних речовин, таких як вітаміни, білки та ін. в результаті “жорсткої” стерилізації цих напоїв та соків з метою забезпечення їх мікробіологічної стабільності. Ці втрати були особливо значними для тих продуктів, які мали низьку кислотність. Тому виникла необхідність створити технологію виробництва овочевих та інших видів соків, яка б забезпечила максимальне збереження нативних біологічно активних речовин, а також їх направлену біологічну трансформацію з отриманням речовин, необхідних для організму людини.

Молочнокисле бродіння, або лактоферментація, з використанням сухих молочнокислих сквашувальних культур являється успішним способом консервації соків та напоїв.

Як уже зазначалося, під час лактоферментації із одної молекули глюкози або фруктози утворюється дві молекули молочної кислоти. Поява двох іонів водню знижує рН середовища, що дозволяє застосовувати більш “м’які” режими стерилізації; крім того, молочна кислота має консервуючу дію.

Зброджені овочеві соки мають радіопротекторні та антиканцерогенні властивості, обумовлені комбінованим впливом їх складу та імуногенної активності молочнокислих бактерій.

Зброджені овочеві соки та напої поширені в деяких зарубіжних країнах світу як продукти, здатні захистити організм людини від хвороб цивілізації.

Зброджування овочевих соків здійснюється спеціально підібраними штамами молочнокислих бактерій, найбільш придатними до лактоферментації. Сухі закваски використовують у вигляді спеціальних препаратів без попереднього процесу зброджування та додають до соків та напоїв у кількості 0,1 %. Тривалість процесу бродіння залежить від виду сировини та продукту та досягає 16-24 годин. Раніше для зброджування овочевих соків та напоїв використовувались рідкі закваски.

Виробництво зброджених овочевих соків та напоїв включає в себе наступні операції: первинну обробку сировини, отримання соків та напоїв, ферментацію за допомогою молочнокислих заквасок, гаряче розливання в склотару або в тару з термостійких полімерних матеріалів або асептичне розфасовування на установках типу “Тетра-брік—асептик”.

Соки та напої, отримані в результаті ферментативного бродіння, мають високий вміст біологічно-активних речовин. Так, наприклад, в збродженому буряковому соку виявлено високий вміст вітамінів В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, РР, йоду, заліза, ацетилхоліну. Присутність бетаїну надає йому червоного забарвлення. Барвники буряка, потрапивши до організму людини, здатні покращити засвоєння та дію аскорбінової кислоти. Клітковина та органічні кислоти бурякового соку стимулюють перистальтику кишечника.

Зброджені бурякові соки та напої покращують склад крові, попереджують виникнення склерозу судин, стимулюють діяльність щитовидної залози, нирок, печінки. Кобальт, присутній в

буряці, приймає участь в синтезі вітаміну В<sub>12</sub>, який виробляють корисні організми мікрофлори кишечника.

В збродженому морквяному соку виявлений β-каротин, вітаміни С, РР, калійні солі.

В збродженому капустиному соку знайдено вітаміни С, В, РР, U, калій, фосфор. Зброджені капустині соки завдяки присутності в них вітаміну U поліпшують обмін речовин, сприяють заживленню виразок шлунка та дванадцятиперстної кишки. Сульфарафан, який знаходиться в клітинах капусти, стимулює синтез фермента, здатного ефективно перетворювати канцерогенні речовини. Зброджені овочеві соки та напої рекомендуються при дизбактеріозах, тому що нормалізують мікробний ценоз кишечника, регулюють його моторну функцію, а також корисні для хворих з порушенням проникності капілярів та покращують кровообіг. Розчинні пектини, що містяться в соках та напоях, попадаючи в шлунковий тракт, набубнявлюють та сприяють адсорбції з кишкового тракту токсинів та солей важких металів.

Дослідженнями встановлено, що під час молочнокислого бродіння в овочевих соках та напоях збільшується вміст амінокислот, вітаміну С, калію, заліза та зменшується кількість важких металів (таблиці 3 та 4).

Встановлено, що в процесі бродіння в буряковому соку збільшується вміст аспарагінової кислоти в 7,2 рази, глютамінової кислоти — в 4,4 рази, цистину — в 1,2, ізолейцину — в 1,7, гістидину — в 1,2, лізину — в 1,3 та заліза — в 1,9 разів.

В збродженому капустиному соку вміст важких металів знижується в 2,4 рази, а нітратів — вдвічі.

**Таблиця 3. Зміна вмісту амінокислот, вітамінів та мінеральних речовин в процесі бродіння бурякового та морквяного соку**

Хімічний склад продукту	Сік буряковий		Морквяний напій	
	Натуральний	Зброджений	Натуральний	Зброджений
1	2	3	4	5
Вільні амінокислоти, мг/100 г:				
Аспарагінова	19,7	141,3	21,1	27,7
Глутамінова	31,1	137,5	37,9	64,8
Гліцин	4,6	5,1	1,5	1,5
Аланін	32,3	38,4	—	—
Цистін	3,9	4,8	17,9	23,7
Валін	11,8	13,2	11,7	11,9
Ізолейцин	16,5	27,6	—	—
Гістидин	7,2	8,6	4,6	4,9
Лізін	2,4	31,2	2,3	11,3
Вітамін С, мг/100 г	3,9	4,6	—	—
В-каротин, мг/100 г	—	—	8,2	8,6
Мінеральні речовини, мг/100 г:				
Калій	2120,0	2280,0	1206,0	1270,0
Залізо	1,5	2,8	2,5	3,5
Мідь	0,03	0,04	0,23	0,15

Біотехнологія використовується не лише для отримання цінних зброджених овочевих соків та напоїв, але і для створення молочної основи для напоїв на основі молочної сироватки.

**Таблиця 4. Зменшення вмісту важких металів під час збродження овочевих соків**

Елемент	Натуральний сік	Зброджений сік
Важкі метали, мг/кг:		
Свинець	0,2	0,04
Кадмій	0,03	0,01
Ртуть	0,02	не виявлено
Мідь	0,2	0,1
Цинк	1,4	1,2
Арсен	не виявлено	не виявлено
Пестициди, мг/кг:		
Карбофос	—	—
Децис	0,001	0,0005
ДДТ	не виявлено	не виявлено
Нітрати (KNO <sub>3</sub> ), мг/кг	640	310

Переробка молочної сироватки в продукти харчування — один із найбільш перспективних напрямків біотехнології.

В останній час російськими та українськими вченими В.Д. Харитоновим, А.Г. Храмцовим, К.К. Полянським, М.М. Ліпатовим, А.М. Шалигіною, В.Д. Жидковим та ін. активно розвивається напрямок з глибокої переробки методами харчової біотехнології молочної сироватки з перетворенням її компонентів без їх виділення у речовини, що мають біологічно активні та технологічно корисні властивості та вироблення на цій основі привабливих, корисних та недорогих для споживачів продуктів. Найбільш перспективною формою реалізації даного напрямку являється виробництво напоїв. Молочна основа напоїв із молочної сироватки містить основні натуральні компоненти молока в кра-

щому співвідношенні, ніж інші джерела. Вони надають їй імуннозахистних та лікувально-профілактичних властивостей.

*Попит на продукти, що виробляються із молочної сироватки, обумовлений протилежним впливом слідуючих факторів.*

До числа стимулюючих факторів відносяться:

- висока харчова та біологічна цінність основних компонентів молочної сироватки (таблиця 5);
- висока питома вартість природоохоронних заходів, пов'язаних з евакуацією невикористаної молочної сироватки разом із стоками підприємств.

**Таблиця 5. Харчова та біологічна цінність основних компонентів молочної сировини**

Білок	Перетравлюваність, %	Біологічна цінність, %	Чиста утилізація білка, %
Казеїн	97	68	66
Білки сироватки	98	84	82
Білок яйця	99	99	97
Яечний альбумін	100	97	97

До стимулюючих факторів відносяться:

- незадовільні органолептичні властивості молочної сироватки;
- висока питома собівартість продукції, які виробляються із молочної сироватки традиційними способами, що значною мірою обумовлено високим вмістом в ній води та розчинних компонентів.

*З урахуванням цих факторів на ряді молочних заводів в Росії та за рубежом проводяться роботи по виробленню із молочної сироватки молочної основи для виробництва освіжаючих напоїв з лікувально-профілактичними властивостями.*

Загальна концепція підходу до розроблення схеми виробництва молочної основи полягає в :

- напрямленому перетворенні сиркової сироватки методами харчової біотехнології для поліпшення її технологічних та споживчих властивостей, інтенсифікації процесів;
- використанні та найбільш ефективному комбінуванні процесів та технологічних заходів, взятих із різних напрямків перероблення сиркової сироватки;
- мінімізації числа технологічних операцій шляхом їх суміщення та раціональної послідовності виконання.

Дана концепція найбільш ефективно може бути реалізована у виробництві напоїв, що містять біологічно корисні речовини, які отримують перетворенням натуральних компонентів молочної сироватки без їх виділення.

Важлива роль при виробленні молочної основи відведена процесам харчової біотехнології: коагуляція білків, ферментативним, біохімічним, фізико-хімічним, а також гідромеханічним процесам.

При виробництві ферментованих молочних продуктів велику роль відіграють протеолітичні процеси. Вони приймають участь у формуванні показників смаку, запаху й реології напоїв на молочної основі. На білки молочної сироватки діють ферменти молокозгортальних препаратів та ферменти протеолітичних систем молочнокислих бактерій заквасок. В результаті дії цих пре-

паратів та окремих штамів лактококів та лактобацил в збродженій молочній сироватці утворюються пептиди з антигіпертензивною дією — казокініни та інші біологічно-активні речовини.

Подальший розвиток біотехнології виробництва ферментованих напоїв на молочній основі відкриває широкі можливості для створення нових видів функціональних і лікувальних продуктів, біологічно активних харчових добавок.

## **2.2. Технологія виробництва пива**

### **2.2.1. Сучасний стан ринку пива в Україні**

Пивоваріння — одна із найбільш динамічних галузей національної харчової промисловості.

Для зарубіжних і вітчизняних інвесторів пивоварна галузь приваблива тим, що ринок пива в Україні далеко не насичений.

При споживанні на душу населення 20—30 літрів пива на рік місткість ринку можна оцінювати як мінімум у 155 млн. дал. Україна має власну сировинну базу для пивоваріння, тому ця галузь харчової біотехнології має перспективи та резерви для свого розвитку.

Пивоварна справа в Україні розвивається з кінця 19 сторіччя. Добрі традиції пивоварів вдалося зберегти і в 20 сторіччі. Але асортимент пивоварних заводів Радянської України був досить обмеженим. Основною маркою пива, яке вироблялося в той час, було всенародно улюблене “Жигулівське”. Сучасний асортимент пивоварних заводів України складається з декількох десятків найменувань, серед яких такі відомі марки як “Рогань”, “Чернігівське”,



“Оболонь” та інші. Значну частину ринку слабоалкогольних напоїв в Україні представлено пивом імпортного виробництва (в основному з Польщі, Нідерландів і Словаччини). Основний постачальник імпортного пива на відчизняному ринку — Польща.

Вада імпортного пива — наявність у ньому значної кількості консервантів, що подовжує термін зберігання, проте знижує смакові якості. З цієї точки зору перевагу має відчизняне пиво у скляній тарі.

### **2.2.2. Характеристика продукту**

Пиво — слабоалкогольний, насичений вуглекислотою напій, приготований із затору, що містить ячмінний солод, як єдине або основне джерело сировини.

Для того, щоб зварити пиво, необхідні чотири складові частини — вода, солод, хміль та дріжджі. Якість пива у великій мірі залежить від якості води, адже вміст води в пиві перевищує 90 %. Вода, яка використовується для приготування пива, повинна відповідати вимогам, які пред’являються до питної води.

Для приготування світлого пива найбільш підходить м’яка вода, жорсткістю до 1,8 мг-екв/дм<sup>3</sup>, а на жорсткій воді (3,5—7 мг-екв/дм<sup>3</sup>) кращим буде темне пиво. Вода із вмістом заліза, що перевищує 5 мг/дм<sup>3</sup>, не придатна для виробництва пива, тому що надає пиву специфічного смаку.

На багатьох сучасних пивзаводах воду для пива отримують із артезіанських свердловин.

Солод — це пророщений та оброблений спеціальним способом ячмінь. Зерно ячменю складається із зародку, який дасть початок новій рослині, та ендосперму, що містить багато крохма-

лю. Це резервний крохмаль, який являється резервом харчування для зернини на той час, поки з зародку не утворяться коріння та листя, необхідні для самостійного харчування рослини. При проростанні зародок вимагає олейронові клітини, що лежать під оболонкою зерна, виробляти ферменти, які перетворюють крохмаль в цукри та використовуються в пивоварінні.

Ячмінь спеціальних пивоварних сортів очищується, сортується, дезінфікується, на декілька діб замочується.

Зерна проростають, в них накопичуються ферменти. Пророщені зерна підсушуються та очищуються від зародків.

Навіщо потрібен солод? В солодких фруктах та овочах цукор завжди присутній у вигляді вуглеводів, що легко засвоюються організмом, вони в основному представлені короткими молекулами, які складаються з двох — трьох мономерів глюкози. Тому виноград солодкий на смак, а дріжджі швидко беруться за перетворення цукру у виноградному соку в алкоголь. Але в зернах злаків зібрані більш крупномолекулярні вуглеводи, нерозчинні у воді, несолодкі на смак та не придатні для утилізації звичайними дріжджами — в основному це крохмаль. Його довгі, розгалужені молекули необхідно розбити на більш короткі сегменти. Для цього і використовують солод, тобто ячмінні зерна, в яких при пророщуванні з'являються природні ферменти, здатні розщеплювати крохмаль. За певних умов вологості та температури, які строго підтримуються пивоварами, зародок зерна ячменю починає виробляти специфічні гормони. Вони проникають із зародку в ендосперм — основну частину зерна, в якій запасуються вуглеводи, і там синтезуються ферменти, здатні здійснювати розщеплення клітинних стінок ендосперма, крохмалю та білків. Все це в пере-

вареному ферментами вигляді повинно піти для споживання зародком, для того, щоб із зерна проріс зародок. Але на цій стадії пророщування зупиняють підсушуванням ячмінного зерна при помірній температурі до вологості близько 15 %, а потім при 80—90 °С — до 4—5 %. За такої температури вуглеводи вступають у реакцію з амінокислотами зародку, утворюючи меланоїдіни — темні сполуки із специфічним запахом та смаком. Цей процес відбувається за реакцією Майяра, яка сприяє утворенню апетитної темної шкуринки на м'ясі, яке піджарюють на паніровочних сухарях. Реакція Майяра відбувається також при інших технологічних процесах — в процесі випікання хліба, під час карамелізації цукрів та ін. Це одна із найбільш таємничих і найменш досліджених стадій процесу пивоваріння, який значною мірою обумовлює смак та колір пива. Для темного пива солод “піджарюють” при більш високій температурі — до 225 °С, для того, щоб утворилося більше продуктів реакції Майяра.

Крім того, що меланоїдіни надають пиву характерних органічних властивостей, вони також впливають на білково-колоїдну стійкість пива та попереджають його закаламучування.

Для виробництва пива, в основному, використовують солод чотирьох гатунків: світлий — використовують для пива всіх гатунків; карамельний (підігрітий до 155 °С) — для пива сортів “Медовий”, “Четвірка”, “Шестірка”; житній (з добавкою житнього зерна) — використовують в “Четвірці”; палений (піджарений до 225 °С) — для отримання темних сортів пива (“Шестірка”).

Кожний гатунок солоду надає пиву характерного смаку та кольору.

Багато пивоварних заводів України використовує високоякісний солод іноземного виробництва. Темні сорти солоду ніколи не використовуються поодиноці, тому що ферменти в них вбиті нагріванням, ці сорти солоду можуть слугувати лише доповненням до світлих.

Солод очищують, подрібнюють та змішують з водою — отримують затор. Затор утворюється в процесі затирання.

Під час затирання відбувається розщеплення крохмалю до декстринів та цукрів, збільшення кількості розчинних речовин та набухання колоїдних сполук.

Останнім часом для оптимізації вуглеводного та азотного складу сусла в затор вносять амілолітичні, протеолітичні та цитолітичні ферменти, особливо коли частину солоду замінюють неосолодженою сировиною, що дає змогу розширити асортимент і знизити затрати на виробництво продукції.

З використанням неосолодженої сировини в пивоварінні вміст вільних жирних кислот у суслі зменшується, що може бути причиною збільшення потреби дріжджів у кисні та нікотиновій кислоті. Аналогічний ефект спостерігається при використанні ліпідів, екстрагованих із солодової дробини.

Збагатити ліпідний склад сусла можна, якщо використати при затиранні ліполітичний ферментний препарат ліпоксантин. Розроблено спосіб приготування пивного сусла, за яким на стадії затирання до зернопродуктів додають 0,01 % ліпази, що сприяє збільшенню в суслі вмісту загальної кількості ліпідів і таких біологічно важливих фракцій, як жирні кислоти і стерини. Одержане за цим способом сусло зброджується на 1—1,5 доби швидше.

При затиранні найбільшу активність проявляють протеїнази.

Установлено, що піноутворення пива визначається білковими колоїдами, а піноутримуюча здатність — продуктами збродження — спиртами, ефірами, леткими кислотами та ін. Гатунки пива з незначним вмістом азоту мають високу піноутворюючу здатність.

В готовому пивному суслі повинно знаходитися близько третини азотистих речовин у вигляді сполук, здатних осаджуватися таніном. Із 100 г азоту солода при затиранні в розчин переходить від 30 до 55 %.

При 60 °С в заторі утворюється більше речовин, що не здатні до коагуляції, таких як альбумози. Для виробництва більш стійкого пива затирання проводять при температурі 45—50 °С — при цій температурі в заторі утворюються менш складні білкові речовини.

Таким чином, затирання солоду може проводитися в широкому діапазоні температур — від 45 до 75 °С, в залежності від гатунку пива.

При затиранні як уже зазначалося, значно активізуються різні ферменти, в тому числі і ті, що перетворюють крохмаль в цукри; ці ферменти призводять до накопичення великої кількості мальтози в заторі.

Для ефективної роботи ферментів солоду при виготовленні високоякісних марок пива зарубіжні фірми коригують рН затору, а також знижують рН сусла за допомогою молочної кислоти з метою забезпечення мікробіологічної стабільності й смаку пива. За цим методом уже кілька років працюють вітчизняні пивзаводи.

Водний екстракт, який отримують в результаті затирання солоду, називається сусллом.

Вплив фізико-хімічних та біохімічних показників солоду на якість готового пива відомий. Однак діапазон цих показників досить широкий навіть для стандартного солоду, не говорячи вже про нестандартну сировину.

Для отримання якісного сусла необхідно проводити контроль таких показників в солоді, як ступінь розчинності білків (число Кольбаха, вміст амінного азоту, високомолекулярних білків — танінового показника, ступінь зброджування конгресного сусла, в'язкість сусла), без яких неможливо правильно вибрати спосіб приготування сусла для виробництва пива високої якості.

Різна якість солоду призводить, як правило, при одному і тому ж режимі затирання до отримання сусла різної якості та готового пива.

### **2.2.3. Особливості технології**

В залежності від фізико-хімічних показників солода регулюють технологічний режим виробництва пива. Так, наприклад, при виробництві „Жигулівського” пива для солодів із ступенем розчинності нижче 2,6 %, залишковому вмісті амінного азоту 200—220 мг/100 см<sup>3</sup> та з таніновим показником до 0,6 одиниць оптичної густини виключають білкову паузу при 52 °С та роблять більш довгу мальтозну при 63 °С — до 30—35 хв. Це скорочує тривалість оцукрювання та збільшує швидкість фільтрації сусла. При недостатньому вмісті амінного азоту (до 190 мг/100 см<sup>3</sup>) тривалість оцукрювання становить 25—30 хв.

При високому таніновому показнику (вище 0,6 одиниць оптичної густини), білкову паузу встановлюють близько 20 хвилин, мальтозну (при 63 °С) — 30 хвилин; затор прокип'ячують 50 хвилин та витримують при 70 °С до повного оцукрювання.

Для виробництва пива, аналогічно за якістю до „Жигулівського”, оптимальними являються наступні фізико-хімічні показники пивного суслу:

- масова частка сухих речовин — близько 11,0 %;
- масова частка редукувальних цукрів — не менше 55 % (70,0—75,0 — оптимально);
- відношення цукрів до нецукрів в %, — 1,03—1,04;
- масова частка загального азоту (мг/см<sup>3</sup>) — 89,0—132,0;
- масова частка амінного азоту (мг/см<sup>3</sup>) — 150—200;
- коагулюючий азот (мг/см<sup>3</sup>) — 1,0—2,0;
- таніновий показник, одиниць оптичної густини (в перерахунку на 11 % сусло) — 0,4—0,55;
- кінцевий ступінь зброджування (КСЗ) — 75,0—80,0;
- в'язкість мПА·с — 1,4—1,5.

*Отримане сусло фільтрують. Твердий залишок сусла — пивна дробина, йде на корм тваринам.*

Дробина містить оболонку ячмінного зерна та частини ядер зерна. Дробина використовується в свіжому та висушеному вигляді. В 100 кг свіжої пивної дробини міститься 21,2 кормових одиниці (к.о.) та 4,2 кг протеїну, що легко засвоюється тваринами; в 100 кг сухої пивної дробини — 75,7 к. о та 169 кг протеїну. Свіжу пивну дробину в суміші з іншими кормами скормлюють коровам, волам, свиням; суху — включають в склад кормів для

корів, великої рогатої худоби, ставкових риб, свиней, худоби на відкормі.

Відфільтроване сушло змішують з ще одним важливим компонентом — смолою хмелю. Смола хмелю — це в'язка речовина жовтого кольору, що міститься в нектарниках в основі жіночих суцвіть (шишок) хмелю (*Humulus lupulus*), близької родини коноплі.

Хміль багатий гіркими речовинами, в тому числі гумулоном ( $C_{21}H_{30}O_5$ ) та близькою до нього сполукою лупулоном, які екстрагуються сушлом та маскують його прісність та слабку солодкість. Можливо, в суслі з цими гіркими сполуками відбуваються нескладні молекулярні перебудовування, в результаті яких, шестичленний цикл розривається та перетворюється в п'ятичленний та утворюються більш гіркі, ніж гумулон та лупулон речовини.

Шишки хмелю містять близько 8—10 % гірких, дубильних та ароматичних речовин. Речовини хмелю сприяють утворенню характерної пивної піни, стимулюють в подальшому роботу дріжджів та перешкоджають розвитку в суслі шкідливих мікроорганізмів; на нервову систему людини алкалоїди діють заспокійливо.

В Україні хміль вирощують ще з 10 сторіччя. Планації звичайного хмелю (*H. lupulus*) знаходяться в Житомирській, Ровенській, Львівській та Хмельницькій областях.

В пивоварінні хміль являється найбільш дорогою сировиною, тому його біологічно активні речовини використовуються дуже погано, частину хмелю завозять на Україну.

Хміль для виробництва пива почали використовувати порівняно недавно, в середині XVI сторіччя, в деяких країнах до цього часу виробляють пиво без хмелю. Хміль — унікальна рос-



лина, шишки його містять майже 100 гірких речовин, яких поки що не виявлено в інших рослинах, 325 компонентів ефірної олії та понад 70 поліфенольних сполук. Ці сполуки надають пиву характерного специфічного гіркого смаку й аромату, беруть участь в освітленні й утворенні піни, а також підвищують його стійкість під час зберігання. Крім того, більшість сполук хмелю біологічно-активні й мають лікувальні властивості. Шишки хмелю містять комплекс інших біологічно активних речовин — фітогормони, токофероли, вітаміни (С, РР, В<sub>3</sub>, В<sub>6</sub>, F, провітамін А). Тому незабаром, крім пивоваріння, хміль широко використовуватимуть і в лікувальній практиці. У народній медицині шишки хмелю використовують уже більше як 2500 років. Нині фармацевтична промисловість світу виготовляє понад 100 лікарських препаратів на основі хмелю.

Відомо, що гіркі речовини затримують ріст мікроорганізмів (бактерій і грибів), підсилюють секрецію шлункового соку й поліпшують апетит. Серед поліфенолів рутин та катехіни мають високу Р-вітамінну активність.

Шишки хмелю містять значну кількість катехінів, які майже повністю знежкоджують вплив на організм сторонцію-90.

Ряд фенолкарбонічних кислот підсилює функцію нирок та антитоксичну функцію печінки.

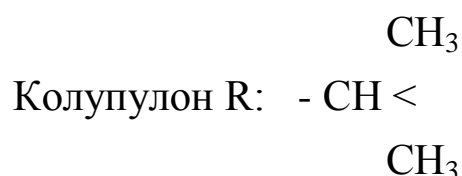
Терпеноїди заспокійливо діють на центральну нервову систему, а також мають високі антисептичні властивості.

Добре відомі серцеві препарати валокордин та корвалдин, які містять ефірну олію хмелю.

Як відомо, серед гірких речовин основні компоненти —  $\alpha$ -, та  $\beta$ -кетокислоти.

Кількість  $\alpha$ -кислот коливається залежно від селекційного сорту хмелю від 1 до 8 %, а  $\beta$ -кислот — від 2 до 12 %.

У 1993 році вперше з'явилося повідомлення, що речовини, які містяться в шишках хмелю, пригнічують розвиток раку, особливо колупулон (складова сполука  $\beta$ -кислот).



Компоненти  $\alpha$ - та  $\beta$ -кислот мають великий антиокислювальний потенціал і перехоплюють вільні радикали в клітині, які порушують структуру ДНК. Встановлено, що гумулон ефективний при терапії лейкемії. Під час охмеління  $\alpha$ -кислоти перетворюються в ізо- $\alpha$ -кислоти, однак їх лікувальні властивості ще не встановлені.

Японськими вченими доведено, що лупулон затримує ріст бактерії (*Helicobacter pylori*), які спричиняють виникнення виразки дванадцятипалої кишки та раку шлунка. Лупулон виявляє сильну антибактеріальну активність проти трьох штамів *Helicobacter pylori*.

Останнім часом значну увагу приділяють ксантогумолу та ізоксантогумолу хмелю. Ці сполуки виявляють атиканцерогенну дію, і нині проводяться інтенсивні дослідження з лікування ракових захворювань.

Вміст ксантогумолу ( в %) у сортах хмелю вітчизняної селекції:

Клон 18 ..... 0,4—0,5;

Поліський ... 0,4—0,5;

Сильний ..... 0,6—0,8;  
 Заграва ..... 0,6—0,7;  
 Гайдамацький ..0,3—0,35;  
 Потіївський ... 0,7—0,8;  
 Злато Полісся .. 1,08.

У зарубіжних сортах хмелю вміст ксантогумолу такий:

Перле .....0,28;  
 Магнум..... 0,58;  
 Наггет ..... 0,56;  
 Тегнанг..... 0,37;  
 Таурал ..... 1,08.

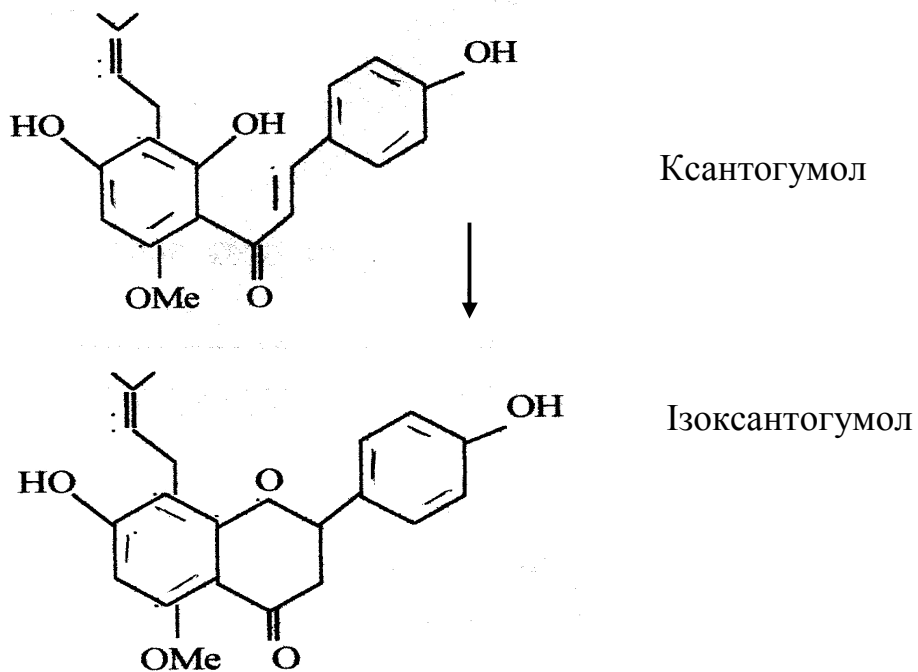


Рис. 9. Структурні формули ксантогумолу та ізоксантогумолу хмелю Колупулон — пренільований флавоноїд. У процесі охмілення сусла ксантогумол перетворюється в ізоксантогумол, який в основному знаходиться в пиві.

Про антиканцерогенну дію ксантогумолу й структурно подібних речовин шишок хмелю вперше було повідомлено в березні 1998 року на конференції Американського товариства токсикології в Сієтлі дослідниками Орегонського державного університету. Шишки хмелю містять цілий комплекс сполук, подібних до ксантогумолу.

Ксантогумол у біологічних тестах виявився найактивнішою сполукою. Навіть за його низької концентрації призупиняється ріст ракових клітин (рак молочної залози, яєчників, простати), причому він не впливає на здорові клітини. Помітна дія ксантогумолу на ріст ракових клітин проявляється при концентрації від 0,1 до 100 мКмоль. Гранули хмелю (тип 90) містять таку ж кількість ксантогумолу як і шишки певного селекційного сорту.

Японські дослідники у 1999 року опублікували статтю про профілактичні властивості пива проти раку.

Пиво — єдиний напій, який містить хміль, при цьому використовуються практично всі його фізіологічно корисні сполуки. При охмелінні сусла 70 % ксантогумолу перетворюється в ізоксантогумол, а в готовому пиві залишається лише 30 %. Залежно від сорту пива й норми хмелю і хмільових препаратів для охмеління сусла кількість ізоксантогумолу коливається від 1,1 до 3,4 мг/дм<sup>3</sup>, а ксантогумолу — близько 0,1 мг на дм<sup>3</sup> пива.

Для підвищення профілактичної дії пива проти онкологічних захворювань слід збільшити норми нативного хмелю (шишки, гранули), передусім ароматичних сортів, з метою підвищення поліфенолів і гірких речовин.

Досить важливий процес при кип'ятінні пивного сусла з хмелем — коагуляція білків. Високий їх вміст в охмеленому суслі

може бути причиною різних помутнінь готового пива й зниження його стійкості.

Під час кип'ятіння сусла теплова коагуляція білків відбувається у дві стадії. У першій — часткова дегідратація (втрата зв'язаної води) молекул білка, так звана денатурація. Друга стадія — власне коагуляція, коли денатуровані молекули з'єднуються між собою і утворюють пластівці.

За наявності поліфенольних речовин швидкість коагуляції білків зростає. Поліфенольні — це колоїдні речовини з від'ємно зарядженими частинками й з дегідратуючими властивостями. Тому вони реагують переважно з позитивно зарядженими азотистими речовинами, дегідратують їх і підтримують утворення пластівців.

Поліфенольні речовини солоду й хмелю осаджують білки, які не коагулюють. Недарма підвищена доза хмелю спричиняє значне виділення білків. Встановлено, що в різних сортах хмелю різний загальний вміст поліфенолів і якісний склад. Однак поки що немає точних експериментальних доказів залежності стійкості пива від сорту хмелю.

М.І. Ляшенко довів, що для одержання пива високої якості відношення загальної кількості поліфенольних речовин до  $\alpha$ -кетокислот у хмелі має становити 1,2—2,0 од. Однак для правильного й раціонального використання хмелю його дозують по  $\alpha$ -кетокислоті, що здебільшого не дає змоги ввести поліфенольні речовини в сусло в достатній кількості й певної якості.

Рядом досліджень встановлено, що фенольні сполуки антиоксидантів з іншої рослинної сировини більш реакцієздатні, ніж з хмелю. Додавання рослинних антиоксидантів до пивного сусла під час кип'ятіння його з хмелем позитивно впливає на процес

коагуляції білків. Найефективніше сприяють коагуляції білків сусла фенольні сполуки з дубової кори й трави м'яти.

В результаті коагуляції білків в суслі утворюються зависі двох типів: важкі та легкі.

Важкі зависі видаляються із сусла досить легко — у відстойних чанах, гідроциклонах при температурі вище 60 °С. Це в основному комплекси білків із фенольними сполуками, які не розчиняються в гарячому суслі. Технологи завжди намагаються збільшити скоагульований білок, водночас збільшуючи осад важких зависей.

Легка завись утворюється при охолодженні сусла й починає виділятися при температурі нижче 60 °С.

Із сусла її видалити складно, і вона може погіршити бродіння внаслідок осідання на поверхні дріжджевих клітин. Видалити її можна сепаруванням охолодженого сусла перед подачею його на бродіння.

На практиці вплив легких зависей зменшують тим, що сусло зброджують у чанах попереднього бродіння, через чотири години перекачують його разом із дріжджами у звичайний бродильний чан. На дні чану попереднього бродіння осідають мертві клітини дріжджів, та клітини, на яких адсорбувалися частки легких зависей.

Додання антиоксиданту з дубової кори в сусло під час його кип'ятіння з хмелем, після видалення дрібних зависей із сусла сепаруванням, досить перспективне для одержання пива з високою стійкістю.

*Суміш сусла з хмелем близько години прокип'ячують в суслотоварочних котлах. Хміль надає пиву характерного хмільного*

*аромату. При нагріванні з хмелю виділяються гіркі сполуки, що надають пиву характерного смаку (хміль містить близько двох сотен смакових речовин).*

Щоб утримати втрати в мінімальних межах, все в більшій мірі використовуються хмелеві екстракти та інші хмелеві концентрати, такі як смола хмелю. Використання хмелевого екстракту дозволяє економніше використовувати приміщення, холод та транспорт.

При 100 % заміні хмелю хмелевим екстрактом відпадає необхідність в хмелевому цідилі з його втратами екстракту.

Велика перевага використання хмелевого екстракту полягає ще і в тому, що він краще консервується та більш просто та точно дозується.

Використання екстракту дозволяє значно спростити варочний процес, тому що екстракт при варці краще розчиняється та, таким чином, зменшуються втрати сусла.

Речовини, які випали в осад при прокип'ячуванні хмелю, відокремлюють в апаратах циклонного типу, і сусло поступає в зброджувальний цех. Тут охолоджене сусло потрапляє в зброджувальні танки, в яких до нього додають дріжджі.

#### **2.2.4. Характеристика пивних дріжджів**

Дріжджі перетворюють цукристі речовини в етанол та діоксид сірки.

Варити пиво люди навчилися не менш восьми тисяч років тому. А певні відібрані та підтримувані людиною штамми дріжджів із стандартними властивостями використовуються лише років двісті. Правда, в деяких місцях, наприклад в Бельгії, і нині варять деякі сорти пива на основі “диких” дріжджевих грибків, що попадають в сусло буквально зі стелі — із стропил старовинних дерев’яних будівель пивоварні.

Дріжджі, які використовують в пивоварінні, відносяться до родини сахароміцетів (*Saccharomycetaceae*).

Розрізняють дріжджі верхові та низові (*Sacch. cerevisiae*).

Верхові дріжджі концентруються в верхній частині реактора, тому технологічні процеси, в яких використовуються ці дріжджі, називаються процесами “верхового бродіння”. Верхові дріжджі використовуються у виробництві англійського пива, таких сортів як ель та портер, берлінського світлого пива, які відрізняються підвищеною кислотністю та міцністю, мають солодовий смак та помірну хмелеву гіркоту, що частково пояснюється вільним доступом кисню до дріжджевих клітин. Верхові дріжджі, на відміну від низових, не зброджують рафінозу. Низові дріжджі працюють, опустившись на дно ємкості. При низовому зброджуванні отримують більш легке пиво типу лагер (з німецької “lagern” означає “зберігати” або “витримувати”). Ця назва відображає процес освітлення пива шляхом його витримання при температурі, що ненабагато перевищує температуру замерзання.

Всі пивні дріжджі низового бродіння здатні до утворення пластівців та мають властивість флокулювати — це забезпечує швидке осідання дріжджів на дно зброджувальних ємкостей. Це



дозволяє отримувати напій, що має певний смак та аромат, і дозволяє проводити зброджування при температурі 2—7 °С.

Потрапляючи в сприятливі для своєї життєдіяльності середовища, дріжджі починають активно зброджувати сусло. Поглинаючи цукри, дріжджі перетворюють їх у спирт, вуглекислий газ та близько сотні органічних сполук, які всі разом і утворюють пиво, його смак та аромат, надають пиву стійкості. До складу цих сполук відносяться альдегіди, вищі спирти, які називаються си-вушними маслами, пропіловий спирт, н-бутиловий спирт, аміловий спирт, піровиноградна кислота, н-пропіловий спирт, ізомасляний, ізовалеріановий та інші альдегіди та речовини.

Більшість із вищих спиртів, які ідентифіковані в пиві, являються побічними продуктами синтезу таких амінокислот, як ізолейцин, валін, лейцин. Утворення ацетальдегіду при бродінні в кількості 50—120 мг/дм<sup>3</sup> пов'язано з анаеробним розпадом вуглеводів; альдегіди вищого порядку в основному утворюються в результаті перетворень амінокислот.

*На процес бродіння сусла впливає співвідношення в суслі глюкози та мальтози. Концентрація глюкози, за якої починається споживання мальтози, змінюється для різних рас дріжджів. Так, раси 11, 776 починають споживати мальтозу через 18 годин після початку бродіння при залишковій концентрації глюкози в середовищі 0,07 %, а 8a (M) — навіть при 0,8 %. Інші раси дріжджів починають споживати мальтозу при нижчих концентраціях глюкози — 0,3?0,5 % через 21—36 годин після початку процесу. При використанні дріжджів раси 8a (M), 11 ступінь зброджування середовища через 7 діб становить відповідно 95,0 та 93,8 %, що на 6,3?15 % вище, ніж при використанні інших рас.*

На процес бродіння впливають і підібрані високоефективні раси дріжджів, які використовуються у спиртовому виробництві — XII та V-30. Оптимальні дози і їх внесення в сусло при виготовленні темних сортів пива дають позитивні результати. Застосування раси V-30 дає змогу скоротити на 2—3 доби тривалість основного бродіння й поліпшити якість кінцевого продукту.

Інтенсифікувати процес зброджування можна підвищивши їх бродильну активність на стадії основного бродіння аеруванням суспензії насінневих дріжджів у молодому пиві (1:2) при температурі 1–2 °С протягом 30—40 хвилин з наступною витримкою без доступу повітря впродовж 3—4 годин.

*Останнім часом зріс інтерес до іммобілізації дріжджових клітин на нерозчинних екологічно чистих носіях. Бродіння на іммобілізованих дріжджах здійснюється пропусканням течії сусла крізь шар мікроорганізмів у біореакторі певної конструкції. Шар дріжджів та діатоміту (або кізельгуру) наливають на пластини фільтрокартону, закріплені в рамному фільтрі. При цьому тривалість процесу виготовлення пива становить 3—5 діб.*

Цікаві результати отримано в результаті обробки пивних дріжджів ультразвуковими коливаннями протягом 120—180 с — за рахунок цього максимум виділення діоксиду сірки досягається на 1—2 доби раніше контролю, а швидкість процесу бродіння зростає на 33—40 %, дріжджі краще флокулюють.

Через деякий час дріжджі “втомлюються”, насичуються, впадають у “сплячку” та осідають на дно, звідки їх забирають, поміщають в спеціальні дріжджеві збірники, де вони “відпочивають”. Після відпочинку їх знову пускають у виробництво.

Цікаво, що дріжджі дуже чутливі до підвищених температур. Звичайні літні температури Середньої Європи перевищують верхню межу, за якої пивні дріжджі ще можуть працювати. Тому

до появи холодильної техніки європейські пивоварні інтенсивно працювали взимку, накопичували готову продукцію в холодних підвалах, а на літо закривалися. Крім, звичайно, пивоварень Росії, Норвегії, Швеції та інших країн з холодним кліматом.

Продукт життєдіяльності дріжджів — етиловий спирт, отруєє їх. Дріжджі гинуть при вмісті спирту 12,5 %, але їх активність знижується вже при 7—8 %, тому пиво, яке отримують простим зброджуванням, не може бути міцнішим цього значення. Більш міцні гатунки пива отримують іншими способами, наприклад, частковим виморожуванням води або простим добавленням спирту.

Після бродіння, яке триває 7—8 діб при 5—9 °С (в залежності від гатунку пива), молоде або зелене пиво поступає на доброджування в закриті циліндричні ємкості (лагерні танки). В лагерних танках пиво доброджується при низьких температурах (від 0 до — 2 °С). В цей час із пива виділяються деякі леткі речовини, пиво освітлюється, облагороджується, на смак стає більш м'яким та гармонічним. Тривалість доброджування становить 21—90 діб.

### **2.2.5. Новітні технології виробництва пива**

За сучасною європейською технологією пивоваріння бродіння сусла проводять в ферментерах (бродильних танках), які дозволяють здійснювати обидва процеси — бродіння та дозрівання — в одній ємкості, що дозволяє економити час, виключає додаткове перемішування, а це позитивно впливає на якість пива.

В середньому пиво знаходиться в танках протягом 22 діб.

Після цього пиво майже готове, але воно каламутне, в ньому присутні часточки дріжджів та хмелю. Щоб вилучити їх та надати напою товарного вигляду — характерного блиску та прозорості, його фільтрують.

Найбільш популярна чотирьохступенева схема фільтрації. Спочатку пиво поступає на сепаратори, де відокремлюються дріжджі та зависі. Потім воно проходить наступний ступінь очищення (грубе очищення) через кізельгуровий фільтр. Кізельгур (діатоміт) представляє собою спеціально підготовані, подрібнені в порошок залишки панцирів діатомітових водоростей, які відклалися на дні озер та морів близько 20 мільонів років тому.

Діатомії — коричневі одноклітинні водорості, целюозна мембрана яких має властивість утримувати діоксид кремнію, що міститься у воді. Таким чином, вони утворюють шматочки із гідратованого діоксиду кремнію, розмір яких знаходиться в межах від 5 до 40 мікрон. Після фосилізації із цих часток утворюється діатоміт.

Замість діатоміту можуть використовуватися сучасні фільтруючі матеріали, такі як Кларсель, які отримують в результаті обробки діатоміту — подрібнення, висушування, отримання порошкоподібної форми з точним гранулометричним складом.

При проходженні через шар цієї кремнієвої породи затримуються більш дрібні домішки. Після цього пиво на стадії стабілізації взаємодіє з деякими природними адсорбентами, що дозволяє йому зберігати свої якості протягом тривалого часу. Завершується фільтрація стадією глибокого очищення в спеціальних стерилізуючих фільтрах.

Потім напій проходить через декілька шарів картону, отвори в якому настільки малі, що через них не можуть проникнути навіть мікроорганізми.

При інших технологічних режимах очищенню на сепараторах підлягає гаряче сусло, трубне сусло, молоде пиво, тобто пиво безпосередньо після основного зброджування.

Сепарація молодого пива дозволяє зекономити час, тому що можна починати відкачування пива шлангами, коли ще частина дріжджів знаходиться в суспензії.

Крім того, сепарація молодого пива забезпечує зменшення частки дріжджів до постійно низького значення.

*Сепараторами освітлюють також лагерне пиво, як низового, так і верхового бродіння. Сепарація лагерного пива дозволяє відокремлювати до 99 % дріжджів. Завдяки цьому розвантажуються стадія кізельгурової фільтрації, що помітно відображується на зниженні витрат кізельгуру або діатоміту. А економія фільтруючого матеріалу означає зменшення витрат на міроприємства з охорони навколишнього середовища у зв'язку із скороченням витрат на зберігання у відвалі.*

Всі лінії виробництва пива намагаються максимально автоматизувати.

Готовий напій далі надходить до накопичувальних ємкостей, а звідти — на розлив. На цій стадії пиво розливають по скляним пляшкам, алюмінієвим банкам різної ємкості, кегам (30-літровим алюмінієвим бочкам), та пластиковим пляшкам, які формуються із гранул. Але перед розливом пиво стерилізують, щоб напій якомога довше зберігав свої споживчі властивості.

Пастеризація — це короткочасна високотемпературна витримка пива. На великих підприємствах стерилізацію виконують в поточних стерилізаторах, які не змінюють якості пива. Пиво нагрівають до 72 °С, а потім охолоджують до 12 °С, і весь процес займає близько 30 секунд. За цей час смак напою не змінюється.

Пастеризація запобігає закаламучуванню пива в результаті розвитку в пиві деяких мікроорганізмів, та сприяє зростанню білково-колоїдній стійкості пива. Іноді для запобігання закаламучуванню пива використовуються спеціальні ферменти — протеази бактеріального або грибного походження. Бактеріальні протеази отримують із *B.subtilis*, а грибні — із *Aspergillus*, *Penicillum*, *Mucor* або *Amylomyces*.

Найчастіше використовують кислі протеази, папаїн та інші ферменти.

На цих етапах процесу якість продукту строго контролюється за встановленими стандартами. На виробництві пива повинен також здійснюватися вхідний контроль якості сировини, всього технологічного процесу, тари, пакувальних матеріалів, етикеток та інше.

На виході із блоку розливу пляшки проходять стадію автоматичного контролю якості укупування та ємкості наливу.

Розливання пива в пляшки на сучасних виробництвах здійснюються на лініях розливу зі швидкістю до 33 пляшок в секунду (120 тисяч пляшок за годину).

Готову продукцію упаковують в ящики або термосідавальну упаковку (полімерну плівку, яка при нагріванні гарячим повітрям зсідас та щільно обтягує предмет, який пакується).

В останній час різними пивзаводами виробляється безалкогольне пиво із вмістом спирту не більше 0,5 %. Перші партії слабоалкогольного пива із вмістом спирту 0,2 % були зварені в Німеччині ще в 1918 році. В основі виробництва пива цих гатунків лежить діалізна фільтрація.

Пиво фільтрують через спеціальну мембрану з ультрамікроскопічними отворами, через які проходять дрібні молекули спирту, але в розчині залишаються всі крупні високомолекулярні речовини, які визначають аромат пива.

Ще на початку 20-го сторіччя багаточисленні публікації в науковій літературі були присвячені технологіям безперервного бродіння в пивоварінні. Більшість із цих пропозицій не знайшла своєї реалізації. Впровадження технологій безперервного бродіння обмежується, як правило, двома суттєвими факторами: безперервне бродіння доцільне лише на тих виробництвах, де мінімальний об'єм виробництва становить 50 тис. дал. на рік; при безперервному виробництві можна отримувати пиво лише одного гатунку, здатність системи до змінювання нижча, ніж при періодичному способі. Проблема також полягає в необхідності постійного вилучення побічних продуктів (хмелю, осаду щодо). Але безперервне бродіння, на відміну від періодичного, в меншій мірі інфікується, дає більш високий вихід пива, дозволяє економити виробничі площі, вимагає менших капітальних затрат. При безперервному бродінні отримують пиво високої якості, воно краще піниться, в ньому сильніше відчувається гіркота.

Безперервний процес виробництва пива здійснюється, як правило, в батареї із шести алюмінієвих ферментерів (танків) зі швидкістю потоку 500 дм<sup>3</sup>/день. Температура перших трьох єм-

ностей, в яких відбувається, в основному, зброджування підтримується на рівні 10 °С, в інших ферментерах, призначених, в основному, для дозрівання, температура становить близько 0 °С.

Профільтроване через кізельгур сушло подають в перший ферментер та засівають дріжджами. Засів здійснюють раз в три місяці, а весь процес зброджування триває близько шести місяців.

Кожний ферментер можна відключати окремо після його відключення від батареї. Потім сушло проходить через інші ферментери, в яких підтримується різний тиск вуглекислого газу з перепадом між чанами в 0,2 атм. В другому та третьому ферментерах під нахилом встановлюють холодильні тарілки, які полегшують виділення осаду. В четвертому ферментері пиво освітлюється та виходить через верх у п'ятий танк. В п'ятому ферментері пиво проходить через шар вуглекислоти та відмивається від аромату молодого пива. В ньому ж воно насичується вуглекислотою. Характер потоку через ферментер сприяє освітленню пива. Бродіння відбувається при невисокій швидкості розмноження дріжджів. Тривалість всього циклу бродіння, включаючи дозрівання, не перевищує 18 діб. Перед бродінням за цим методом необхідна стабілізація сушла, тобто його витримка при низькій температурі. Цей метод, поширений в Чехії, називається методом Велленгера.

В Канаді запатентований безперервний процес бродіння, що базується на двухступеневому культивуванні, за так називаним методом Гейгера та Камптона (фірма "Лабатт"). На першому ступені переважають аеробні умови та висока концентрація дріжджів, що в 10 разів перевищує звичайну концентрацію дріжджів, характерну для звичайного періодичного процесу (близько 3 % сухих речовин дріжджів). Температура культивування дріжджів



на цій стадії процесу становить 16 °С. На другому етапі відбувається процес бродіння сусла в двох чанах, сполучених разом, за умов анаеробіоза.

Подібний до канадського й метод, який використовується в Новій Зеландії (фірма “Домініон”) — за цим патентом виробляється близько 90 % пива, яке виготовляють в цій країні.

Безперервні процеси впроваджені на великих пивоварених заводах світу. Однак в різних країнах різні вимоги до якості пива, вспінювання, вмісту діоксиду вуглецю. Майже всі безперервні методи включають карбонізацію пива після бродіння.

Деякі рецептури пива передбачають використання кукурудзи або рису в складі затору, але і в цьому випадку затори містять більш 50 % ячмінного солоду. При використанні кукурудзи або рису отримують більш легке пиво з достатньо низькою екстрактивністю.

Рисовий або кукурудзяний крохмаль осолоджується (від слова “солодкий”, оскільки на відміну від крохмалю моно- та дисахариди мають солодкий смак) до глюкози, як і ячмінь. Рисове пиво називають sake (sake звичайно називають рисовою водкою, хоча за технологією виробництва цей напій можна віднести скоріше до пива); в цьому випадку попередній гідроліз крохмалю здійснюють мікроорганізми *Aspergillus oryzae*, що ростуть на рисі. Перша стадія виготовлення sake — отримання культури плісняви. Спори плісняви, взяті від попередньої партії, висівають на замочений рис і вирощують грибок до тих пір, доки міцелій не проникне через всю масу рису. Відбувається гідроліз крохмалю грибною амілазою, що міститься в грибній масі. При накопиченні достатньої кількості цукрів, відбувається спонтанне спиртове

бродіння. В коїї присутні як молочнокислі бактерії, так і дріжджі, тому крім спирту та  $\text{CO}_2$  утворюється молочна кислота. Таким чином, виробництво пива із зерна на Сході відрізняється від процесів, які використовуються на Заході, у двох відношеннях: оцукрювання здійснюється мікроорганізмами і відбувається воно одночасно із бродінням.

В Америці та в деяких районах Середнього Сходу використовується ще один, третій компонент, який сприяє оцукрюванню — слину людини, що містить амілази. Індіанці Центральної та Південної Америки готують кукурудзяне пиво, жуючи зерна та випльовуючи суміш в ємкість, де з нею відбувається спонтанне спиртове бродіння.

## Контрольні запитання

1. Які вимоги пред'являються до якості води для виробництва пива та напоїв?
2. Назвіть способи поліпшення якості води для вироблення пива.
3. Які хімічні перетворення відбуваються в ячмені при замочуванні?
4. Навіщо висушують свіжепророщений солод?
5. Які основні якісні показники житнього солоду?
6. Які параметри характеризують головне бродіння і доброджування пива?
7. Яку будову має клітина пивних дріжджів?
8. Охарактеризуйте фази розвитку пивних дріжджів.

9. Які дріжджі застосовуються в пивоварінні?
10. Які процеси відбуваються при доброджуванні?
11. Який порядок приготування пивного сусла?
12. Для чого кип'ятять сусло із хмелем?
13. Назвіть фактори, які впливають на швидкість фільтрування.
14. Який порядок приготування пивного сусла?
15. Що таке стійкість пива і чим вона обумовлюється?
16. Які фактори впливають на смак та аромат пива?
17. За якими фізико-хімічними показниками визначають якість пива?

## **2.3. Особливості біотехнології квасу**

### **2.3.1. Характеристика квасу**

Хлібний квас відноситься до слабоалкогольних напоїв.

Хлібний квас — це напій темно-брунатного кольору з приємним ароматом житнього хлібу та кислувато-солодким смаком. Його отримують шляхом неповного зброджування сусла дріжджами та молочнокислими бактеріями. Заводи виробляють “Хлібний квас”, “Московський квас”, “Російський квас” та ін., які відрізняються в основному вмістом екстракту.

### **2.3.2. Особливості технологічного процесу**

Сировиною для виготовлення квасу слугує червоний житній солод, житня та ячмінна мука, світлий ячмінний солод, цукор,

іноді — м'ята. Житній солод містить багато меланоїдинів, що обумовлюють смак, аромат та колір напою. Солод для квасоваріння (житній) використовують для оцукрювання крохмалю хлібної сировини.

Квас, який отримують із квасних хлібців, вважається найкращим за смаком. Хлібці випікають із суміші подрібненого житнього (64,5 %) та ячмінного (10,5 %) солоду та житньої муки (25 %) в спеціальних печах. Весь процес приготування хлібців займає близько 20 годин. З метою тривалого зберігання хлібці висушують, а потім подрібнюють, отримуючи сухий квас.

Останнім часом більшість заводів з виробництва квасу для приготування квасу використовує концентрат квасного сусла, який виробляється спеціалізованими заводами, що значно спрощує технологію квасоваріння та дозволяє збільшувати обсяг вироблення квасу влітку.

Концентрат квасного сусла готують з сухого червоного житнього солоду (до 90 %) та з сирого, що містить ферменти житнього солоду (10 %).

До суміші подрібненого солоду додають ферментний препарат та проводять затирання настійним способом, поступово збільшуючи температуру затору від 35 до 74 °С з інтервалами 1—2 години при температурі 40, 50, 63 та 70 °С.

Оцукрений затор фільтрують і сусло направляють до вакуум-апарату, в якому він упарюється до концентрації сухих речовин 72 г в 100 г сусла. Концентрат являється густою в'язкою рідиною темно-брунатного кольору, з кисло-солодким смаком, з ароматом житнього хліба. Основні стадії виробництва квасу: при-

готування сусла, зброджування сусла, купажування та розливання квасу.

Приготування квасного сусла. В залежності від сировини, що використовується, застосовують різні способи приготування сусла. В хлібцях та хлібному квасі сухі речовини представлені в основному розчинними формами, що дозволяє готувати сусло способом настоювання. При використанні зернової сировини застосовують раціональний спосіб.

У випадку використання концентрату сусла його розводять водою. Витрати сировини для різних сортів квасу нормуються рецептурою. Сухий квас та зернову сировину попередньо подрібнюють на вальцових подрібнювачах.

За настійним способом сусло готують дво- або трикратним настоюванням подрібнених хлібців або сухого квасу в гарячій воді у спеціальному апараті.

Сусло, яке отримують після кожного настоювання, фільтрують через дрібне сито, охолоджують в теплообміннику до 25 °С та передають до ферментера (бродильного апарату). Концентрація сухих речовин в цьому суслі не повинна перевищувати 1,5—1,6 %.

Настійний спосіб супроводжується значними втратами екстракту разом з гущиною. Майже половина сухих речовин хлібців може залишитися в густому осаді (при екстрактивності хлібців 52 %). Осад використовують для годівлі худоби.

За раціональним способом затор готують із житнього солоду (54 %), житньої муки (34 %) та ячмінного солоду (12 %).

Подрібнений житній солод та житню муку змішують з водою (1:1) та витримують в запарнику протягом 2—2,5 години під

тиском 0,03 мПа. Під час запарювання відбувається розчинення крохмалю та інших складних органічних речовин та утворення меланоїдинів.

Упарену масу під тиском пари передають до заторного апарату, попередньо заповненого на 2/3 водою, в якому проводять його оцукрювання подрібненим ячмінним солодом при температурі 65—70 °С. Осад відокремлюють в фільтраційному або відстійному апаратах, або за допомогою сепаратора.

Сусло охолоджують в теплообміннику та направляють до ферментера (бродильного апарату). Втрати екстракту з осадом за раціональним способом становлять близько 15,5 %.

Приготування сусла із концентрату квасного сусла зводиться до розведення концентрату теплою (30—35 °С) водою до вмісту 1,4 г екстракту в 100 г сусла. При цьому в сусло вводять лише 70 % концентрату, передбаченого за рецептурою, решту 30 % вносять під час бродіння при купажуванні квасу.

#### Бродіння квасного сусла та купажування квасу

Під час бродіння квасного сусла, в суслі одночасно відбувається розвиток дріжджів та молочнокислих бактерій.

Процес бродіння переривають охолодженням, залишаючи в напої продукти бродіння.

Завдяки зброджуванню сусла асоціацією бактерій та дріжджів квас набуває характерного кислого смаку.

Вміст зброджуваних цукрів у квасному суслі (0,6—0,8 %) не забезпечує інтенсивного бродіння, тому в сусло додатково вводять 25 % цукру.

### 2.3.3. Характеристика продуцентів

Для зброджування сусла використовують спеціальні квасні дріжджі та молочнокислі бактерії.

Дріжджі, які використовуються в квасоварінні, повинні відповідати слідуючим вимогам: мати високу бродильну активність, швидко осідати при охолодженні квасу та мати високу стійкість до автолізу. Найбільшого поширення в квасоварінні набули дві раси квасних дріжджів: раса М та раса Штейнберг-6.

При зброджуванні сусла расами М та Штейнберг-6 отримують квас з м'яким та ніжним смаком, в ньому зберігається основний хлібний аромат. Оптимальна температура бродіння для квасних дріжджів 28—30 °С.

Для приготування квасу застосовують розведення молочнокислих бактерій. Для цього використовують чисті культури бета-бактерій № 11 та 13 (виділенні Л.І. Чекан із кращих зразків хлібного квасу). За формою клітин — це короткі палички, поодинокі, з'єднані попарно та в ланцюги. Вони мають температурний оптимум 33—35 °С.

Чисту культуру дріжджів підтримують на стерильному солодовому суслі, а при вирощуванні в ємностях на 4 та 10 дм<sup>3</sup> — на прокип'яченому квасному суслі, до якого додають цукровий сироп до густини 8 °Б (за цукроміром), та 5 % стерильної витяжки із солодових зародків. Накопичені в ємності місткістю 10 дм<sup>3</sup> дріжджі передають до дріжджевого чану, що містить 100—150 дм<sup>3</sup> такого ж самого сусла. В чані протягом доби при температурі 30 °С відбувається бродіння, після чого чан заповнюють хлібним сусллом до повного об'єму.

Через 24 години дріжджі направляють на виробництво. Використовують близько 50 % об'єму чану, а до залишку дріжджів доливають свіже сусло і залишають знову на 24 години. Отримана культура дріжджів вважається придатною для виробництва квасу, якщо вміст мертвих клітин не перевищує 5 % та відсутні дикі пливчаті дріжджі, оцтовокислі бактерії, термобактерії та педіококи.

На заводах великої потужності для вирощування чистих культур дріжджів використовують спеціальні установки, аналогічні до тих, що використовуються на дріжджевих заводах або на інших бродильних виробництвах.

Для вирощування чистої культури молочнокислих бактерій готують стерильне хлібне сусло з 5 % витяжки із солодових зародків та цукрового сиропу густиною 8 °Б. Молочнокислі бактерії вирощують постадійно: в пробірках, колбах ємністю 1 дм<sup>3</sup> та в бутилях — протягом двох діб при 30 °С до зростання кислотності до 7 см<sup>3</sup> 1N розчину лугу на 100 см<sup>3</sup> розчину (7°).

Готова культура надходить до чану ємністю 500 дм<sup>3</sup>, наповненого пастеризованим хлібним суслом та цукровим сиропом густиною 6—7 %, і в цьому чані розмножується протягом двох діб при температурі 30 °С. При зростанні кислотності до 7 см<sup>3</sup> 1N розчину лугу/100 см<sup>3</sup>, закваску використовують у виробництві.

На великих підприємствах молочнокислі бактерії вирощують, як і дріжджі, в інокуляторах (апаратах чистої культури). Перед введенням в квасне сусло молочнокислу закваску попередньо змішують з чистою культурою дріжджів у співвідношенні 1:1, протягом 6 годин вона доброджується. В сусло для зброджування вводять 4 % такої комбінованої закваски.



На сучасних заводах для зброджування квасного сусла та змішування готового квасу із цукровим сиропом (купажування) використовується бродильно-купажувальний апарат — стальна, герметично закрита ємність. Циліндрична частина апарату має подвійні стінки, в проміжок між якими подається розчин для охолодження квасу. До циліндра прикріплений резервуар у вигляді усіченого конуса, в якому знаходиться мішалка. До основи конуса приєднано дріжджевідокремлювач, який закривається задвижкою, за допомогою якої з апарату вилучаються дріжджі та густий осад.

Ферментери (бродильно-купажувальні) апарати виробляють з добовою продуктивністю 800 та 200 дал, яким відповідає потужність 3,5 та 2,4 кВт.

Квасне сусло із теплообмінника передають до ферментера (бродильно-купажувального апарату), в якому воно охолоджується розчином солі в рубашці апарату, що має температуру 25—27 °С. Потім із мірника в сусло вводять 25 % цукрового сиропу та закваску, концентрація сухих речовин в суслі при цьому зростає до 2,8—3,3 %.

Апарат герметично закривають і при періодичному перемішуванні зброджують сусло протягом 10 год. При зниженні концентрації сухих речовин в квасі на 1 % та зростанні титрованої кислотності до 2—2,5 °, зброджування зупиняють, охолоджуючи квас до 10—15 °С. При цьому осад, дріжджі та бактерії осаджуються у дріжджевідокремлювач. Його перекривають шибром та починають купажування, вводячи залишок цукрового сиропу (75 %), а в деяких випадках — настій м'яти та колер.

Масову частку сухих речовин в хлібному квасі доводять до 5,4 %. Купаж перемішують і охолоджують до 6—10 °С та під тиском направляють на фасування.

Осад із дріжджевідокремлювача повторно використовують (але не більше 3—4 разів) для наступного зброджування. Потім його реалізують разом із осадом на корм.

### Виробництво “Московського квасу”

Московський квас звичайно готують без зброджування.

Спочатку виробляють купажний сироп, для цього в купажувальний апарат подають розрахункову кількість води і при постійному перемішуванні вводять концентрат квасного сусла, цукровий сироп, колер та молочну кислоту в кількості, визначеній за рецептурою — не менше 7,3 г сухих речовин в 100 г напою.

Готовий купаж охолоджують до 6—8 °С та направляють до сироподозуючого апарату лінії розливу, за допомогою якого квас фасують у пляшки; потім пляшки доливають газованою водою.

“Московський квас”, приготований за цим способом, не має характерного аромату та смаку, тому на деяких заводах його готують зброджуванням сусла комбінованою закваскою в ферментері (бродильно-купажувальному апараті). Для кращого освітлення молодий квас охолоджують до 4—5 °С та відстоюють протягом 8—12 годин. Потім до нього додають цукровий сироп до стандартної концентрації, фільтрують та розливають квас у пляшки. У пляшках за температури зберігання 16—18 °С зброджування посилюється, в результаті чого за 34—40 годин напій насичується карбонатом та набуває смаку та аромату, характерного для хлібного квасу.

### Закритий спосіб бродіння

Цей спосіб розроблений на Київському заводі ще декілька десятиріч тому. Він здійснюється в ферментерах (бродильно-купажувальних апаратах) по безперервній замкнутій схемі. Весь процес відбувається в анаеробних умовах при безперервному надходженні квасного суслу на зброджування в батарею апаратів. В бродильно-купажувальних апаратах суміщені процеси бродіння, дріжджевідокремлення, охолодження, купажування та насичення квасу вуглекислотою. Закрите бродіння виключає доброджування квасу після фасування.

#### Пастеризація квасу

Хлібний квас має незначну стійкість під час зберігання тому що в ньому ще можуть відбуватися процеси молочнокислого та спиртового бродіння. Під час зберігання квас швидко втрачає свої смакові та поживні властивості, вказані в таблиці 6.

Таблиця 6. **Вміст поживних речовин в 100 г хлібного квасу** (в дужках — приблизна частка від добової потреби, %)

Продукт	Білки, г	Жири, г	Вуглеводи, г	Спирт, %, об.	Мінеральні речовини, мг				Вітаміни, мг		
					Со	Mg	P	Fe	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	PP
Хлібний квас	0,2	0	5,0(1)	0,8	—	—	—	—	0,04 (2)	0,05 (3)	0,7 (4)

Однак термін його зберігання може бути збільшений за рахунок пастеризації. Для цього використовують ступінчатий режим нагрівання, за яким температуру поступово підвищують до 68—70 °С; за цієї температури квас витримують близько 30 хвилин, а потім температуру поступово знижують до 8—10 °С.

Втрата поживних та смакових властивостей квасу може бути спричинена розвитком сторонньої мікрофлори в квасі. До найбільш виражених вад квасу слід віднести ослизнення та оцтовокисле скисання. Крім того, якість квасу нерідко погіршують термостійкі бактерії, ентеробактерії, дикі дріжджі та пліснява, які здатні розвиватися в квасному субстраті.

Ослизнення квасу відбувається в результаті розвитку слизоутворюючих бактерій роду *Leuconostoc* та *Bacillus mesentericus*. Вони потрапляють на виробництво із сировиною.

Оцтовокисле скисання викликається розвитком оцтовокислих бактерій. При цьому різко зростає кислотність, знижується густина при бродінні, зберіганні, інгібуються дріжджі та молочнокислі бактерії. При анаеробному зброджуванні оцтовокислі бактерії у квасі не розвиваються. В хлібний квас можуть також потрапити гнилісні термобактерії, які здатні накопичувати кислоти в процесі своєї життєдіяльності і, таким чином, викликати закамучування квасу. Для запобігання розвитку термобактерій на підприємствах намагаються використовувати штами активних дріжджів, здатних інгібувати розвиток цих контамінантів.

Кишкові палички здатні потрапляти до квасу з водою або заноситися персоналом. В квасі кишкова паличка добре розвивається, тому титр кишкової палички для квасу нижчий, ніж прийнято для води. Він дорівнює 100.

Із дріжджеподібних грибів найчастіше трапляються несахароміцети роду *Candida* (*C.crusei* та *C.guilliermondii*) — їх домішок у виробничих дріжджах не повинен перевищувати 0,5 %.

Плісняві гриби потрапляють до виробництва із зерном, солодом, квасними хлібцями, із стін, стелі, чанів, діжок, трубопро-

водів та іншого обладнання. Вони надають квасу неприємного запаху цвілі та своєрідного присмаку.

Середні розміри втрат квасу наступні: у бродильному відділенні — до 4 %, при купажуванні — 3—4 %, при фасуванні у пляшки — до 3 %, при розливанні у бочки та автоцистерни — до 2 %.

Витрати холоду, включаючи охолодження складу готової продукції, складають 3900 кДж, а витрата води — 8,9 дал на 1 дал квасу.

На рис. 10 представлена технологічна схема виробництва квасу, приготованого із концентрату квасного суслу (ККС) методом бродіння. За цією схемою концентрат квасного суслу, який постачається на завод в автоцистернах 1, перекачується насосом 2 через мірник 4 у збірник 3. При надходженні ККС в бочках 5 їх установлюють на піддон 6, ополіскують гарячою водою, і насосом 7 перекачують концентрат через мірник 4 у збірник 3 для зберігання.

Рідкий цукор, який доставляють в автоцистернах 11, насосом 2 через теплообмінник 12 і мірник 14 подають у збірник 13, оснащений бактерицидними лампами 15.

При надходженні на завод цукру-піску, затареного в мішки 16, їх знімають з автомашини на піддони 18 та автопогрузчиком 19 перевозять на склад. За необхідністю цукор зважують на вагах 19, завантажують норією 20 в бункер 21 та подають в сироповарочний апарат 22, в який попередньо налита вода. Готовий цукровий сироп насосом 24 перекачують через фільтр-ловушку 23 та теплообмінник 25 у збірник 17 для зберігання.

Для приготування квасного сусла насосом 2 ККС перекачують через мірник 4 у збірник 8, де його розводять гарячою водою до певної концентрації та насосом 9 через теплообмінник 10 направляють в ферментер (бродильно-купажувальний апарат) 27. Сюди ж із збірника 17 подають розраховану кількість цукрового сиропу, із збірника 52 — воду, а з апарату 43 — комбіновану дріжджеву та молочнокислу закваску.

Чисту культуру дріжджів готують в апаратах 41 і 40, а чисту культуру молочнокислих бактерій — в апаратах 46 та 45. Із цих апаратів чисті культури дріжджів і молочнокислих бактерій перекачують насосами 39 та 44 в апарат 43 і далі насосом 42 в ферментер (бродильно-купажувальний апарат) 27 на бродіння.

Зброджене квасне сусло охолоджують, виводять осаджені дріжджі у збірник 26, а в зброджувально-купажний апарат 27 вводять ще раз розрахункову кількість цукрового сиропу та колеру. Колер готують в апараті 38 і вивантажують у збірник 37, де змішують з розрахунковою кількістю води і насосом 36 подають в апарат 27.

Купаж квасу ретельно перемішують та направляють на розлив в попередньо вимиті на лінійній установці 29 автоцистерни 28 або в ізобарні фасувальні машини 31, на яких квас розливають у бочки. Порожні бочки постачають на підприємство автомобілями 35, знімають з них та укладають у штабелі, а потім направляють на огляд та мийку на машинах 33. Чисті бочки ополіскують (32) та подають на розлив.

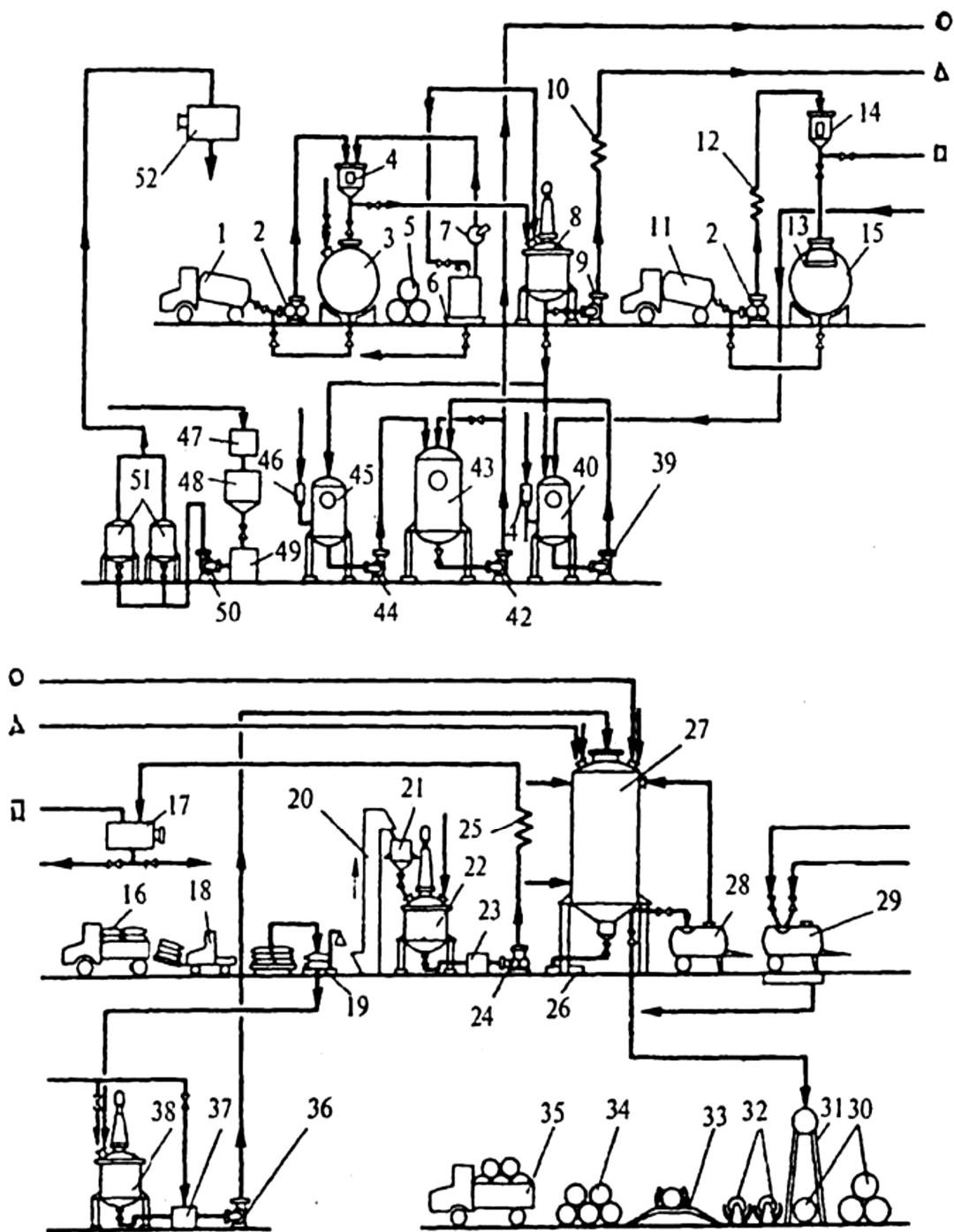


Рис. 10. Апаратурно-технологічна схема виробництва хлібного квасу

Воду, яка використовується для технологічних потреб, із проміжного збірника 47 направляють на піщаний фільтр 48, де вона освітлюється, і через збірник 49 насосом подається на кера-

мічні свічкові фільтри 51 для тонкого фільтрування. Відфільтрована вода потрапляє у збірник 52.

Дана схема призначена для приготування квасу із концентрату квасного сусла. При використанні квасних житних хлібців або сухого квасу в схему додатково включають настоювальний апарат з декантером для зняття квасного сусла з осаду квасної гущини та збірник квасної гущини. Квасна гущина потім реалізується на корм худобі.

## Контрольні запитання

1. Які мікроорганізми використовуються у виробництві квасу? Назвіть їх особливості.
2. За якими фізико-хімічними показниками визначають якість квасу?
3. Як здійснюється контроль виробництва квасу?
4. Які вимоги пред'являються до якості води, що застосовується для виробництва квасу?

## **Глава 3.           МІКРОБІОЛОГІЧНА ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА СПИРТУ**

### **3.1. Сучасний стан вітчизняної галузі виробництва спирту**



Спиртова галузь в Україні — одне із найстаріших біотехнологічних виробництв. Нині ця галузь перебуває у досить специфічному становищі. Так, за підрахунками Мінекономіки, внутрішнє споживання етилового спирту для потреб переробної, фармацевтичної та парфюмерно-косметичної галузей не перевищує 20 млн. дал. Згідно з існуючими даними, у країнах СНД за останні 5—6 років введено в дію та завершується будівництво спиртових заводів загальною потужністю 350—370 млн. дал за рік.

Загальна тенденція виробництва етилового спирту в Україні приведена в таблиці 7.

Ще зовсім недавно, до середини 90-х років, Україна була одним із найбільших виробників спиртової продукції в Європі (таблиця 8).

Потужність спиртзаводів України значно перевищує внутрішні потреби країни в етанолі, що становлять 25—30 мільонів декалітрів.

Співвідношення обсягів виробництва етанолу з цукро- й крохмалевмісної сировини становить 1:1.

На підприємствах, що виробляють буряковоцукрову мелясу, крім основної продукції — спирту, виробляють пресовані хлібопекарські дріжджі — до 45 тисяч тон на рік, сухі кормові — до 50, зріджену вуглекислоту — до 50 тисяч тон на рік, концентрат кормового вітаміну В<sub>12</sub> тощо. На спиртових заводах, що переробляють зерно, як відходи одержують барду для згодовування худобі і за кормовою цінністю еквівалентну 40 відсоткам використаного зерна на спирт.

**Таблиця 7. Рівень виробництва етилового спирту на Україні в 1990—2000 роках**

Роки	Виробництво етилового спирту, млн. дал.	
	по концерну “Укрспирт”	по Україні
1990	53,2	53,9
1991	47,9	48,8
1992	45,5	46,3
1993	46,6	47,7
1994	46,7	48,7
1995	61,5	62,2
1996	62,9	64,3
1997	24,2	24,6
1998	15,5 (в т.ч. 0,072 техн.)	15,8
1999	14,4 (1,2 техн.)	15,0
2000	19,2 (1,5 техн.)	20,2

Щороку підприємства галузі використовують до 1,5—2 мільонів тон сировини, понад 50 мільонів кубометрів води й відводять у брагонакопичувачі 10—11 мільонів кубометрів стоків, які необхідно піддавати очищенню й утилізації.

**Таблиця 8. Рівень виробництва спирту в деяких країнах світу**

Країна	Кількість спирту, млн. дал. за рік
Бразилія	615—790
США	220—245

Індія	54—60
ФРН	24—30
Франція	25—27
Великобританія	24—30
Японія	21—24
Україна	65—70
Росія	85—100
Білорусь	14—15
Італія	17—18
Іспанія	16
Нідерланди	3,5—14
Швеція	6
Бельгія	4,5—4,9
Фінляндія	4,25
Норвегія	2,5
Австрія	2,1
Данія	1,7
Швейцарія	1,2
Греція	0,26
Польща	25—32
Болгарія	4,2—4,4
Угорщина	4,4—4,8
Румунія	6,5—8,8
Чехія	11,3—13,3

Ще починаючи з середини 80-х років назріла потреба технічного переоснащення спиртзаводів з переорієнтацією на ресурсозберігаючі технології з утилізацією стоків виробництва.

За декілька останніх років відбулося значне скорочення виробництва етилового спирту в Україні. Це скорочення було спричинено, перш за все, політичними чинниками — внутрішніми

квотами ЄС, високими митними тарифами, заборонаю ввозу спирту до Росії та іншими причинами.

Тенденції до скорочення виробництва спирту спостерігаються і в Росії. Основні причини такої ситуації у виробництві спирту в Росії слідуючі:

- по-перше, збитковість спиртзаводів. Зараз в Росії практично кожен спиртовий завод (з державною часткою близько 51 %) заборгував державі в середньому близько 10—15 млрд. карбованців і являється, по суті, банкрутом;

- по-друге, спиртові гіганти на сьогодні створюють практично не розрешимі екологічні проблеми. Ця проблема, в першу чергу, викликана накопиченням великої кількості барди. Вартість обладнання для утилізації барди в сухий кормопродукт близько 4—6 млн дол. США, що непосильно для багатьох підприємств-банкрутів;

- по-третє, це націоналізація спиртзаводів — у всіх країнах спільного ринку вже давно намітилася тенденція до денаціоналізації спиртових та горілчаних виробництв;

- по-четверте, поганим технічним станом підприємств — ступінь зношеності технічного обладнання на багатьох підприємствах становить 90 % та вище.

Деякі із цих проблем стоять і перед спиртовиками України.

Виробництво спирту на Україні регулюється законом “Про державне регулювання виробництва і торгівлі спиртом етиловим, кон’ячним і плодовим, алкогольними напоями та тютюновими виробами”, до якого в 2002 році Президент України підписав ухваленій Верховною Радою Закон “Про внесення змін до деяких законів України щодо державного регулювання виробництва і

обігу спирту етилового, кон'ячного і плодового, алкогольних напоїв та тютюнових виробів”.

Ці Закони мають посилити боротьбу з незаконним виробництвом та обігом алкогольних напоїв, а також створити ефективну систему ліцензування і контролю.

За цими Законами у виробництві алкогольних напоїв використовують спирт етиловий ректифікований, кон'ячний і плодovий, етиловий ректифікований та плодovий. Інші види спирту для виробництва алкогольних напоїв і харчових виробів заборонені.

У парфюмерно-косметичній промисловості використовують спирт етиловий ректифікований денатурований. Неденатурований спирт для цієї продукції не застосовують.

Перспективним напрямком розвитку для спиртової галузі України є виробництво паливного етанолу, який додають до моторних палив та використовують як складову частину до технологічних рідин. Виробництво цього виду спирту дасть можливість зберегти існуючі потужності спиртових заводів та розширити сферу застосування етилового спирту в суспільстві.

Паливний етанол — одне з найперспективніших відновлюваних джерел сировини, виробництво якого забезпечує роботою сільськогосподарські виробництва і переробну промисловість держави, а також поліпшує екологічний стан, особливо у великих містах, завдяки зменшенню вмісту шкідливих речовин у відпрацьованих автомобільних газах.

### **3.2. Характеристика сировини**

В основі мікробіологічного способу отримання етилового спирту лежить зброджування цукру в спирт дріжджами.

Мікробіологічним шляхом спирт отримують із різноманітної рослинної сировини. Для харчових цілей спирт отримують із зерна злакових культур, картоплі, буряків, фруктових відходів та меляси. Із нехарчової сировини використовують гідролізати деревини, соломи, бавовняних лущинь та сульфідних щолоків.

Спирт із харчової сировини отримують періодично і безперервно.

Переробка картоплі та зерна в спирт здійснюється в декілька стадій: підготовка сировини до розварювання (приготування замісу), отримання оцукрюючих ферментів, розварювання крохмалевмісної сировини, культивування дріжджів, зброджування сусла, виділення спирту із бражки та його очищення. Виробництво спирту із меляси включає підготовку меляси до бродіння, культивування дріжджів, збродження м'ясяного сусла, виділення спирту із бражки та його очищення.

Основна відмінність в технологічному процесі отримання спирту із харчової сировини заключається в підготовці сировини та субстрату для зброджування дріжджами в спирт. В залежності від виду сировини спиртові заводи поділяють на 3 типи: ті, що переробляють зерно та картоплю, заводи по переробці меляси та змішаного типу.

### **3.3. Підготовка сировини у виробництві спирту**

#### **3.3.1. Підготовка зерна**

Краща сировина для спирту — зерно, яке росте у всіх кліматичних зонах, має невисоку вартість, тому що у виробництві спирту можна використовувати зерно, непридатне для приготування їжі та кормів, але з якого отримують спирт високої якості. Із зерна можна виробляти “Спирт етиловий-сирець” за ГОСТ 131-67 та “Спирт етиловий ректифікований” за ГОСТ 5962-67 різної якості: “Люкс”, “Екстра”, “Вищого очищення”, “1-гатунок”. В таблиці 9 приведені норми витрат сировини, ферментів, палива, енергії та ін. на виробництво етилового спирту із зерна.

Вибір марки спирту, що виробляється, та його споживання визначає ціну готового спирту, величину акцизних податків, майбутні капітальні та експлуатаційні витрати.

Вантажно-розвантажувальні та транспортно-складські роботи при переробці зерна легко механізуються. При переробці зерна на спирт немає необхідності в очисних спорудах високої вартості (для очищення стоків). Зернова барда — відхід виробництва із зерна — цінний кормовий продукт, її використовують для відгодівлі худоби, а також як теплоносій (використовують взимку для опалення відкормочних пунктів).

**Таблиця 9. Норми витрат зернової сировини, оцукрюючих та допоміжних матеріалів, води, палива, енергії, стисненого повітря на виготовлення 100 дал етилового спирту**

Показник	Укрупнена норма
Затрати зерна (пшениця, ячмінь, овес, кукурудза, жито)	29—31 т

Затрати ферментів (на 1 кг умовного крохмалю): - Амілосубтиліну - Глюкоаваморину	2 од. 6 од.
Затрати води: на заміс (7—70 °С) на охолодження: - замісу, який пройшов теплову обробку (t=10...12 °С); - сусла (t=10...12 °С); - інокуметорів (дріжджанок) (t=10...12 °С); - ферментерів (заброджувальних апаратів) (t=18...20 °С); - в теплообмінники брагоректифікаційного апарату (t=18...20 °С); - на мийку обладнання	110—120 м <sup>3</sup>  225 м <sup>3</sup> 150 м <sup>3</sup> 135—150 м <sup>3</sup> 700—750 м <sup>3</sup> 570—600 м <sup>3</sup> 12—15 м <sup>3</sup>
Допоміжні матеріали: - формалін технічний - кислота сірчана технічна (в моногідраті) - хлорне вапно - стиснене повітря Обслуговуючий персонал (при цілодобовій роботі) - витрати палива - витрати електроенергії	50 кг 21,8 кг 25 кг 7 м <sup>3</sup> /хв  30—40 чол. 65—70 Гкал 1700—1900 кВт/год.

Згідно з апаратурно-технологічною схемою приготування замісу (рис. 11) зерно після зважування на стрічкових вагах подається у витратний бункер, який вміщує кількість зерна, достатню для роботи протягом 2—3 діб, звідки стрічковим конвейером та норією перевантажується в сепаратор для відокремлення від сировини домішок.



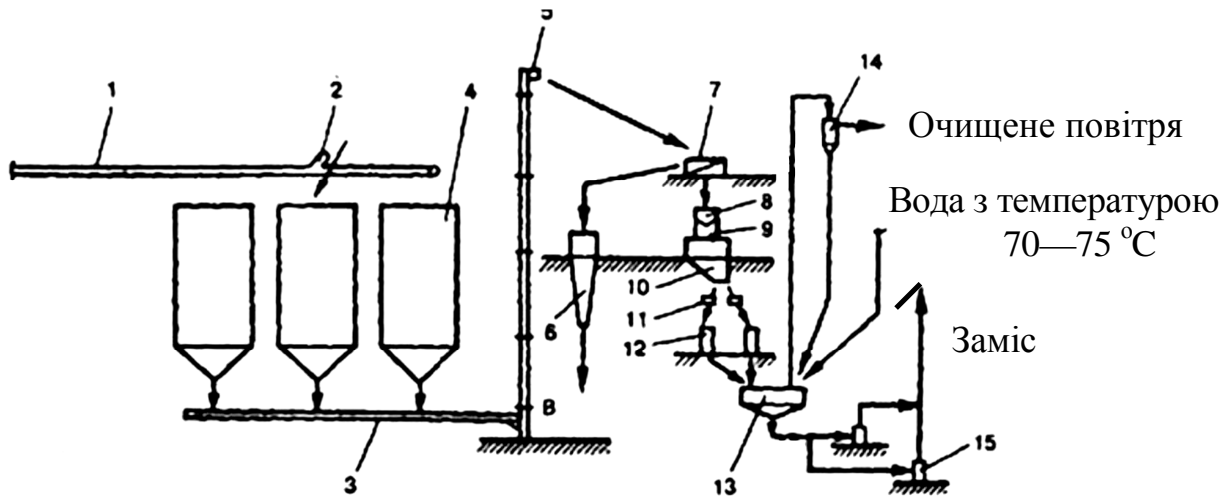


Рис. 11. Апаратурно-технологічна схема приготування замісу: 1 — верховий стрічковий конвеєр, 2 — розвантажувальний візок, 3 — низовий стрічковий конвеєр, 4 — витратний бункер, 5 — норія, 6 — бункер для відходів, 7 — зерновий сепаратор, 8 — надваговий бункер, 9 — ваги, 10 — підваговий бункер, 11 — магнітний сепаратор, 12 — молотковий подрібнювач, 13 — змішувач, 14 — пристрій аеродинамічного розвантажування молоткових подрібнювачів, 15 — центробіжний насос

Чисте зерно передається в надваговий бункер автоматичних вагів а потім на ваги, а домішки — самотечією в бункер для відходів. Зважене зерно надходить в підваговий бункер. Місткість надвагового та підвагового бункерів визначається маркою та продуктивністю вагів, але раціональніше, якщо місткість підвагового бункера дозволяє створювати запас сировини перед подрібненням на 1—2 години роботи. Сировина, що надходить в різний час, як правило, засмічена домішками різного розміру. Крупні домішки — це солома, підпалені та зліплені докупи зернини, сторонні предмети; дрібні домішки — зернова мучка та дрібне насіння сміттєвих рослин. Очищене від крупних домішок зерно транспортується конвейером та самотечією. При переробці зерна з ве-

ликою кількістю зернової мучки її повертають у виробництво, тому що мучка містить до 85 % зброджуваних речовин.

Після зважування зерна від нього магнітним сепаратором відокремлюють металодомішки, а потім зерно подрібнюють. Якість та рівномірність подрібнення зерна в подальшому впливають на його переробку.

Подрібнення зерна може бути одноступеневим — молотковим подрібнювачем, та двоступеневим — молотковим та вальцовим станком, але з додатковим проміжним розсіюванням, або молотковим подрібнювачем та дезінтегратором. Найбільш дешево подрібнення зерна здійснюється молотковим подрібнювачем.

В цьому випадку 60—70 % подрібненого зерна проходить через сито з діаметром отворів 1,0 мм та 100 % — через сито з діаметром отворів 2,0 мм.

При використанні сит з діаметром 2,6—2,8 мм в підситовому просторі створюється підвищений тиск повітря, який знижує продуктивність, погіршує якість подрібнювання тощо. Аеродинамічне розвантаження підситового простору молоткового подрібнювача забезпечує якісне розмелювання зерна та планову продуктивність.

Подрібнене зерно (мучка) самотечію поступає в змішувач, де змішується з водою у співвідношенні 1:(3,5—4,5). Температура замісу повинна становити 60—66 °С. Але так як температура мучки буває різною в залежності від сезону (влітку 40—45 °С, а взимку 15—18 °С), температура води, що подається в змішувач, також повинна бути різною. Для нагрівання води використовують водонагрівачі різного типу, в які подають водопровідну воду і во-

ду від теплообмінників брагоректифікаційного апарату. Замість для подальшої обробки перекачується центробіжним насосом.

Подача ферментних препаратів в змішувач недоцільна, тому що при цьому технологічний ефект не спостерігається, а собівартість спирту підвищується.

### **3.3.2. Підготовка картоплі**

Із картоплі виробляють якісний спирт, але вартість картоплі в 2—3 рази вища, ніж вартість зерна. Вантажно-розвантажувальні роботи з картоплею важко піддаються механізації, а миття картоплі потребує значних витрат води з її наступним очищенням, причому на очисних спорудах залишається до 30 кг ґрунту на 1 дал спирту, який необхідно обеззаражувати та вивозити з території підприємства. При продуктивності заводу 1 дал на добу та обсязі переробки картоплі протягом 100 діб на рік необхідно 9,5—10,5 тисяч тон сировини, що важко виростити та зберегти навіть великому підприємству.

Попереднє відокремлення від картоплі землі, соломи, бадилля та каміння відбувається при гідравлічному надходженні картоплі на виробництво. Остаточо ж картоплю звільнюють від домішок в мийному відділенні підприємства, де картопля проходить через комбіновану мийку. Тривалість знаходження картоплі на мийці 10—14 хвилин. В залежності від характеру забруднення картоплі на миття витрачається від 200 до 400 % води до її маси.

Далі картоплю подрібнюють на картопле-перетираючій машині; основним робочим органом якої являється сталений барабан, що обертається із частотою обертання 1200—2000 об/хв. В результаті процесу подрібнення отримують напівпродукт — кашку. З метою збільшення коефіцієнту вилучення крохмалю клітини руйнують послідовно в два етапи: спочатку на картопле-перетираючій машині подрібнюють бульби, а потім на терці додатково подрібнюють кашку.

Розмір часток подрібненої картоплі не повинен перевищувати 3 мм. Подрібнену картоплю направляють до змішувача, в якому до картопляної кашки додають воду у пропорції 0,2—0,5 дм<sup>3</sup> на 1 кг картоплі. Після перемішування та підігрівання картопляну кашку направляють в апарат для розварювання.

### 3.3.3. Підготовка меляси

Якість спирту із меляси нижча, ніж із зерна. Якість спирту, виробленого із меляси, повинна відповідати вимогам ДСТУ 3099-95 “Спирт етиловий ректифікований з меляси, високоякісний. Технічні умови”.

Для виробництва спирту використовується меляса, вироблена за ДСТУ 30561-98 “Меляса бурякова. Технічні умови”.

За фізико-хімічними показниками меляса, призначена для виробництва етилового спирту, повинна відповідати наступним вимогам:

*Таблиця 10. Фізико-хімічні показники бурякової меляси*

Назва показника	Норма
Масова частка сухих речовин, %, не менше	75,0
Масова частка цукрози, %, не менше	43,0
Масова частка зброджувальних цукрів, %, не менше	44,0
Величина рН	6,5—8,5

Дефектні меляси характеризуються зниженим вмістом сухих речовин, низьким вмістом загального азоту, зростанням кількості інвертного цукру, кислою реакцією, підвищеною колірністю та інфікованістю спороутворюючими та кислотоутворюючими мікроорганізмами. Ці мікроорганізми, особливо спороутворюючі форми, призводять до прямих втрат цукру в мелясі та до відновлення нітратів (солей азотної кислоти) в нітрити (солі азотистої кислоти). Нітрити являються дуже отруйними речовинами. В концентрації 0,005 % нітрити затримують нормальне брунькування дріжджевих клітин, при 0,004 % — розмноження дріжджів затримується на 40—50 %, а при 0,02 % — майже повністю інгібується ріст та розмноження клітин і відбувається їх часткове відмирання. Процес нітрітоутворення активізується в анаеробних умовах.

З метою пригноблення шкідливої мікрофлори та доведення рН середовища до оптимального значення мелясу подкислюють сірчаною або соляною кислотою з тим розрахунком, щоб отримати мелясне сусло з кислотністю  $0,5 \text{ см}^3 \text{ 1N NaOH}$ . На 1 т меляси витрачають 6—7 кг кислоти. Крім кислоти для антисептики використовують сульфенол із розрахунку 40—150 г або хлорне вапно в дозі 200—400 г активного хлору на 1 т сировини.

Мелясу переробляють на спирт за схемами одно- або двох- потокового виробництва. У першому випадку всю мелясу розводять водою для отримання мелясного сусла одної концентрації (21—22 % за масою): при двохпотоковому виробництві готують два сусла: для розмноження дріжджів концентрацією 12 % за масою, та основне сусло концентрацією 33 % за масою. Перша схема поширена на заводах, що виробляють спирт та дріжджі, інша — використовується при отриманні одного продукту — спирту.

Для забезпечення нормального виходу спирту та накопичення дріжджів (16—18 г/дм<sup>3</sup> бражки) в мелясу додатково вводять (із розрахунку на 1000 дал спирту): ортофосфорну кислоту (70 %) — 13, карбамід — 9 кг. Якщо окрім спирту отримують дріжджі, витрати цих речовин зростають в 1,5—2 рази.

Приготована суміш меляси з кислотою, антисептиком та поживними речовинами безперервно подається в резервуари, в яких витримується 6—8 год; після антисептування нерозведену мелясу перекачують насосом в напірний збірник, після цього — в поличний змішувач, в який безперервно надходить вода. Мелясне сусло, що містить 21—22 % (за масою) сухих речовин та має температуру 25 °С, далі самотечією направляється в апарати для розмноження дріжджів.

### **3.3.4. Підготовка оцукрюючих матеріалів**

Для оцукрювання сировини в спиртовому виробництві застосовують сирий (зелений) солод а також ферментні препарати.

Солод отримують на спиртових заводах замочуванням очищеного зерна, найчастіше ячменю та проса.

Для повного оцукрювання крохмалю використовують суміш солодів (в сирому вигляді).

Замочування очищеного зерна проводять водноповітряним або зрошувальним способом при температурі 18—20 °С протягом близько 20 годин (для вівса, ячменю та пшениці) та 24 годин — для проса. Замочене зерно направляють на пророщування в солодовню.

Ячмінний та вівсяний солод пророщують 10—12 діб, житній — 7—8 діб, а просяний — 5—6 діб.

Із солоду отримують солодове молоко, для чого подрібнений солод змішують з водою у співвідношенні 1:5. Отримане солодове молоко з концентрацією сухих речовин 5—6 % додатково дезінфікують 40 %-ним формаліном та направляють для оцукрювання охолодженої кашки.

Для інтенсифікації технологічних процесів у виробництві спирту велике значення має вибір амілолітичних ферментів та мікроорганізмів, за допомогою яких буде проводитися оцукрювання.

Останнім часом повсюди проводяться активні наукові роботи по створенню нових ферментних препаратів, в тому числі, і методами генної інженерії. При цьому особлива увага приділяється ферментам, що працюють при високих температурах, а також у вигляді мультиферментних комплексів.

Перспективними джерелами бактеріальної  $\alpha$ -амілази, яке сприяє гідролізу крохмалю до декстринів різної молекулярної маси, являються ферменти, що працюють при підвищеній температурі. Це, наприклад, Амілоліхтерм (вітчизняного виробництва),

Тармаміл СЦ (фірми “Ново Норгіск”), Зімаджунт (“Енде Індастріал Корпорейшнт”) та ін.

Ці ферменти містять термостабільну  $\alpha$ -амілазу, у зв’язку з чим оптимальний температурний інтервал їх дії 80...95 °С (у порівнянні з інтервалом 60...70 °С для ферментних препаратів, в основному імпортованих, що використовуються у вітчизняному виробництві спирту — Термаміл 120Л тип С).

Підвищення температури в процесі водно-спиртової обробки крохмалевмісної сировини сприяє швидкому зменшенню в’язкості крохмальної суспензії, різкому прискоренню процесу гідролізу та скороченню витратних норм ферментних препаратів. Так, витратна норма Термомілу на 1 г крохмалю (при розрахунку в одиницях амілолітичної активності) в 15 раз нижча за витратну норму Амілосубтиліну. Велику зацікавленість проявляють на спиртзаводах до розроблених в останні роки грибних протеаз, які діють на білки, що сприяють розщепленню крохмалю в зерновій сировині. Наприклад, ферменти російського виробництва — Амінопротоорізін та Протоорізін, які містять комплекс протеїназ та пептидаз, гідролізують білки до коротких пептидів та вільних амінокислот, що слугують джерелом азотного харчування для дріжджів в процесі бродіння. Крім того, ці ферменти дозволяють попередити колоїдно-білкові утворення, які з’являються в процесі водно-теплової обробки сировини, і таким чином підвищити технологічність сусла.

Помітно підвищити вихід спирту дозволяють ферменти целюлолітичної дії, які гідролізують некрохмалисті поліцукриди зернової сировини. Це, наприклад, Целловіридин (російського виробництва), Віскозим, Ультрафло (“Ново Норгіск”) та ін. Особ-



ливо ефективно використання целюлолітичних ферментів при зброджуванні жита та ячменю. Слід відзначити, що оптимальний температурний інтервал використання цих ферментів  $50^{\circ}\dots 60^{\circ}\text{C}$ , як правило, співпадає з оптимумом дії типових глюкоамілазних ферментів (Глюкавар, Сан супер, Сан ультра та ін.), які використовують для оцукрювання гідролізованого крохмалю. Це дозволяє сумісно використовувати глюкоамілазні та целюлолітичні ферменти.

Зручні для використання в компактних розварювачах-оцукрювачах типу ЕКО установок малої та середньої потужності концентровані ферментні препарати амілолітичної дії. Використання концентрованих ферментів дозволяє точно їх дозувати в залежності від виду зернової сировини.

### **3.3.5. Гідродинамічна та теплова обробка замісу**

Для звільнення зброджуваних речовин із рослинних клітин сировини та їх розчинення у воді зерновий заміс нагрівають.

Найкращим є спосіб розварювання, що забезпечує максимальне розчинення сухих речовин сировини у воді при мінімальних втратах зброджуваних речовин; він призводить до найбільшого виходу спирту з одиниці сировини.

Найбільшого поширення отримала технологія безперервного розварювання замісу при температурі  $135\text{—}150^{\circ}\text{C}$  в агрегаті безперервного розварювання.

Але більш перспективним являється спосіб низькотемпературної обробки сировини протягом  $15\text{—}20$  хвилин при темпера-

турі  $< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$  — саме цей спосіб, як свідчать дослідження, забезпечує економію сировини за рахунок зростання виходу спирту з 1 т умовного крохмалю.

Тривалість нагрівання замісу в контактній головці агрегату безперервної дії корелює з тривалістю гідродинамічної обробки замісу: при тривалості гідродинамічної обробки замісу протягом 4—5, 5—8, 8—24 годин, температура теплової обробки замісу відповідно дорівнює 110—115, 95—98, 75—85  $^{\circ}\text{C}$ .

Безперервне розварювання характеризується стабільністю, процес піддається оптимізації та автоматизації, відрізняється високою питомою продуктивністю обладнання. Перші безперервнодіючі варочні апарати були створені ще в 1932—1936 роках.

З того часу схеми розварювання дещо змінилися — замість схем Мічурінського та Мироцького спиртових заводів, що довгий час переважали в спиртовій галузі, використовуються інші, наприклад апаратурно-технологічна схема гідродинамічної і теплової обробки замісу, про яку вже згадувалося вище (рис. 12).

За цією схемою після гідродинамічної та теплової обробки заміс відстоюється протягом 15—20 хвилин у витримувачі при температурі  $< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а потім самотечією надходить до оцукрювача-охолоджувача. Пар, що утворюється під час цього процесу, накопичується в конденсаторі, звідки зливається у змішувач або в каналізацію. Встановлення двох апаратів гідродинамічної обробки забезпечує безперервну експлуатацію брагоректифікаційного апарату. При мийці та стерилізації одного апарату заповнюється інший, що забезпечує безперервне надходження суслу в бродильне відділення, а бражки — в брагоректифікаційний апарат.

Заміс від змішувача

пара

вода

Конденсат у

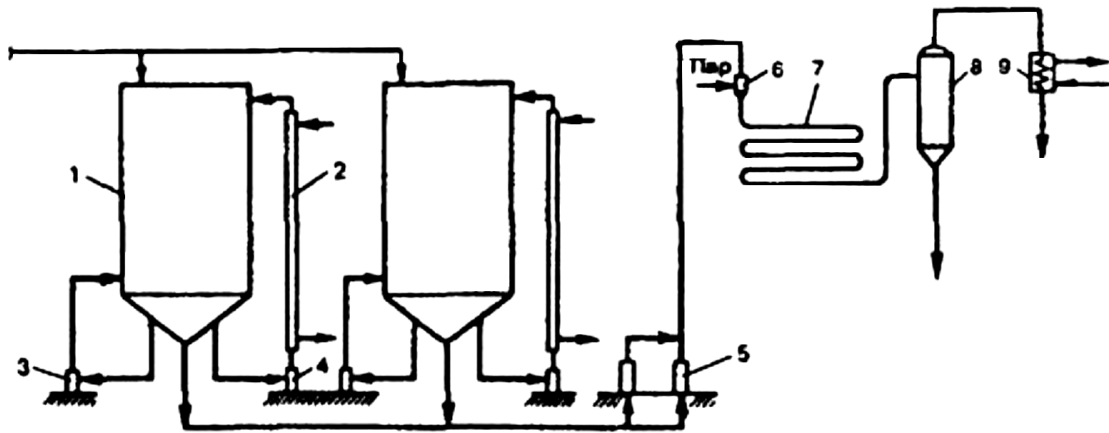


Рис. 12. Апаратурно-технологічна схема гідродинамічної та теплової обробки замісу: 1 — апарат гідродинамічної обробки замісу; 2 — теплообмінник; 3,4 — центробіжний насос, 5 — плунжерний насос; 6 — контактна голівка; 7 — трубчатка; 8 — витримувач; 9 — конденсатор

Таким чином, за цією схемою введена додаткова гідродинамічна обробка замісу, під час якої розчиняються сухі речовини зерна, що покращує технологічні показники виробництва спирту.

Динаміка розчинення сухих речовин при гідродинамічній обробці виражається рівнянням:

$$C = a\tau^b,$$

де:  $C$  — концентрація сухих речовин у замісі, %;  $\tau$  — тривалість гідродинамічної обробки, годин;  $a$  та  $b$  — емпіричні коефіцієнти, що залежать від виду сировини.

Для жита, пшениці та вівса  $a = 36,0$  % /год;  $b = 0,2$ .

Для кукурудзи  $a = 15,24$  % /год;  $b = 0,165$ .

При обробці зернового замісу жита, пшениці, вівса, ячменю протягом 24 годин в розчин переходить до 62 % сухих речо-

вин сировини. При обробці зернового замісу кукурудзи в розчин переходить до 62 % сухих речовин сировини.

### **3.4. Особливості технологічного процесу**

#### **3.4.1. Оцукрювання крохмалевмісної сировини**

Крохмаль розвареної сировини оцукрюється солодовим молоком або ферментами пліснявих грибів.

Одночасно при участі протеолітичних ферментів відбувається гідроліз білків та легко засвоюваних дріжджами амінокислот та пептидів. В розвареній масі крохмаль знаходиться в розчиненому стані та у вигляді крохмального клейстеру. Значення рН розвареної суміші після гідродинамічної обробки становить 4,4—4,5 не залежно від виду сировини; кількість глюкози збільшується, у порівнянні з початковою концентрацією, в 1,5—2 рази; титрована кислотність замісу 0,5—0,7 °К.

Оцукрювання розвареної маси здійснюється, як правило, безперервним способом за певних умов: температури (55 °С), рН середовища, концентрації субстрату та ферментного препарату.

Оцукрену масу називають сушлом. Процес оцукрювання включає охолодження розвареної маси, змішування маси з ферментами або солодовим молоком, оцукрювання та охолодження сушла.

Оцукрювання проводять за одноступеневою схемою або суміщуючи оцукрювання та зброджування оцукреної маси.

При оцукрюванні за одноступеневою схемою розварена маса безперервно надходить в оцукрювач — циліндричний ста-

льний апарат ємністю 3—5 м<sup>3</sup>, обладнаний мішалкою та змієвиком для подачі води. В оцукрювачі маса охолоджується до 57—58 °С. Одночасно з охолодженням в апарат вводять 16—18 % солодового молока від об'єму розвареної маси або фермент. Тривалість знаходження маси в оцукрювачі не менше 10 хв.

Оцукрена маса безперервно відводиться з оцукрювача через теплообмінник, в якому охолоджується до 20—24 °С, в бродильне відділення.

При суміщенні, за традиційними технологіями, процедури оцукрювання гідролізованого крохмалю та зброджування, проводиться дробне завантажування сусла. Повільне протікання процесу оцукрювання пов'язане, крім всього іншого, з неоптимальним інтервалом рН сусла (5,5—6,5) для дії амілолітичних ферментів. Це істотно відтворюється на процесі дріжджегенерації, де особливо важливим являється ступінь гідролізу крохмалю до вуглеводів, здатних легко засвоюватися дріжджами.

Готове сусло містить 16—18 % (за масою) сухих речовин; його кислотність становить 0,25—0,30, а рН 5—5,3.

### **3.4.2. Характеристика продуцентів**

Дріжджі, які використовуються у вітчизняній технології виробництва спирту (*Saccharomyces cerevisiae* рХІІ), були виділені ще 100 років тому (в 1902 р.). Культура дріжджів має відповідати наступним вимогам: швидко й повністю зброджувати цукор, бути стійкою до продуктів метаболізму, а також до зміни складу середовища культивування.

Дріжджі раси XII, яку широко використовують у промисловості, ефективно зброджують крохмалевмісні середовища при оптимальній для цієї раси температурі 30—33 °С.

Мелясові (патокові) затори зброджують расами Я та В. Раса Я виведена в 1916 році із дріжджів патоки К.Ю. Якубовським. Дріжджі цієї раси викликають верхове бродіння; вони добре зброджують глюкозу, фруктозу, цукрозу, галактозу, мальтозу та рафінозу. Раса Я забезпечує високий вихід спирту та низький відбід. Раса В (венгерська) подібно до раси Я пристосована до мелясового середовища. Дріжджі цієї раси поряд з високими зброджувальними властивостями мають добрі хлібопекарські якості, що дозволяє на спиртових заводах відокремлювати їх із бражки та випускати у вигляді пресованих дріжджів для хлібопекарської промисловості.

Раса М (запропонована в 1905 році Геннебергом) складається із суміші п'яти сильних рас дріжджів верхового бродіння. Вона використовується для зброджування заторів, що містять різні цукри, які неоднаково зброджуються різними дріжджами. Раса М проявляє стійкість до різних змін технологічного режиму.

Раса XV за технологічними ознаками подібна до раси XII. Її використовують поряд з расою XII для зброджування змішаного зерно-мелясового субстрату.

Крім дріжджів рас XII та XV, Я, в спиртовому виробництві використовують гібриди дріжджів. Вони були отримані в 1960 році в лабораторії Інституту генетики АН СРСР (Н.В. Носіков, О.Г. Раєвська). Серед гібридів найбільший інтерес викликають Г-69, Г-67, Г-13, Г-70.

Гібриди Г-69, Г-13 та Г-70 призначені для зброджування крохмалистих, а Г-67 — для мелясових субстратів.

Гібриди, що зброджують крохмалисті середовища, в порівнянні з расами XII та XV за технологічними показниками не кращі, однак вони мають властивість інтенсивно розмножуватися в зернових заторах. В останні роки і в цю консервативну стадію спиртового виробництва намагаються внести певні зміни.

Перш за все, значну увагу приділяють культивуванню нових високопродуктивних рас дріжджів з термотолерантними та осмофільними властивостями.

Так, в Росії використовують дріжджі штамів Y717, Y1986, 985T, 9870. Расам дріжджів Y717, Y1986 властива термотолерантність, але ця властивість швидко втрачається при культивуванні дріжджів у виробничих умовах.

Штами 985T та 9870 виявляють найбільшу стійкість до субоптимальної температури (до 37 °C) та до осмосу, що дозволяє цим дріжджам зброджувати зернове сусло та отримувати об'ємну частину спирту в бражці 14—15 %.

Відомо, що підвищення температури зброджування при використанні XII раси дріжджів призводить до різкого збільшення побічних продуктів (ацетальдегіду, метилацетату, етилацетату, пропанолу), що погіршує якість спирту.

Для раси 985T рівень побічних продуктів метаболізму дріжджів при підвищенні температури в 1,5—2 рази нижчий, ніж для раси XII.

На Україні селекціоновано штам XIII. Він зброджує глюкозу, фруктозу, галактозу, цукрозу, мальтозу, на 1/3 рафінозу, накопичує в середовищі до 13 об'ємних часток спирту (в %).

Штам ХІІТ термотолерантний — він ефективно зброджує середовище при температурі 37—38 °С.

Великий інтерес викликають дріжджі роду *Candida*, які продукують етанол із пентози та Д-ксилози (наприклад *Candida fennica* та *Candida tropicalis*). Перспективні “Амілолітичні дріжджі”, (наприклад *Schwanniomyces castellii*), які дозволяють зброджувати сировину без попереднього оцукрювання (з виходом спирту 72 % від теоретичного). Ці дріжджі поки що не знайшли практичного застосування, однак робота над їх удосконаленням триває, оскільки результатом дослідження може статити значне спрощення технологічного процесу та енергозбереження.

В останні роки з’являється все більше робіт, присвячених дослідженню бактерій, здатних синтезувати спирт. Процес перетворення моноцукридів в спирт у бактерій відбувається інакше, ніж у дріжджів. Найбільшого застосування знаходять мезофільні бактерії, в яких процес бродіння проходить при температурі 28...35 °С, і при цьому з одного молю глюкози утворюється 3 молі етилового спирту.

Знаходять промислове застосування бактерії *Zimomonas mobilis*, деякі штами яких були виділені із пальмового вина та спонтанно збродженого цукру. Штами цих бактерій відрізняються високою толерантністю до етанолу і за допомогою їх вдається отримати спирту вдвічі-втрічі більше, ніж за допомогою дріжджів. Бактерії *Zimomonas mobilis* зброджують концентровані розчини вуглеводів (сусла), що містять до 200 г/дм<sup>3</sup> цукрози, причому при зброджуванні утворюється значно менше побічних продуктів, ніж при використанні дріжджів.



Це, наприклад, *Thermoanaerobacter ethnolicus*, *Clostridium thermocellum* та інші. Відрізняються ці бактерії високою швидкістю росту та здатністю зброджувати не лише крохмаль, але і целюлозу.

Можна прогнозувати в найблизший час все більш широке використання бактеріальних культур у виробництві спирту, яке, однак, потребує модернізації бродильного та ферментаційного обладнання та, можливо, також і ректифікаційного.

Один із найбільш перспективних шляхів інтенсифікації стадії зброджування у виробництві спирту — це використання іммобілізованих культур. Ці культури розміщують на яких-небудь носіях, наприклад на смолі ENT-0,5, на сополімерах поліетиленгліколю та поліпропіленгліколю. На початкових стадіях зброджування концентрація клітин у смолі звичайно складає 108 на 1 г; через 50—100 годин бродіння вона зростає на три порядки.

Із смоли, що містить іммобілізовані дріжджі, можна сформувати пластини, розташовані паралельно одна до одної. Сусло направляють між пластинами паралельними течіями, що забезпечує відокремлене утворення під час зброджування газу. В реакторі колонного типу при використанні згаданої смоли концентрація дріжджевих клітин в ферментаторі може складати 100—130 г/дм<sup>3</sup>.

Цікавим напрямком являється іммобілізація дріжджевих клітин в кріогелі. Такий гель утворюється в результаті замерзання концентрованих розчинів, витримування їх протягом деякого часу в замороженому стані та наступного розморожування. На основі кріогелю можна виготовити гранули, зручні для промислового використання. Японська фірма “Клюва Хакко” реалізувала промис-

ловий процес отримання спирту з імобілізованими клітинами дріжджів на Са–альгінатному гелі в реакторі колонного типу.

При використанні субстрату, що містить 20 %-ний розчин глюкози, отримують бражку, яка містить близько 10 об'ємних часток (%) етилового спирту за 2,5 год.

Сумісна імобілізація дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та продуцентів амілолітичних ферментів дозволяє переробляти крохмалевмісну сировину з виходом спирту, близьким до теоретичного.

### 3.4.3. Збродження оцукреної маси

Зброджування здійснюється періодичним або безперервним способом. На багатьох спиртзаводах процес відбувається в бродильних апаратах (ферментерах) ємністю 50—100 м<sup>3</sup>, обладнаних змієвиками та патрубками для підведення сусли, дріжджів, води, пари та відведення зброженої маси. Періодичний процес бродіння характеризується низькою продуктивністю апаратури, великою кількістю непродуктивних операцій та іншими вадами.

Широке розповсюдження отримав безперервнопотічний спосіб бродіння, розроблений В.Л. Яровенко. Процес здійснюється у двох дріжджанках, зброджувачі та в батареї бродильних апаратів (ферментів), з'єднаних між собою перетічними трубами. Перші за схемою ферменти вважаються головними, вони також, як і посівні апарати (дріжджанки та зброджувачі), обладнані змієвиками. В головних апаратах відбувається головне зброджування та виділяється велика кількість тепла. Готові дріжджі із посівних апаратів (дріжджанок) направляються у ферментер (зброджувач),

куди одночасно із дріжджами надходить підкислене до 0,5 охоложене сусло концентрацією 16—18 % (за мелясою). Після заповнення ферментера, який слугує для накопичення великої кількості засівних дріжджів, дріжджі залишають для розмноження. При концентрації 5—6 % зрілі дріжджі самотечією направляють до головного ферментера.

В перший головний апарат одночасно із зрілими дріжджами надходить сусло із теплообмінника, охоложене до температури складки дріжджів.

Коли головний апарат заповниться суслom, починається відтік забродженого середовища в апарати бродильної батареї, яка складається із 10 апаратів, з'єднаних між собою перетічними трубами.

В кожному апараті в нижній частині встановлена пропелерна мішалка для кращого перемішування середовища. Піна, яка накопичується в головних бродильних апаратах, руйнується в перетічних трубах, розташованих у верхній частині апаратів над рівнем рідини. Гасіння піни в цьому випадку відбувається механічним шляхом. В бродильній батареї маса знаходиться 17—20 годин при температурі 30 °С.

Тривалість бродіння при температурі зброженої маси 26—30 °С — близько 60 год. Зрілу бражку із останнього ферментера направляють для виділення дріжджів в сепараторне відділення та для виділення спирту — в ректифікаційне відділення. Зріла бражка містить об'ємну частку спирту 8—10 % спирту, 0,25—0,4 г/100 см<sup>3</sup> нерозчиненого крохмалю, кислотність зрілої бражки 0,5—0,7°, дріжджів 16—30 г/дм<sup>3</sup>.

Із 1 тони меляси (у перерахунку на умовний крохмаль) отримують при безперервному процесі 66,5 дал. спирту; із 1 т картопляного крохмалю — 65,7 дал; із 1 т житнього крохмалю — 63,9 дал.

При використанні технологій іммобілізованих клітин використовують реактори колонного типу, які працюють безперервно протягом 6—12 місяців, утворюючи на виході бражку із об'ємним вмістом етанолу 10,6 % та з виходом 95 % від теоретичного.

У виробництві спирту з традиційним апаратурно-технологічним оформленням процесу зброджування питома продуктивність ферментерів (бродильних чанів) за етанолом складає 10 кг/м<sup>3</sup> за годину, при використанні іммобілізованих бактерій — до 100 кг/м<sup>3</sup> за годину. При цьому початкова концентрація цукрів в суслі може бути збільшена вдвічі.

Можлива іммобілізація дріжджевих клітин на поверхні розділення фаз — газ-рідина.

В цьому випадку використовують ферментер, здатний працювати в газоемульсійному режимі з газовмістом 60—65 % за всією висотою апарату, та обладнаний трьохярусною турбінною мішалкою. В нижній частині апарату відбувається розшарування газорідинної емульсії на піну та рідину, а дріжджі, закріплені на поверхні бульбашок, спливають в активну зону ферментера; культуральна рідина виводиться через несправжнє дно.

При зброджуванні меляси в такому реакторі вдається створити концентрацію дріжджів 120—160 кг/м<sup>3</sup> та підвищити інтенсивність процесу в 10 разів, у порівнянні з традиційним ферментером.

#### **3.4.4. Виділення спирту із бражки та його очищення**

Зріла бражка — напівпродукт спиртового виробництва. Для отримання 1 м<sup>3</sup> спирту витрачається близько 12 м<sup>3</sup> бражки.

Бражка містить дріжджі, солі, незброджувані вуглеводи, барвні речовини, гліцерин, воду, етиловий спирт та його домішки: кислоти, ефіри, альдегіди та вищі спирти — всього близько 50 різних летких речовин, але лише спирт та вода знаходяться в значній кількості, тому бражку можна розглядати як бінарну систему.

Виділення спирту із бражки та його очищення здійснюється ректифікацією. Процес ректифікації відбувається в протivotочних апаратах — колонах, в яких суміш рухається знизу вгору, а назустріч їй стікає рідина (флегма). Колони обладнані контактними устроями або тарілками, які слугують для більш тісного контакту між рідиною та газовою фазами.

За технічним призначенням ректифікаційні установки спиртового виробництва діляться на сирцеві, ректифікаційні та брагоректифікаційні. Перші призначаються для отримання бражки із спирту-сирцю, що окрім етанолу містить ряд домішок. На ректифікаційних установках очищують спирт-сирець та отримують ректифікований спирт. Брагоректифікаційні установки дозволяють отримувати ректифікаційний спирт безпосередньо із бражки, оскільки в цих установках суміщені технологічні операції сирцевих та ректифікаційних апаратів.

### 3.4.5. Утилізація відходів спиртових заводів

Після уварювання мелясної післяспиртової барди до 65—70 %, а післядріжджевої — до 45 % сухих речовин одержують продукти, які використовують у народному господарстві.

Післяспиртову барду використовують у нативному вигляді.

При зброджуванні на спирт однієї тони меляси в післяспиртову барду переходить 350—400 кг органічних і мінеральних речовин, у тому числі азотистих сполук, залишків незброджених цукрів, органічних кислот, жирів, гліцерину, вітамінів, солей калію, натрію, кальцію, мікроелементів тощо.

На Лохвицькому та Будильському спиртзаводах післяспиртову барду упарюють. Якість такої барди визначають за ТУ 18 Україна 45-92.

Порівняльну характеристику упареної післяспиртової барди наведено в таблиці 11.

*Таблиця 11. Порівняльна характеристика показників упареної післяспиртової барди вітчизняного й зарубіжного виробництв*

Показник	Україна	Угорщина	Польща
Концентрація, % СР	65—73	68—70	63—64
Густина, г/см <sup>3</sup>	1,32—1,37	1,37	1,28
РН	4,8—7,0	6,1—6,3	—
У сухих речовинах, % :			
органічних речовин, не менше	77,0	73,0	76,0
азоту	3,8—4,5	4,6—4,8	3,7
сирого протеїну	24,0—28,0	29,0—30,0	23,1
золи натуральної, не більше	23,0	25,0—27,0	24,0

У вітчизняній і зарубіжній практиці післяспиртову м'ясну барду використовують для виробництва кормових дріжджів, деяких медичних препаратів (ацидину, глютамінової кислоти тощо), виготовлення бардяного жому. Однак найбільше її використовують як кормову добавку і добриво.

Цінність барди як корму обумовлена передусім наявністю азотистих сполук, холіну, бетаїну, рибофлавіну, тіаміну, нікотинової та пантотенової кислот, біотину й мікроелементів.

У деяких країнах, наприклад у США, упарену барду впродовж десятиліть успішно використовують як корм для молочної худоби й для виготовлення комбікормів.

Практично всі країни Західної Європи, які виробляють спирт із м'яси, використовують барду як корм та добриво.

У Франції та Бельгії для згодовування тваринам використовують знесолену барду з вмістом калію, що не перевищує чотирьох відсотків до маси сухих речовин. Завдяки цьому доза упареної барди в кормових раціонах зростає майже вдвічі.

На Будильському спиртзаводі (Сумська область) у 1994 році введено в дію дослідно-промислову установку знесолення барди до чотирьох відсотків вмісту калію.

Спеціалістами УкрНДІспиртбіопрому розроблено технологію нейтралізації знесоленої барди вуглекислим амонієм та технологію приготування сухих кормових сумішей із знесоленої упареної барди.

Інший перспективний напрямок використання упареної м'ясної барди — виробництво добрив. У розвинених країнах світу на добриво використовують до 50 відсотків барди.

Норма внесення її під різні культури коливається у межах 3—5 тон на гектар.

Післядріжджова мелясна барда — це відходи виробництва кормових дріжджів на післяспиртовій барді. Продукт цей нестійкий і для тривалого зберігання потребує упарювання до 40—45 % СР. Якість упареної післядріжджової барди (УПБ) визначають за ТУ 10-0334797-13-91, згідно з якими УПБ повинна містити 45 % сухих речовин, 40—50 % — золи натуральної, не менше 3,5 % азоту, мати густину 1,205 г/см<sup>3</sup>, рН — не нижче 4,5.

Найбільш широко УПБ використовується в будівельній промисловості: як в'язуча речовина у виробництві цементу й бетону, як добавка — в цементно-бетонному покритті доріг, при виробництві азбестоцементних виробів тощо.

Зернова післяспиртова барда містить всі поживні речовини вихідної сировини, з якої виготовляють спирт, за винятком комплексу вуглеводів (крохмаль і цукор). При виробництві 1000 дал спирту утворюється близько 130—140 м<sup>3</sup> барди.

Проте використовується зернова барда у нашій країні дуже неефективно — в основному її згодовують великій рогатій худобі. Ця барда має низький вміст сухих речовин та швидко псується, тому транспортування її на великі відстані економічно не виправдане. Перспективним являється згущення зернової барди та перетворення у сухий гранульований продукт, придатний як для виробництва кормів, так і для безпосереднього згодовування.

Окрім барди, відходами спиртового виробництва являються сивушний спирт, лютерна вода, ефірно-альдегідна фракція, вуглекислий газ, гаряча та мийна вода, зернові відходи (для спиртового виробництва на зерновій сировині).



В таблиці 12 приведений кількісний склад відходів спиртового виробництва на 1000 дал спирту.

**Таблиця 12. Кількісний склад відходів спиртового виробництва на 1000 дал спирту**

Показники	Укрупнена кількість відходів
Зернові відходи	0,6 — 1,2 т
Барда	130 — 140 м <sup>3</sup>
Лютерна вода	39 м <sup>3</sup>
Ефіро-альдегідна фракція	12 — 35 дал
Сивушний спирт	2,4 — 4,5 дал
Вуглекислий газ	7,53 т
Вода температурою 30...75 °С	1875 м <sup>3</sup>
Вода для мийки	12 м <sup>3</sup>

Із ефірно-альдегідної фракції на спеціальному ректифікаційному обладнанні виділяють етиловий спирт. На деяких заводах існують централізовані устрої з переробки фракцій.

Сивушний спирт доцільно відправляти на централізоване перероблення для отримання чистих вищих спиртів (амілового, бутилового, пропілового), які використовуються у виробництві медичних препаратів, ароматичних речовин, розчинів для лакофарбової промисловості.

Вуглекислоту використовують на підприємствах харчової промисловості при виробництві вин та безалкогольних напоїв, як сухий лід у торгівлі. Існує потреба у використанні діоксиду вуглецю на машинобудівних заводах у зварочному та ливарному виробництвах, при обробці металів різанням тощо.

Для зменшення стоків спиртового виробництва воду температурою 30—75 °С краще всього використовувати в обороті (в зимовий час — градирня, а в літній — компресорні установки). Лютерну та мийну воду доцільно очищати на установках біологічного очищення і повертати у виробництво.

Відділом екології УкрНДІспиртбіопроду розроблено технологію очищення стічних вод спиртзаводу, в т.ч. і фільтрату зернової післяспиртової барди з отриманням біогазу.

Натуральну зернову барду розділяють на центрифугі або на вакуумному барабанному фільтрі на дві фракції — фільтрат і дробину. Тверда фракція (дробина), маса якої складає приблизно 25 % від маси барди, сушиться на барабанній або паровій дискової сушарці з отриманням сухого білкового корму.

Вихід барди — 7 тон/1000 дал спирту.

Рідка фракція, маса якої 90—100 т на 1000 дал спирту, охолоджується до 35—45 °С і піддається двохстадійному біологічному очищенню.

Вона є сировиною для отримання біогазу.

### **Контрольні запитання**

1. Які вимоги пред'являють до якості спирту харчового призначення?
2. Які гатунки харчового спирту ви знаєте?
3. В чому переваги та недоліки зернової сировини для виробництва спирту?

4. Охарактеризуйте сучасний стан та перспективи спиртової галузі в Україні.

5. Чому термотолерантні дріжджі вважаються більш ефективними в порівнянні з дріжджами інших рас (раси XII, голандськими дріжджами тощо) для виробництва спирту?

6. Дайте порівняльну оцінку різних штамів дріжджів при зброджуванні сусла з крохмалевмісної сировини.

7. Які раси дріжджів використовуються в спиртовому виробництві? В чому їх особливість?

8. Які фактори впливають на активність дріжджів?

9. Як здійснюється контроль виробничих дріжджів на спиртзаводах?

10. Яку мікрофлору та хімічні показники має бурякова меляса?

11. Як здійснюється підготовка бурякової меляси для спиртзаводів?

12. Які ферментні препарати використовуються для гідролізу крохмалю у спиртовиробництві?

13. Як утилізується спиртова барда в тваринництві?

14. В чому переваги роботи спиртзаводів з безвихідним циклом виробництва?

15. Охарактеризуйте перспективи інтенсифікації стадії зброджування культурами дріжджів, іммобілізованими на різних носіях.

16. Які особливості технології виробництва спирту на зерні та на мелясі?

17. Охарактеризуйте стадію підготовки оцукрюючих матеріалів на зеленому (сирому) солоді.

18. Як здійснюється оцукрювання крохмалю розвареної сировини?

19. В чому переваги та недоліки безперервного та періодичного способу збродження оцукреної маси?

20. Охарактеризуйте принцип роботи дріжджанок та головних апаратів.

21. Для чого застосовуються сепаратори у спиртовиробництві?

22. Особливості очищення стічних вод спирт заводів.

## **Частина 2. АГРОБІОТЕХНОЛОГІЯ**

### **Глава 1. ВИРОБНИЦТВО КОРМОВИХ ДРІЖДЖІВ**

#### **1.1. Історія виробництва**

Перші відомості про можливості використання дріжджів та дріжджеподібних грибів для людей та в якості кормів з'явилися в кінці XIX сторіччя. Стимулом для вивчення та розвитку виробництва дріжджів був дефіцит білкових продуктів в Германії під час двох світових війн.

В СРСР перше промислове виробництво кормових дріжджів з'явилося в 1943—1944 рр. на гідролізних та сульфітно-спиртових заводах з використанням в якості сировини барди та сульфітного щолоку.

Значного масштабу набуло виробництво кормових дріжджів в повоєнні роки з початком будівництва гідролізно-спиртових заводів з річною потужністю 10, 14 та 28 тис. т. За період з 1945 до 1970 рр. виникла нова галузь біотехнології, яка виробляла щорічно понад 200 тис. тон кормових дріжджів.

Ресурсами для виробництва кормових дріжджів являється барда спиртового виробництва, відходи від виробництва крохмалю та крохмальної патоки, меляса, щолоки від виробництва лимонної та молочної кислот, молочна сироватка, пивні та винні дріжджі, нафтопродукти.

На спиртових заводах, які переробляють мелясу, кормові дріжджі отримують шляхом виділення сахарміцетів із мелясної

барди, на решті підприємств — шляхом вирощування дріжджеподібних грибів на тій же барді (близько 80 % післяспиртової барди використовується для вирощування кормових дріжджів).

## **1.2. Характеристика готового продукту**

В технічній літературі кормовими дріжджами називають продукт, який складається із сухої клітинної маси дріжджеподібних грибів роду *Candida* а також дріжджів (сахароміцетів), які являються відходами виробництва спирту, пива та вина. Вирощування дріжджів — найбільш простий спосіб отримання протеїну. Якщо для отримання яловичини необхідно 2—3 роки, свинини — 6 місяців, м'яса птиці — 10 тижнів, то для вирощування дріжджів — декілька годин.

### Біологічна цінність та якість кормових дріжджів

Кормові дріжджі — це суха біомаса (з вологістю до 10 %) інактивованих клітин дріжджеподібних грибів; вони містять 10—15 % сухих речовин культуральної рідини, що залишились у дріжджевому концентраті в процесі відокремлення біомаси й висушених разом з нею.

Кормові дріжджі спиртових заводів відповідають ГОСТу 20083 “Дріжджі кормові. Технічні умови.”. Цей стандарт поширюється на кормові дріжджі, які отримують із технічно чистих культур дріжджів, вирощених на різних субстратах гідролізно-дріжджевих, спиртових, ацетоно-щолокових виробництв. Їх використовують як білково-вітамінну добавку для комбікормів та кормових сумішей для сільськогосподарських тварин, птиці, хут-

рових звірів. Особливо вони ефективні в свинарстві — збагачують раціони білком, незамінними амінокислотами, вітамінами групи В, макро- й мікроелементами.

Кількість протеїну в кормових дріжджах з м'ясної барди й бурякової м'яси становить 48—57 % та 34—45 % відповідно. Сума амінокислот у дріжджах різних заводів — 32—43 %, у тому числі незамінних — 14—19 %.

Білок кормових дріжджів м'ясно-спиртових заводів — цінне джерело незамінних амінокислот, які разом з бетаїном становлять 192,5 г/кг АСР. Якість кормових дріжджів м'ясно-спиртових заводів — на рівні кращих зразків кормових дріжджів з гідролізатів деревини.

Характерна особливість сухих кормових дріжджів м'ясно-спиртових заводів, на відміну від дріжджів, одержаних з інших видів сировини — наявність бетаїну (2,1—6,3 % АСР), який міститься в культуральній рідині. Бетаїн, нарівні з холіном та метіоніном, — джерело метильних груп у метаболічних процесах переметилування, і певною мірою поповнює нестачу метіоніну, однієї з найбільш дефіцитних амінокислот, у кормах. Наприклад, додавання бетаїну до раціону запобігає захворюванню курчат на перозис; підвищує біологічну цінність білку сухих кормових дріжджів м'ясно-спиртових заводів.

При цьому сумарна кількість бетаїну й метіоніну — 38,5 г/кг АСР.

Усього з кормових дріжджів м'ясно-спиртових заводів виділено 16 амінокислот. Крім незамінних амінокислот, вони містять (г/кг АСР): аспарагінової кислоти — 29,2—49,5; глутамінової — 48,2—89,0; треоніну — 8,4—26,0; гліцину — 15,3—

22,1; аланіну — 19,3—25,0; тирозину — 12,4—28,5; серіну — 15,0— 23,1.

Особлива цінність кормових дріжджів — у вітамінах групи В (таблиця 13).

*Таблиця 13. Вміст вітамінів групи В у кормових дріжджах*

Назва	Вміст, г/кг АСР
Тіамін (В <sub>1</sub> )	15—20
Рибофлавін (В <sub>2</sub> )	70—115
Пантотенова кислота (В <sub>3</sub> )	50—80
Холін (В <sub>4</sub> )	1750—3000
Нікотинова кислота (В <sub>5</sub> )	300—450
Піридоксин (В <sub>6</sub> )	7—12
Біотин (В <sub>7</sub> )	0,4—0,8
Інозит (В <sub>8</sub> )	1050—2300

Кормові дріжджі, вироблені на гідролізно-дріжджевих, ацетоно-бутилових, сульфїтно-щолокових та зерно-картопляних заводах повинні містити не більше 10,0 % золи (в перерахунку на АСР); дріжджі, вироблені на мелясно-спиртових заводах та заводах з замкнутим циклом водопостачання — не більше 14,0 % золи. До складу золи дріжджів мелясно-спиртових заводів входить 3,0—6,2 % калію, 0,4—1,6 % натрію, 0,7—1,4 % кальцію в АСР. Вміст важких металів в сухих кормових дріжджах мелясно-спиртових заводів не перевищує максимально допустимі рівні для кормів, отриманих шляхом мікробіологічного синтезу, мг/кг: свинцю — 1,1—3,0; кадмію — 0,05—0,3; ртуті — 0,05; арсену — 1,0; фтору — 1—36.



Кормові дріжджі мають колір від світло-жовтого до брунатного і виробляються в гранульованому або порошкоподібному вигляді. Гранули повинні мати діаметр 5,0—9,0 мм, довжину, не більше 18,0 мм і проходити через сито з діаметром чарунок 3 мм не більше ніж на 5,0.

Термін зберігання кормових дріжджів не повинен перевищувати шести місяців.

Введення 5—6 кормових одиниць дріжджів до складу раціонів з рослинних малобілкових кормів на кожні 100 кормових одиниць зменшує витрату кормів на 16 кормових одиниць.

Завдяки використанню тони кормових дріжджів, добавленої у комбікорми, можна одержати додатково: свинини до 0,7—0,8 т, м'яса птиці — 2—2,3 т, яєць — до 30—35 тисяч штук.

### **1.3. Технологія виробництва кормових дріжджів на нафтових дистилятах**

Кормові дріжджі із нафтових дистилятів, зареєстровані за торговою назвою “Фермозин” та ін. Вони отримані на основі *Candida maltosa* (*Candida guilliermondii*), і дозволені для використання в складі комбікормів для сільськогосподарських тварин та птиці (свиней на відкормі, курей, гусей, качок, поросят, телят) в кількості 7,5 % від маси раціону, та для риб (карпу) в кількості 10 % від маси раціону.

Це виробництво дозволяє суміщувати в одному технологічному процесі виробництво декількох цільових продуктів: кормових дріжджів, депарафінізованого дистиляту, біоліпідного екст-

раку, при переробці якого можна отримати ряд цінних біологічно-активних речовин (жирні кислоти, гліцериди, вітаміни, коферименти, фосфоліпіди).

Технологічний процес виробництва кормових дріжджів із нафтових дистилятів з одночасним отриманням компонентів дизельного палива з покращеними властивостями за температурою застигання здійснюється безперервним способом і складається із слідуючих основних етапів: ферментація — декантація; виділення депарафінізованого нафтового дистиляту та згущення дріжджевої фази; висушування; екстракційне очищення дріжджевої біомаси; гранулювання дріжджів, очищення депарафінізованого нафтового дистиляту; очищення стічних вод виробництва.

Технологічна схема виробництва приведена на рис. 12

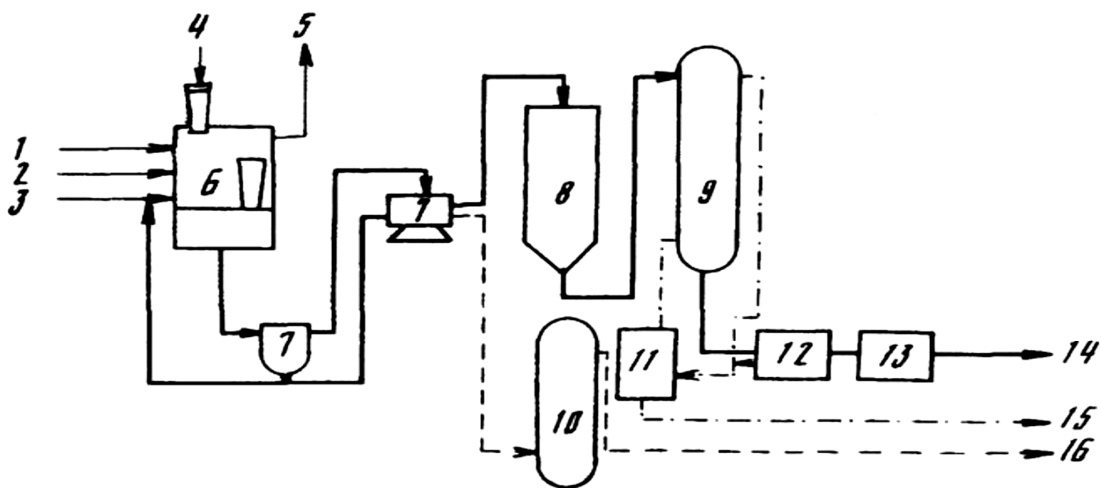


Рис. 12. Схема виробництва кормових дріжджів “Фермозин” із нафтових дистилятів: 1 — живильні солі; 2 — нафтовий дистилят; 3 — вода; 4 — повітря; 5 — відведення повітря; 6 — ферментація; 7 — декантація, сепарація; 8 — сушка; 9 — екстракція; 10 — очищення частково депарафінізованого нафтового дистиляту; 11 — очищення розчинника; 12 — відгін розчинника; 13 — грануляція; 14 — готовий продукт; 15 — вуглеводний екстракт; 16 — очищений нафтовий дистилят

Вузол ферментації являється домінуючим у схемі, тому що на нього припадає 30—40 % затрат процесу.

Ферментацію проводять в нестерильних умовах при високих швидкостях потоку  $D = 0,2—0,25 \text{ год}^{-1}$ .

В залежності від вибраних умов процесу ферментації можна регулювати ступінь утилізації n-алканів, які містяться в дистиляті, від 60 до 95 %. При цьому досягається зниження температури застигання дистиляту на 10—40°.

Інтенсивність процесу і можливість отримання ефективних витратних показників залежить від інтенсивності масообміну в ферментері.

В якості основних компонентів поживного середовища в ферментер вводяться: дизельний дистилят нафти з певним вмістом та спектром n-алканів: аміачна вода в якості джерела азоту; фосфорна кислота та ряд компонентів поживних солей та мікроелементів, які включають іони  $K^+$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  та ін. у оптимальному співвідношенні для забезпечення максимальної швидкості росту дріжджів, технологічна вода.

Процес вирощування дріжджів на нафтових дистилятах пред'являє значно більш високі вимоги до ферментера, ніж, наприклад, процес вирощування дріжджів на сировині з вуглеводами, сульфідними щолоками або бардою.

Культуральна рідина в ферментері являється не трьохфазною, а чотирьохфазною сумішшю, яка складається з водної, газової, дріжджевої та олійної фаз. При цьому дріжджева фаза в результаті присутності олійної фази має структуру пластівців, з цієї причини виникають флотаційні ефекти, які погіршують рівномірність перемішування середовища у всьому об'ємі ферментера.

Тому для цієї технології використовують спеціальний струменевий ферментер. Відведення тепла із ферментера здійснюється за допомогою зовнішнього контура охолодження. Ферментаційне середовище перекачується через контур охолодження спеціальними циркуляційними насосами.

Дріжджева суспензія, яка виходить з ферментера, частково згущується та розподіляється на складові компоненти на стадії первинного відокремлення (декантація, сепарація).

Відносно високий вміст оліїстої фази (нафтового дистилляту) в суспензії та сильна олефільність біомаси дріжджів приводить до утворення стабільних агломератів.

Це дозволяє відокремлювати основну масу технологічної води (близько 60 %) за допомогою декантації.

Подальше розділення концентрованої суспензії, яка містить біомасу, нафтового дистилляту та водної фази, відбувається в безперервно працюючих сепараторах, де відбувається відокремлення нафтового дистилляту та подальше згущення біомаси до 20—21 % АСР. Остаточне виділення вологи з біомаси відбувається на розпилюючих сушарках.

Для отримання дріжджів високої якості з біомаси необхідно повністю видалити залишкові вуглеводні, які знаходяться в клітинах та на їх поверхні. Це досягається в результаті багатоступеневої екстракції висушеної біомаси складною сумішшю полярних та неполярних розчинників.

Перед екстракцією використовують спеціальну обробку біомаси розчинником, в результаті якої змінюється структура клітинної оболонки дріжджів та покращується проникнення розчинника в клітину.

Під час екстракції одночасно з вуглеводами відбувається також часткове вилучення основної маси ліпідної фракції дріжджів. Це призводить до значного збільшення частки білкових компонентів в біомасі. В продукті після екстраційного очищення міститься близько 68 % від загальної кількості білка. Сухі порошкоподібні дріжджі надходять на грануляцію і потім в силос на зберігання.

Отримана суміш розчинника з екстрактом розділяється шляхом дистиляції на чисту регенеровану суміш та біоліпідний екстракт. Екстракт являється цінним продуктом, при переробці якого можна отримати біологічно активні компоненти (фосфатиди, жирні кислоти, ергостерин, убіхінон), а також інші цінні технічні речовини.

Готові кормові дріжджі містять понад 65 % сирого протеїну, менше 5 % сирого жиру, менше 0,5 % залишкових вуглеводів, понад 2,0 % сірковмісних амінокислот та понад 6,5 % лізину.

#### 1.4. Вирощування кормових дріжджів на післядріжджевій бражці

Використання післядріжджевої бражки — забрудненого стоку дріжджевих заводів, дозволяє отримати білковий препарат та, одночасно, знизити показник ХСК.

Для культивування на стоках дріжджевих заводів використовують монокультури *Pichia jadinii*, *Trichosporon cutaneum*, *Pichia guilliermondii* та їх суміші. Ці мікроорганізми відібрані серед багатьох відомих продуцентів біомаси, як найбільш продуктивні. Комбінація адаптованих до стоків культур *Pichia jadinii* та *Trichosporon cutaneum* у співвідношенні 1:1 дозволяє отримати

максимальну концентрацію біомаси на рівні  $10 \text{ г/дм}^3$ , в якій білка знаходиться 49—53 %, що дозволяє використовувати цю біомасу як кормову добавку. В результаті такого культивування рівень ХСК стічної води знижується з 8000 до 3000  $\text{мгО}_2/\text{дм}^3$ .

### **1.5. Вирощування кормових дріжджів на мелясній барді**

Кінцевий відхід мелясно-спиртових заводів — мелясна барда. На кожні 1000 дал спирту отримують 12000 дал мелясної барди. Хімічний склад барди коливається в широких межах, тому що він залежить від якості меляси та способу її переробки спиртовим заводом. РН барди — 5,2—5,4. Питома теплоємність барди 0,92 ккал/(кг·град) ( $3,851 \cdot 10^3 \text{ Дж/(кг·К)}$ ).

За своїм хімічним та вітамінним складом мелясна барда являється повноцінною сировиною для виробництва кормових дріжджів: в додаткових добавках ростових речовин немає потреби.

Вміст сухих речовин в натуральній барді 6,7 %, в упареній — 53,0—53,6 %.

В основу апаратурно-технологічної схеми виробництва покладений двоступеневий спосіб вирощування дріжджів на нерозведеній барді, без попереднього виділення з неї мертвих дріжджів-сахароміцетів.

Для швидкого вирощування засівних дріжджів в якості дріжджегенератора використовують апарат з ерліфтним аерато-

ром ємністю 100 м<sup>3</sup>, який дозволяє при інтенсивній аерації (80 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup>·год) отримати 20?25 % засівних дріжджів в стані максимальної фізіологічної активності.

Для вирощування дріжджів на I та II ступенях використовуються посівні апарати (дріжджевирощувачі) ємністю 320 та 600 м<sup>3</sup> з ерліфтною системою аерації та витратою повітря 55?60 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup>·год.

За технологією хлористоводнева та ортофосфорна кислота із залізничних цистерн перекачується насосом в футеровані резервуари, обладнані пастками для газових конденсатів.

Із зовнішнього резервуару хлористоводнева кислота через насос та пастку надходить до дріжджеростильних апаратів, в дріжджегенератор та велику дріжджанку. При надходженні кислоти в кожний апарат окремим дозуючим насосом постійно підтримується рН середовища для I ступеню вирощування в межах 4,0—4,2, та для II спупеню 3,5—3,8. Ортофосфору кислоту насосом направляють в чан-декантатор, призначений для приготування розчинів солей.

Диамонійфосфат і карбамід вивантажують з вагонів на склад. З вагів за допомогою тонорельса з тельфером солі з 5—6-кратною кількістю лютерної води або конденсату з випарної установки вивантажують в чан-декантатор з мішалкою.

З чану-декантатору освітлений розчин солей насосом перекачують в мірник; з нього він самотечією надходить до чанів-змішувачів.

Піногасники із цистерни зливають або перекачують насосом в зовнішній резервуар, і тим же насосом — в підігрівач та

емульсор. Готову емульсію із емульсора насосом подають в мірник-дозатор, а з нього — в механічні пінегасники.

Гаряча барда (95—98 °С), яка містить дріжджі-сахароміцети, при виході із бражної колони по U-подібній трубці зливається в збірник-стерилізатор, з якого насосом безперервно подається через фільтр на пластинчасті теплообмінники для охолодження до 20—25 °С. Вода, яка входить в теплообмінник, проходить через водяний фільтр. Напрямок потоку через фільтри барди та води змінюється через кожні 2—3 доби. Охолоджена до 20—25 °С барда з теплообмінників безперервно надходить до чану-змішувача (сусловий чан), в якому змішується з розчинами солей.

Поживне середовище (кондиціонована барда) із чану-змішувача насосом подається в колектор, періодично — у посівний апарат (велику дріжджанку) та в дріжджегенератор, і безперервно — в ферментер (дріжджевирощувальний апарат).

Дріжджі чистої культури розмножуються на стерилізованому мелясному суслі. Меляса через ваги надходить з основного виробництва в апарати чистої культури (АЧК). В АЧК, малій дріжджанці та у великій дріжджанці середовище аерується за допомогою повітрядувки.

Засівні дріжджі з АЧК передаються в малу дріжджанку, з неї — в велику дріжджанку, з якої перекачується насосом в дріжджегенератор.

Поживним середовищем в дріжджанках та в дріжджегенераторі слугує кондиціонована барда. Для отримання оптимального рН середовища в дріжджегенератор подається з мірника або дозуючим насосом хлористоводнева або сірчана кислота.



Культуральна рідина в кожному дріжджегенераторі аерується з окремих повітрядувок відповідної потужності  $60 \text{ м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{год}$ .

Звільнена від піни бражка із піновідокремлювача подається насосом через сітчастий фільтр на I гурт сепараторів. Відтік від них та розчин солей направляється в чан-змішувач, а з нього — в дріжджевиросщувальний апарат для повторного вирощування дріжджів.

Дріжджева суспензія від I гурту сепараторів зливається в збірник та насосом подається на II гурт сепараторів.

Суспензія від них з концентрацією біомаси  $180\text{—}280 \text{ г/дм}^3$  промивається в збірнику теплою водою, згущується на тих же самих сепараторах за коловим циклом до концентрації  $400\text{—}500 \text{ г/дм}^3$ , та передається в термолізатор безперервної дії.

Дріжджі, вирощені на II ступені, виділяють за тим же самим режимом, з використанням піновідокремлювача, механічного піногасника, двох гуртів сепараторів, з'єднаних із збірниками та з насосами. Отримані відтйоки направляють на випарку, а дріжджеву суспензію ( $400\text{—}500 \text{ г/дм}^3$ ) — на термолізатор.

В термолізаторі дріжджі рівномірно з високою швидкістю дозування подаються насосом на розпилюючий диск сушильної камери.

Висушені дріжджі, пройшовши через магнітний сепаратор, у вигляді порошку відбираються з нижньої частини конусу через циклон-відокремлювач. Виділений з цього циклону дріжджевий пил вентилятором повертають в батарею циклонів.

Із бункеру сухі дріжджі переміщуються на автоматичні ваги, а з них — в крафт-мішки з клапанами або у відкриті мішки, які зашивають на мішкозашивочній машині.

За допомогою транспортеру та електровивантажувача мішки із дріжджами розміщують на складі.

### **1.6. Очищення стічних вод дріжджевих заводів**

Стічні води дріжджевих заводів мають рН 4,3—5,5 і містять зависі речовин в кількості 380—910 мг/дм<sup>3</sup>, в них стійкий темно-брунатий колір, вони характеризуються високою концентрацією органічних та мінеральних сполук і відповідають вимогам норм, які пред'являються до стічних вод.

На 1 т дріжджів приходить від 12 до 30 м<sup>3</sup> стічних вод. Завод потужністю 20 т дріжджів/добу разом із стічними водами скидає кількість забруднень за БСК, еквівалентну забрудненню стічних вод міста з населенням близько 70 тис. чоловік.

Найбільш перспективною, на цей час, вважається технологія очищення стічних вод дріжджевих заводів за допомогою анаеробного біореактора з гранульованим мулом та біотенків з іmobilізованими на волокнистому носію мікроорганізмами. Продукт розпаду речовини — біогаз із вмістом метану 65—75 %.

Анаеробне зброджування стічних вод дріжджевих заводів здійснюють в анаеробних реакторах з висхідною течією стічних вод крізь шар гранульованого мулу.

*Таблиця 14* **Характеристика стічних вод дріжджевого виробництва**

Санітарно-хімічні показники стічних вод дріжджевого виробництва	Стічні води		
	Забруднені	Очищені способом	
		анаеробним	аеробним
рН	6,3	7,6	8,5
ХСК, мг/дм <sup>3</sup>	13000—14500	3200—3800	1300
БСК, мг/дм <sup>3</sup>	13600—15200	2720—3040	480
Сухий залишок, мг/дм <sup>3</sup>	5100—5700	3600—4200	3600—4200
Загальний азот, мг/дм <sup>3</sup>	800—1500	500—900	60—80
Фосфор, мг/дм <sup>3</sup>	80—106	70—96	30—40
Прожарений залишок, мг/дм <sup>3</sup>	5100—5700	3600—4200	3600—4200

Біореактор — це ємність, у верхній частині якої встановлені спеціальні устрої, які утворюють систему сепараторів біомаси та біогазу. Мікроорганізми з висхідною течією рідини потрапляють в зону седиментації, де біомаса відокремлюється від стічних вод та бульбашок повітря. Очищена вода виходить з біореактора, а осаджені мікроорганізми повертаються в зону зброджування.

Висхідні та нисхідні рухи пластівців мікроорганізмів сприяють утворенню гранул діаметром 1—3 мм.

Біогаз та рідина, які рухаються знизу вгору, приводять шар гранул у завислий стан. Завдяки цьому в зоні бродіння знаходиться основна кількість біомаси анаеробних мікроорганізмів.

Аеробна частина комбінованої системи передбачає використання біотечії з волокнистим носієм для мікроорганізмів, іммобілізованих на волокнистому носію, який підвішується в камері біотенка.

Для попередження спливання та заплутування волокон носія в конструкції біотенка прийнята ерліфтна система аерації.

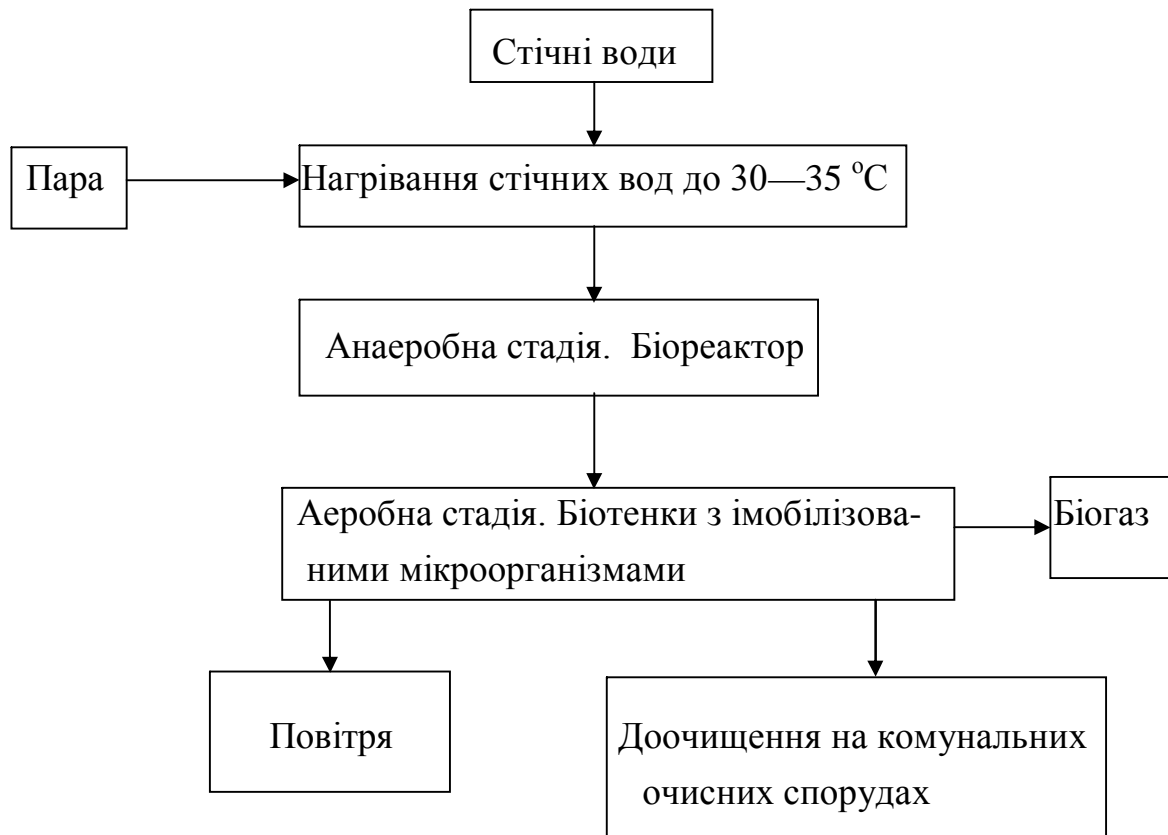


Рис. 13. Принципова схема очищення виробничих стічних вод дріжджевого заводу

Стічні води, витіснені новими порціями води, рухаються по біотенкам до виходу і через переливну чарунку виходять в каналізаційний колектор для викиду в міську каналізацію.

Процес адаптації та накопичення активного мулу відбувається поступово і супроводжується постійною зміною домінуючих форм мікроорганізмів, в тому числі й індикаторних форм найпростіших.

Стан іммобілізованої плівки контролюють мікроскопіюванням та ваговим методом, визначаючи кількість фіксованих мікроорганізмів в г на 1 г носія.

Масовий розвиток індикаторних організмів в початковий період — *Amoeba limax*, *Colpoda steini*, *Euplotes charon* свідчить про зародження біоплівки на волокнистому носію. Ефект очищення в цей період не перевищує 50 %.

Тривалість початкового періоду — 3—5 діб. Потім починається період формування адаптованого до умов очищених стічних вод дріжджевого заводу біоценозу мікроорганізмів: *Styloynchia pustulata*, *Vorticella alta*, *Vorticella mikrostromas*, *Opercellaria*, *Callidina sp.*, коловерток та водяних кліщів, з яких складається біоплівка. Їх кількість поступово зростає.

Тривалість перехідного періоду становить 6—8 діб.

### **Контрольні запитання**

1. Охарактеризуйте основні етапи розвитку виробництва кормових дріжджів.
2. Які вимоги пред'являються до якості кормових дріжджів, одержаних на м'ясно-спиртових заводах?
3. Які біологічно-активні речовини містяться в препаратах кормових дріжджів?
4. В чому особливості препаратів кормових дріжджів, вироблених на гідролізно-дріжджевих, ацетоно-бутилових, сульфідно-щолокових та зерно-картопляних заводів?
5. Яким вимогам повинні відповідати препарати кормових дріжджів за показниками безпеки?

6. Яка біологічна ефективність препаратів кормових дріжджів?
7. Охарактеризуйте особливості біотехнології кормових дріжджів на нафтових дистиллятах.
8. Які мікроорганізми використовуються для культивування на стоках спиртових заводів?
9. За якою технологією здійснюється вирощування кормових дріжджів на мелясній барді?
10. Який принцип будови кларифікаторів, дріжджанок, дріжджегенераторів?
11. Який склад мають стічні води дріжджевих заводів?
12. За допомогою яких біотехнологій здійснюється очищення стічних вод дріжджевих заводів?

## **Глава 2. БІОКОНВЕРСІЯ ВІДХОДІВ ПЛОДОО- ВОЧЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ**

### **2.1. Характеристика сировинної бази**

Однією з перспективних біотехнологій являється біоконверсія відходів фруктів та овочів в білкові препарати. Технологічні варіанти біоконверсії відходів плодоовочевої продукції в мікробіологічні концентрати являються прикладами безвідходного виробництва. Особливе значення в якості додаткових ресурсів для синтезу мікробного білка відходи плодоовочевої продукції мають ще й тому, що утворюються у великих об'ємах. В цілому їх кількість становить близько 2/3 від об'єму продуктів переробки нафти,

які використовуються у виробництві кормового білка, та 1/6— 1/4 від всього об'єму сировини для мікробіологічної промисловості.



Рис. 14. Шляхи утворення відходів на підприємствах з переробки плодів та овочів

Із всіх відходів плодоовочевої продукції близько 50 % використовується для переробки з метою отримання технічних продуктів (пектин, органічні кислоти, барвники, дистилати та ін.) та

для згодовування в сирому, висушеному або силосованому вигляді сільськогосподарським тваринам. Більша ж частина відходів втрачається.

Єдиний шлях переробки цих відходів — мікробна трансформація. Ці відходи містять ряд цінних компонентів: білки, вуглеводи, мінеральні речовини, пектини, вітаміни, кислоти, альдегіди, спирти (таблиця 15).

*Таблиця 15. Вміст різних компонентів в плодовоовочевих відходах*

Компоненти	Відходи		Компоненти	Відходи	
	Плодів	Овочів		Плодів	Овочів
Вуглеводи, %	8,3—19,0	3,0—17,2	Вітаміни, мг		
Білки, %	0,3—1,3	0,6—8,7	%:	0,05—1,75	7,2
Жири, %	0,2—0,6	0,1—0,5	А	0,02—0,15	0,03—0,36
Зола, %	0,3—0,6	0,8—1,2	В <sub>1</sub>	0,07	0,02—0,25
			В <sub>2</sub>	4,0—200,0	6,0—69,0
			С		

За своїм вуглеводним складом, а також за вмістом азоту та біогенних речовин плодовоовочеві відходи найбільш близькі до ідеально збалансованого живильного середовища для мікроорганізмів, в той час як парафіни нафти містять лише джерело вуглецю.

Ці відходи біорациональні, тому немає необхідності використовувати вартісні методи очищення продукту, що ускладнює технологічний процес.

Різні відходи декілька відрізняються за своїм складом, тому плодовоовочева сировина — це нестандартна сировина для біоконверсії. Тому для переробки цих відходів іноді використовують



попередню обробку, використовуючи асоціації культур або мікроорганізмів з широким спектром ферментативної активності.



Рис. 15. Біоконверсія відходів плодоовочевої сировини

Особливістю відходів плодів та овочів являється їх обмежений термін придатності для подальшої переробки та використання в якості вторинної сировини. Тому найбільш доцільною являється переробка відходів на місці їх утворення.

Плодоовочева сировина має перспективи використання, перш за все, для виробництва білкових препаратів та енергії. Найбільш раціональним для потреб сільського господарства явля-

ється отримання із відходів плодів та овочів білкових препаратів у формі рідких та сухих мікробіологічних концентратів.

Приведена вище схема практично виключає утворення відходів, крім того кінцевий продукт має велику кормову цінність і за рахунок органічного складу небілкової частини.

## 2.2. Особливості технології

Відпрацьована можливість використання різних плодоовочевих відходів (капустяне листя, картопляна шкірка, яблучні та томатні вижимки) в якості субстратів для культивування мікроорганізмів, які відносяться до дріжджів роду *Candida* та *Endomycopsis*. Ці мікроорганізми синтезують комплекс ферментів (амілази, пектинази, геміцелюлази), гідролізують важкорозчинні поліцукриди до легкозасвоюваних форм та накопичують повноцінну білкову біомасу. При цьому стадія попередньої обробки сировини, вартість якої багато в чому визначає рентабельність виробництва, практично не потрібна, що значно спрощує технологічний процес. Схема біотехнологічної переробки плодоовочевої сировини включає нестерильне культивування продуцентів за наступних умов: рН поживного середовища близько 5,0; температура культивування 28—31°C; аерація — 1 об'єм повітря на 1 об'єм середовища в одиницю часу.

Після культивування проводять обезводнювання культуральної рідини одним із відомих способів. В результаті отримують препарат із вмістом сирого протеїну 35—40 % (рис. 16).

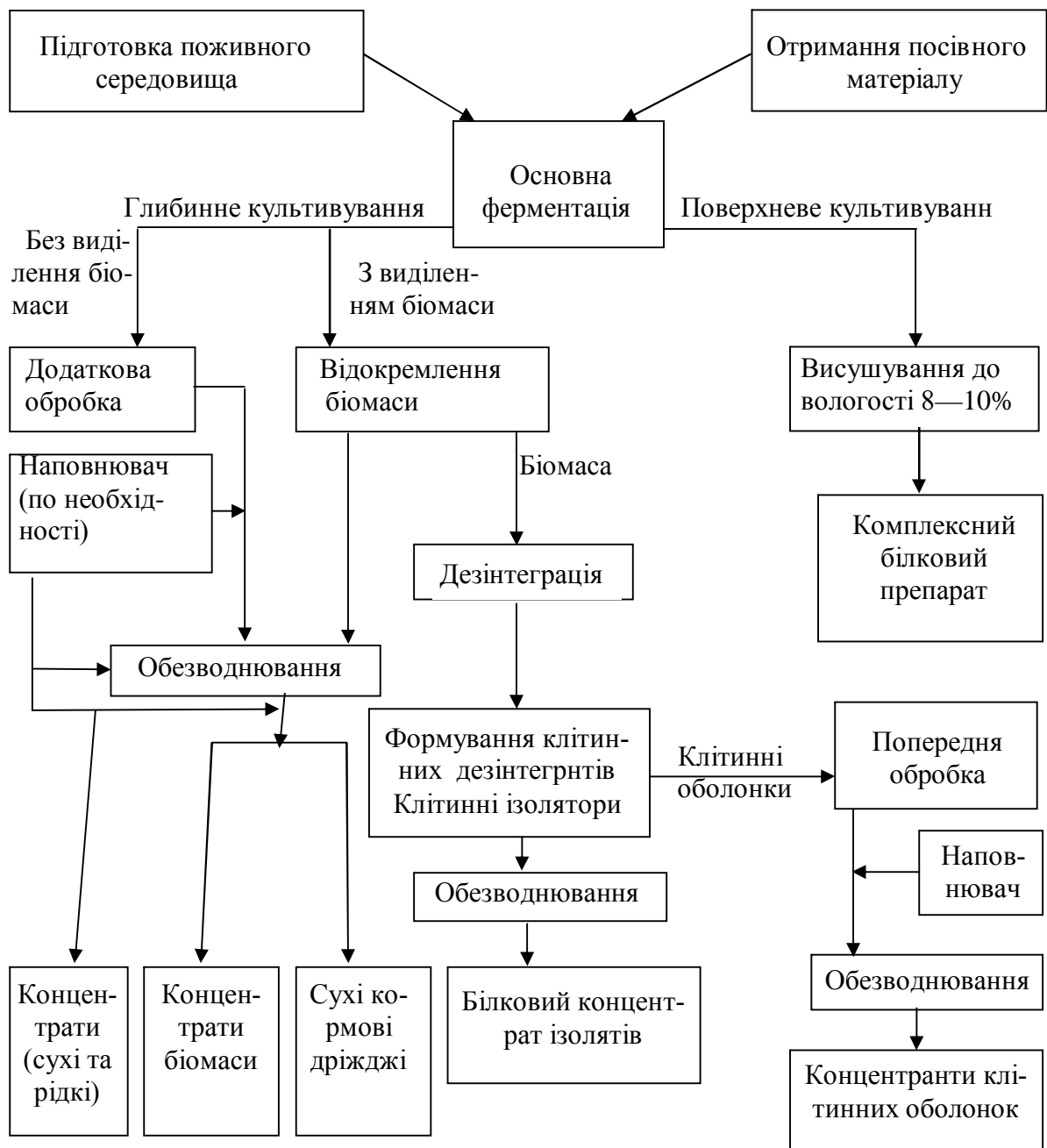


Рис. 16. Схема виробництва кормових білкових препаратів із плодоовочевих відходів.

Концентрати після мікробної переробки відходів плодів та овочів можуть відрізнятися:

- за складом;
- затехнологією обробки середовища після культивування

ня (проводять виділення деяких із перерахованих компонентів; і у  
ня (проводять виділення деяких із перерахованих компонентів; і у  
всіх випадках часткове або повне вилучення води);

- за товарною формою — рідкі, тонкодисперсні порошки, суміші з наповнювачами.

Найбільш проста технологія передбачає концентрування (обезводнювання) культуральної рідини, в більш складних випадках проводять очищення з метою виділення домішок, що дозволяє збільшити в концентратах вміст цільових компонентів та отримати препарати з більшим вмістом білка. Найбільш придатними способами обезводнювання являються упарювання та сушка (або лише упарювання у випадку виробництва рідкого концентрату). Рідкі концентрати мають обмежений термін зберігання; більші кошти витрачаються на транспортування “зайвої води”. Але концентрати в рідкій формі мають і переваги: при їх виробництві скорочуються затрати на висушування та пакування продукту; при роботі з рідкими препаратами легше можна здійснити механізацію та автоматизацію.

Порошкоподібні препарати, які містять екстрацелюлярні речовини, характеризуються гігроскопічністю, що викликає необхідність використання герметичної упаковки, та термопластичністю, що призводить до налипання концентратів під час сушки.

При культивуванні мікроорганізмів поверхневим способом (твердофазне культивування) отримують комплексний білковий препарат з вологістю 8-10 %.

Отримані на основі відходів плодів та овочів в різних товарних формах (концентрати рідкі та сухі, комплексний білковий препарат, клітинна маса) кормові препарати являються абсолют-

но безпечними, містять необхідну кількість протеїну, крім того вони цінні за органічним складом небілкової частини.

### **Контрольні запитання**

1. Чому відходи плодоовочевої продукції розглядаються як сировина для синтезу білка та енергії?
2. Охарактеризуйте основні шляхи утворення відходів на переробних підприємствах.
3. Які продукти можна отримати із відходів плодоовочевої продукції шляхом їх мікробної трансформації?
4. Дайте характеристику основних стадій виробництва білкових препаратів із плодоовочевих відходів при глибинному та поверхневому культивуванні мікроорганізмів.

## **Глава 3. ВИРОБНИЦТВО БІОІНСЕКТИЦИДІВ**

### **3.1. Загальна характеристика інсектицидів**

Перші інсектициди мали хімічне походження. Їх було синтезовано сотні. Самим відомим інсектицидом був дихлордифенілтрихлоретан (ДДТ).

Цю хлорорганічну сполуку синтезували в 1870-х роках, але в якості інсектициду стали використовувати лише в кінці 1930-х років. ДДТ виявився високоефективним засобом для боротьби з багатьма комахами-шкідниками.

Як і інші хлорорганічні сполуки, він здійснює паралізуючу дію на нервову систему та м'язові тканини комах. До цього часу синтезовані і широко застосовуються інші хлорорганічні сполуки, такі як дильдрін, альдрін, хлордан, ліндан, токсофен.

Ще один клас хімічних інсектицидів — фосфороорганічні сполуки, які включають малатіон, паратіон, діазинон. Фосфороорганічні інсектициди першого покоління були розроблені як бойові отруйні речовини. Тепер їх використовують для контролю чисельності комах. Їх дія оснований на інгібуванні ацетилхолінестерази.

Інсектициди цього класу порушують функціонування мотонейронів та нейронів мозку комах.

Як хлорорганічні, так і фосфороорганічні (в меншій мірі) інсектициди мають шкідливу дію на людей, тварин, екосистему. Ця дія може проявлятися негайно, або через тривалий час. Хлорорганічні сполуки (зокрема ДДТ) зберігаються в навколишньому середовищі від 15 до 20 років і постійно накопичуються. Біоаккумуляція хімічних інсектицидів в жирових тканинах багатьох організмів вже призвела до летальних наслідків. Так, в Північній Америці, де хімічними інсектицидами оброблялось близько 50 млн. га земель, практично зникли сапсани, яструби-перепільники, білоголові орли, бурі пелікани, вухасті баклани.

Крім того, з часом комахи стають все більш стійкими до багатьох хімічних інсектицидів, і тому необхідно постійно збільшувати їх кількість для боротьби з комахами.

Щорічно збитки сільського та лісного господарства від комах на земній кулі обчислюються величезними сумами.

Інсектициди — це хімічні або мікробіологічні препарати для боротьби із шкідливими комахами.

Інсектициди неодинакові за своєю біологічною дією і поділяються на амфіциди — препарати для боротьби з тлею; альгіциди — препарати для боротьби з водоростями, акаріциди — для боротьби з рослинноїдними кліщами, імагоциди — для знищення дорослої фази комах та кліщів, антиметаболіти — препарати, які являються аналогами проміжних продуктів обміну речовин і порушують нормальний процес розвитку комах, ювеноїди — аналоги ювенільного гормону, що має негативний вплив на розвиток (метаморфоз) та обмін речовин у комах, суперфіданти — стимулятори “летальної” зажерливості, стериланти — засоби, які знищують здатність організму до розмноження та ін.

### **3.2. Характеристика продуцентів біоінсектицидів**

Біоінсектициди, або мікробні пестициди містять спори або вегетативний міцелій патогенних для комах мікроорганізмів та/або продукти їх життєдіяльності.

Відомо понад 500 видів грибів, негативно діючих на комах та кліщів, і понад 90 видів бактерій, вражаючих комах.

Їх використання було відоме ще в ХІХ сторіччі.

В 1970 році Басі вперше показав, що мікроорганізм (ентомопатогенний гриб *Beauveria bassiana*) може викликати інфекційне захворювання тварин (шовковичного черв'яка). Вражена гусінь була зморщеною та сухою, покритою білим нальотом спор, що робило її схожою на зацукрені фрукти. Тому це захво-

рювання отримало назву білої мускардіни. Басі визначив грибне походження захворювання та його здатність передаватися від одних комах до інших. Пізніше було встановлено, що крім такої корисної комахи, як тутовий шовкопряд, гриб білої мускардіни паразитує на колорадському жуці, картопляній корівці, шкідливій черепащі та на інших комах. За своїм географічним поширенням цей гриб може вважатися космополітом.

Гриб *Beauveria bassiana* вражає понад 175 видів комах лише в Північній Америці, на території СНД гриб вражає комах понад 60 видів комах.

Гриб — збудник зеленої мускардіни — метарізіум (*Metarhizium anisopliae*), вперше був знайдений та описаний І.І. Мечніковим. Досліди І.І. Мечнікова та І.Н. Красильщикова поклали початок дослідженням з мікробіологічного методу боротьби із шкідливими комахами.

Збудник зеленої мускардіни вражає понад 70 видів комах, з яких 34 види відносяться до жуків і лише 3—4 — до лускокрилих.

Із грибів, які мають велике значення в обмеженні кількості шкідників цитрусових, головним чином концид, слід назвати гриби роду вертициліум (*Verticillium*).

Особливу групу патогенів комах, складають гриби роду аспергіл (*Aspergillus*), які викликають аспергільози. Ці гриби, в основному, являються сапрофітами. Вони вражають термітів, кліщів, постільного клопа та представників 7 класів комах: *Homoptera*, *Orthoptera*, *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera*, *Isoptera*, *Thysanura*. Гриби проникають в тіло комах через покриви, використовуючи ферменти — хітінази, протеази, ліпази. Летальна дія грибів на комах також викликається дією токсинів.



Крім грибів багато біоінсектицидів має бактеріальне походження. Бактеріальними інсектицидами називають бактерії, продукти життєдіяльності яких летальні, або які викликають загибель комах.

Бактерії, пов'язані з комахами, відносяться, головним чином, до сімейства *Pseudomonadaceae*, *Lactobacillaceae* (роди *Diplococcus* і *Streptococcus*), *Micrococcaceae* та *Bacillaceae*. Деякі з них облігатно патогенні і часто виявляють хазяйську специфічність, інші — тимчасово живуть з комахами, а більшу частину життя — незалежно від них. Перші більш вимогливі, їх важче культивувати. На практиці використовують лише деякі бактерії сімейства *Bacillaceae*, а саме *Bac. thuriengiensis*, *Bac. popillae*, *Bac. lentimorlus* та *Bac. sphaericus*.

Вони патогенні, перш за все, для *Lepidoptera*. Препарати на основі *Bac.thuriengiensis* випускаються в багатьох країнах світу. Вони мають різні комерційні назви: ентобактерін, дендробацилін, дипел, турицид, агрітол, бактан та ін.

*Bac.thuriengiensis* — це найбільш ефективні та вивчені мікробні інсектициди. Вони представлені багатьма штамми та підвидами (*subsp.*), і кожний з них синтезує токсин, специфічний по відношенню до певних комах. Наразі описано близько 60 підвидів *Bacillus thuriengiensis*.

Наприклад, *B.thuriengiensis subsp. kurstaki* токсичний для лялечок лускокрилих, товстоголовки, мермітид та гусені листявертки — брунькоїда ялинового. *B. thuriengiensis subsp. israelensis* знищує двокрилих: комарів та мушок і т.д.

Інсектицид (білковий токсин) *B. thuriengiensis subsp. kurstaki* та інших штамів знаходиться в клітині у вигляді параспоруального кристалу — структури, яка утворюється під час спорую-

ляції бактерій. Ніякої особливої біологічної функції ця структура не виконує. На її частку припадає від 20 до 30 % сухої маси споруючої культури і складається вона, головним чином, із білка (95 %) та невеликої кількості вуглеводів (5 %). Більшість ентомоцидних білків має масу 130—145 КДа (представники сімейства *Cry 1*, *Cry 4*, *Cry 9*). Кристал — це білковий агрегат, який дисоціює на субодиниці в слабкому лузі. При попаданні в кишечник комахи кристал розчиняється в лужному середовищі шлункового соку (рН 9,5—10,5) і розчинені протоксини (токсини, які потребують додаткової активації) активуються протеолітичними трипсино- та хімотрипсиноподібними ферментами кишечника до “істинних токсинів”.

Методом рентгеноструктурного аналізу визначена третинна структура двох ентомоцидних білків: дельта-ендотоксину *Cry 3Aa* (67 КДа), який продукується *ssp. Tenebrionis* та “істинного токсину”, що відповідає протоксину *Cry 1Aa* (65 КДа, *ssp. Kurstaki*). Ідентичність цих білків за амінокислотними послідовностями складає лише 33 %, але їх третинні структури подібні.

Існує думка, що всі протоксини мають подібну будову поліпептидного ланцюга.

Третинна структура молекули “істинних” токсинів представлена трьома доменами.

Перший, N-кінцевий, побудований із семи  $\alpha$ -спиралей. Другий домен складається з трьох  $\beta$ -листів так, що на розрізі спостерігається трикутник. Третій домен представляє собою “каналку” з двох антипаралельних  $\beta$ -листів.

Незважаючи на ясно виражену доменну структуру, в ході денатурації молекула ендотоксину веде себе як єдине ціле (Orth,

etal, 1995). Ця цілісність забезпечується тісними міжмолекулярними контактами.

Сгу-токсини мають слідуєчий механізм дії — спочатку кристал ендотоксину потрапляє до кишечника комахи і розчиняється, далі білок розщеплюється шляхом ферментативного гідролізу, утворюючи “істинний” токсин. На наступному етапі II та III домени взаємодіють з мембранним білком-рецептором, в результаті чого змінюється конформація I-го домену. Далі декілька молекул токсину утворюють в мембрані пору або іонний канал.

На наступному етапі відбувається зв’язування “істинного токсину” з афінним до нього білком (рецептором), експонованим на поверхні апікальних мембран епітеліальних клітин кишечника. Зв’язування токсину з рецептором являється зворотнім (Hofmann, et. al., 1986; Hofmann, et. al., 1988). Далі відбувається незворотня перебудова конформації молекули токсину з наступним інтегруванням деяких формуючих його структур в мембранний бішар. Після цього зв’язування токсину з мембраною являється незворотнім. Одночасно з вбудовуванням в мембрану відбувається асоціація декількох молекул токсину. Ансамбль трансмембранних ділянок, які належать декільком асоційованим молекулам токсину, утворює (в залежності від конкретної пари токсин/мембрана) пару, або іонний канал. В першому випадку (утворення пори), відбувається загибель клітин за механізмом колоїдно-осмотичного лізису. У другому (утворення іонного каналу) — загибель в результаті різкої зміни іонного складу та рН внутрішньоклітинного середовища. З такого каналу відбувається втрата значної частини внутрішньоклітинної АТР. Приблизно через 15 хвилин після формування такого іонного каналу клітинний метаболізм блокується, комаха

перестає харчуватися, відбувається обезводнення організму, в результаті чого настає смерть. Можливість шкідливого впливу токсинів на людей та сільськогосподарських тварин незначна.

Спосіб дії токсинів *B. thuringiensis* дещо обмежує галузь їх використання.

Щоб вбити комаху, *B. thuringiensis* повинен обов'язково потрапити в її кишечник.

*B. thuringiensis* частіше всього розпилюють, причому бактерії зазвичай змішують з атрактантами комах, щоб підвищити ймовірність того, що комаху проковтне токсин. Однак для комах, які живуть на корінні або в тканинах рослин, токсин *B. thuringiensis* не представляє небезпеки. Крім того, через певний час комах стають стійкими до біоінсектицидів у зв'язку із зміною мембранного білка клітин кишечника, який в нормі виконує функцію рецептора токсина *B. thuringiensis*.

Небезпеку для комах представляють також спори бактерії. Поглинуті спори проростають у кишечнику, а вегетативні клітини проникають в порожнини тіла і руйнують їх.

У висушеному стані спори *B. thuringiensis* здатні зберігатися понад 10 років.

Бактерії зберігають на інертному носію (наприклад, на паперовій смужці), ліофілізуючи або заморожуючи в рідкому азоті. На виробництві бактерії вирощують у вигляді зануреної періодичної культури, в стерильних умовах з аерацією та перемішуванням.

Поживне середовище (ДЖС) готують на основі кормових дріжджів, кукурудзяної муки та жиру. Додаткове середовище ПКС, містить глюкозу, солі кальцію та азотисті речовини з бавовняного шроту. Інші рецептури середовищ містять в своєму скла-

ді такі інгредієнти, як рибна, бавовняна або соєва мука, меляса, крохмаль, діамонійфосфат. В практиці культивування продуцентів біоінсектицидів відомі факти впливу складу живильного середовища та умов культивування не лише на продуктивність штамів, але і на ентомопатогенну активність культури. Культивування проводять при 30—35 °С протягом 20—40 год. до отримання вільних спор. Після цього біомасу відокремлюють сепарацією або центрифугуванням.

Якщо при виробництві препарату використовують не лише біомасу але і культуральну рідину, то після їх відокремлення останню упарюють, потім об'єднують з біомасою і висушують розпилюванням.

Висушування можуть проводити і без попереднього сепарування.

Основним показником якості мікробіологічних засобів захисту рослин являється ентомопатогенна активність.

Ентомопатогенну активність визначають на гусені непарного шовкопряду іншого віку. Розрахунок активності проводять за формулою Кербера; концентрацію життєздатних спор — за методом Пастера—Коха.

Титр спор в препаратах доводять до необхідного рівня, додаючи до препаратів захисні речовини, такі, наприклад, як каолін. Крім того, в них додають також розпилювачі, прилипачі, сонцезахисні речовини.

Іншим перспективним кандидатом для виробництва біоінсектицидів являються бакуловіруси.

Бакуловіруси — це паличкоподібні віруси з дволанцюговим ДНК-геномом, які інфікують різних хребетних. Різні підгру-

пи цього сімейства патогенні для лускокрилих, жорсткокрилих, рівнокрилих, двокрилих, сітчастокрилих, джерельників, перетинчатокрилих. Деякі з них відіграють важливу роль в контролі чисельності певних комах — шкідників в природних умовах. Бакуловіруси використовували в Північній Америці, починаючи з 1930 років, до появи хімічних пестицидів в 60-і роки, для боротьби з шкідниками лісів, в тому числі з розпилювачем ялинковим (*Neodiprion sertifer*).

Віріон бакуловіруса має циліндричний нуклеокапсид, в якому знаходиться його ДНК. Потрапивши в ядро інфікованої клітини, бакуловірусні частинки об'єднуються, утворюючи контактну структуру, заключену в кристалічний білковий матрикс. Він складається в основному із білка полієдрину. Після загибелі інфікованих комах, білок руйнується в лужному середовищі, матрикс розчиняється, і звільнюються інфекційні вірусні частки. Вони проникають в клітини кишечника комах, через цитоплазму потрапляють до ядра, де після відокремлення нуклеокапсиду відбувається реплікація віруса і утворення нових вірусних часток. Деякі з них потрапляють в систему кровообігу комахи, відшнуровуються від плазматичної мембрани інфікованих клітин, а потім потрапляють в інші органи. Як правило, комаха гине через 10 раундів реплікації віруса, тобто через 5—6 діб після інфекції.

Одною з переваг бакуловірусів як біоінсектицидів являється вибірковість їх дії. З одного боку, це значить, що даний бакуловірус може використовуватися для контролю чисельності лише певних комах-шкідників. Але, з іншого боку, завдяки тому, що бакуловіруси еволюціонували разом з своїми комахами-хазяїнами, вони навчилися переборювати їхні захисні механізми,

а тому стійкість до цих вірусів формується дуже рідко — набагато рідше, ніж до *B. thuringiensis*. Більше того, стійкі до бакуловірусів комахи швидко втрачають цю властивість після того, як перестає відбуватися взаємодія з вірусами.

Але, для більш широкого використання бакуловірусів необхідно розширити коло їх хазяїв. Це досягається шляхом генно-інженерних маніпуляцій.

Бакуловіруси не спричиняють миттєвої дії — загибель комах відбувається через достатньо тривалий час, тому бакуловіруси не дуже ефективні як засіб контролю чисельності комах. Однак в різні штами бакуловірусів можна ввести специфічні гени, і тоді вірус може діяти як постачальник генів, які забезпечують синтез інсектицидів упродовж всього життєвого циклу віруса.

### **Контрольні запитання**

1. Охарактеризуйте особливості дії та будови хімічних (фосфороорганічних та хлороорганічних) інсектицидів.
2. Як класифікуються інсектициди за своєю біологічною дією?
3. Охарактеризуйте принцип дії біоінсектицидів.
4. Як діють біоінсектициди, які продукує ентомопатогенний гриб *Beauveria bassiana*?
5. Назвіть біоінсектициди грибного походження та охарактеризуйте принцип їх дії.
6. Продукти життєдіяльності яких видів бактерій використовуються для виробництва біоінсектицидів?

7. Дайте характеристику бактерії *Bac. thuriangiensis* — найбільш ефективного мікробного інсектициду.
8. Як діють кристали білків (білкових токсинів) *Bac. thuriangiensis* на життєдіяльність комах?
9. Який механізм дії Сгу-токсинів?
10. Охарактеризуйте особливості біотехнологій культивування бактерій *Bac. thuriangiensis*.
11. Як визначають ентомопатогенну активність?
12. Які перспективи мають бакуловіруси у виробництві біоінсектицидів? В чому їх переваги та недоліки?

## **Глава 4. БІОТЕХНОЛОГІЯ КАРОТИНОЇДІВ**

### **4.1. Історія відкриття та вивчення каротиноїдів**

Вперше каротин був виділений в 1831 році Вакенродером із ріпи та моркви, ним же і була запропонована назва для виділених кристалів — каротин (від латинського “карота” — морква).

В 1837 році Берцеліус шляхом екстракції спиртом виділив із осіннього листа жовтий барвник, названий ним ксантофілом. Довгий час ці пігменти вважали однаковими і лише російському вченому Бородіну вдалося в 1889 році довести неідентичність обох пігментів, а також встановити, що жовтий пігмент, виділений із рослин, являється сумішшю декількох фізично споріднених барвників.

В 1907 році Вільштеттер та Міг виділили каротин із висушеного листа кропиви та встановили його хімічний склад, який



відповідає формулі  $C_{40}H_{56}$ . Ними було встановлено, що ксантофіли являються окисленими формами каротиноїдів. Виявилося, що обидва пігменти інтенсивно поглинають кисень повітря (до 40 % своєї ваги) та швидко окислюються.

Подальше вивчення каротиноїдів пов'язане з російським ботаніком Цветом. В 1910 році Цвет запропонував розділяти жовті, оранжеві та червоні пігменти шляхом хроматографічної адсорбції; він же і запропонував загальну назву “каротиноїди”.

В 1913 році вченим Любименко був виділений попередник каротину — лікопін.

В 1919 році був встановлений зв'язок між жовтими рослинними пігментами (бета-каротином) та вітаміном А, а через 10 років доведено, що в організмі людини бета-каротин перетворюється у вітамін А, який не має кольору.

Карреру, який широко використовував хроматографічний метод Цвета, в 1930 році вдалося розділити ізомери каротину, отримані з моркви, та встановити їх структурні формули. В моркві знайшли три ізомери каротину ( $\alpha$ ,  $\beta$  та  $\gamma$ ), будову яких було встановлено Каррером.

Дослідження Куна (Германія), Каррера (Швейцарія) та Цихмейстера (Венгрія) охоплюють наступний етап вивчення каротиноїдів. Цей етап характеризується широким застосуванням хроматографічних методів для розділення каротиноїдів та адсорбційного спектрального аналізу для визначення їх структури.

В цей же самий час Цихмейстер сформулював уявлення про те, що в основі структури каротиноїдів знаходиться полієновий ланцюг подвійних зв'язків.

В 1930—1931 рр. Каррел виявив симетричність молекули лікопіну, бета-каротину та зеаксантину та довів, що молекула вітаміну А являється половиною молекули бета-каротину, тобто каротин являється провітаміном А.

До початку п'ятдесятих років кількість вивчених каротиноїдів зростає до 80, а структура 35 з них була точно встановлена.

З 1952 до 1971 року тривав третій етап дослідження каротиноїдів. Для цього етапу було характерне різке збільшення кількості досліджень структури каротиноїдів з використанням нових методів аналізу ІЧ — спектроскопії, ЯМР та дифракції рентгеновського випромінювання.

Було встановлено, що кисень у складі ксантофілів може утворювати не лише гідроксильні, але і кето- та епоксидні зв'язки; був виявлений новий клас арилкаротиноїдів, які містили ароматичні кільця на кінцях молекул.

В 1962 році в монографії Ціхмейстера були приведені структурні формули 150 каротиноїдів.

Подальше використання нових методів дослідження, включаючи коловий дихроїзм та дисперсію оптичного обертання, привело до виявлення  $C_{50}$  та  $C_{45}$  — каротиноїдів. Продовжували розвиватися і хроматографічні методи аналізу.

В монографії Іслера (1971 р.) вже були приведені формули 300 каротиноїдів.

Четвертий етап вивчення каротиноїдів почався в 1971 році. Значним досягненням цього періоду було подальше зростання кількості каротиноїдів з установленною структурою — наразі їх кількість досягла майже 1000. Саме в цей час були отримані

принципові дані при каротиноїди, вуглеводний скелет яких містить від 45 до 50 атомів вуглецю замість традиційно відомих 40.

Відкриті глікозидні каротиноїди, які містять цукровий залишок. Було також встановлено, що молекула каротиноїдів може включати жирні кислоти поряд з залишками цукридів (міксобактин та міксобактон).

Велику зацікавленість, з точки зору хімічної будови, викликають каротиноїди, що містять менше 40 атомів вуглецю.

Останнім часом значну увагу приділяють каротиноїдам вищих еукаріот, особливо тваринним. Було встановлено, що жовте та червоне забарвлення риб обумовлене ксантофілами — астаксантином, лютеїном та тараксантином.

Особливий інтерес викликають специфічні для риб каротиноїди тунаксантин та хірілвіксантин, які утворюються в організмі риб із бета-каротину.

До 80-х років минулого сторіччя були детально вивчені каротиноїди птахів та метаболізм цих пігментів.

Було встановлено, що в організмі птахів накопичуються, в основному, ксантофіли, а каротин присутній лише в ретині.

Харчова цінність птахів збільшується, якщо в їх харчовому раціоні присутній лютеїн та зеаксантин, які накопичуються в яйцях поряд з кантаксантином та астаксантином, що потрапляють в організм птахів, якщо в якості харчових добавок використовують м'ясо креветок.

Одним із найбільших досягнень в хімії каротиноїдів було встановлення того факту, що добре відомі каротиноїди представлені у птахів, риб та комах їхніми хіральними епімерами, а також

виявлення біосинтетичного шляху перетворення в організмах вищих еукаріотів каротиноїдів, які містяться в їжі, в епімерні форми.

Третім значним досягненням цього періоду був доказ того, що ксантофіли, які являються попередниками вітаміну *A* у ссавців, проявляють у нищих тварин вітамінну активність, тому що відбувається їх перетворення в бета-каротин, який в подальшому метаболізується у вітамін *A*.

## 4.2. Біологічні продуценти каротиноїдів

Бета-каротин та інші каротиноїди — це рослинні пігменти. На сьогоднішній день їх відкрито близько 1000, 50 з них мають активність провітаміну *A*. Каротиноїди виробляються рослинами та мікроорганізмами (водорості, гриби, бактерії). Саме каротиноїди обумовлюють забарвлення багатьох овочів та фруктів, квітів, птахів, риб та молюсків.

Назва “каротин” походить від латинської назви “*Carota*” (морква), з якої він вперше був виділений. Каротин являється супутнім пігментом до хлорофілу, тому в значних кількостях знаходиться в зелених рослинах, а також в помідорах, помаранчах, гарбузах, абрикосах, манго, грейпфруктах, шпинаті, червоному перці та в інших овочах та фруктах. Так, наприклад, вміст каротиноїдів (мг/100 г) в деяких овочах та фруктах становить: капуста — 1; перець болгарський — 10; петрушка — 2,5-3,2; кропива — 10; шпинат — 2,8; кріп — 4,6; цибуля — 1,7; морква — 9; абрикоси — 2; яблука — 0,1.

Отриманий разом з рослиною їжою каротин депонується в організм людини та тварини, перш за все, в печінці, жовтому тілі, у птахів накопичується у жовтку яєць, у ссавців надходить до молока, відкладається в тканинах організму.

Так, наприклад, свиняча печінка містить каротину (мг/100 г): — 12,0; риб'ячий жир — 38,0; м'ясо (різне) — близько 0,04; масло вершкове — 1,2.

Присутність каротиноїдів в квітах покритонасінневих може надавати їм жовто-гарячого забарвлення (*Calendula, Lileum*).

Сумісна присутність каротиноїдів та ціанідів може надавати квітам яскраво-червоного забарвлення (*Tulipa*). Саме присутність каротиноїдів та фенольних сполук обумовлює різнобарвну палітру забарвлення більшості квітів.

Джерелом каротиноїдів, яке здавна використовувалося людиною, було також рослинне насіння, зокрема насіння кукурудзи (*Zea maiz*), тропічного дерева *Bixa orellana*, перцю (*Capricum annum*), мексиканської рослини *Tageles tenuifolia*, яку широко культивують як кормову культуру для вітамінізації кормів для птиці. Каротиноїди разом з іншими пігментами (флавонами, антоціанами, меланінами та меланоїдінами) приймають участь в забарвленні насіння.

В фотосинтезуючих тканинах вищих рослин, як правило, накопичуються одні і ті ж самі каротиноїди — бета-каротин, лютеїн, віолоксантин, неоксантин, які локалізуються в хлоропластах поряд з хлорофілом.

В нефотосинтезуючих частинах рослини (квітах, плодах, насінні) накопичується переважно лікопін, бета-каротин, альфа-каротин, каротиноїдні епоксиди та гідроксипохідні.

Мікроорганізми також активно синтезують бета-каротин.

В 1961 році із епіфітної мікрофлори жита був виділений активний біосинтетик бета-каротину *Mycobacterium pheii*.

Крім *Mycobacterium pheii* відомий також цілий ряд мікобактерій, активно синтезуючих каротиноїди. Це, перш за все, *Mycobacterium stegmatis*, *Mycobacterium lacticum*, *Mycobacterium brevicali*. Активними біосинтетиками каротиноїдів також являються бактерії видів *Mycrococcus glutamicus*, *Mortirela rommaniana*, *Mycrococcus roseum*, бактерії роду *Pseudomonas*, фітопатогенні мікоплазми сімейства *Mycoplasmataceae* та *Acholeplasmataceae*, актиноміцети помаранчевої групи, проактиноміцети, корінеформні бактерії та дріжджі: *Actinomyces aureomonopodiales*, *Actinomyces aur coverticillatus*, *Actinomyces chryzomallus*, *Streptomyces medilary*, *Corinebacterium poinsetiae* та ін.

Каротиноїди продукуються також дріжджами роду *Rhodotorulla*, *Sporobolomyces* (*R. flava*, *R. glutinis*, *R. rubra*, *Sp. roseus*) та ін.

Каротиноїди містяться в хлоропластах водоростей *Euglena*, *Ulva*, *Cyanophyta*, *Chlorella*, *Sconodesmus*, *Dunaliella salina* та ін.

Водорість *Dunaliella salina* використовується в країнах з теплим кліматом та тривалим періодом інтенсивної сонячної активності (Австралії, Ізраїлі, США) для отримання каротиновмісної біомаси, каротиноїдних паст та інших комерційних продуктів. Вихід бета-каротину з використанням цієї водорості сягає 14 % (у перерахунку на абсолютно суху біомасу). Водорість вирощують у великих водоймищах, поблизу солоних озер в місцях з високою сонячною активністю. Для збагачення водорості кароти-

ном використовують дуже цікавий захід — різко збільшують концентрацію солі у воді.

Біомаса дуналієли містить (в 1 кг) до 30 г каротину, 400 г гліцерину, велику кількість білку. Вченими ВНДІ біотехніка (Москва) на основі біомаси *Dunaliella salina* були відпрацьовані технології виробництва вітамінних концентратів з різним вмістом каротиноїдів (80 мг/г; 200 ? 250 мг/г біомаси).

Перспективним джерелом каротиноїдів може бути й інша водорість — спіруліна; вміст каротиноїдів в біомасі цієї водорості складає 300—600 мг %.

Але до початку 60-х років вчені прийшли до висновку, що всі ці бактерії, водорості та гриби не можуть бути використаними в промислових ферментаційних процесах з причини низької швидкості та продуктивності біосинтезу бета-каротину.

Найбільш продуктивним продуцентом бета-каротину являється муковий гриб *Blakeslea trispora* (*Choanephora trispora*) класу *Phycomycetes*. Звичайно, й інші гриби роду *Choanephoraceae* (*Ch. cucurbitarum*, *Ch. circinans*, *Ch. heterospora*, *Ch. infudibulifera*) здатні синтезувати каротиноїди, особливо при сумісному вирощуванні “плюс” та “мінус” форм в аерованій культурі та на сприятливому середовищі живлення. Для грибів цього роду суттєву роль в продукції каротиноїдів відіграють статеві гормони — триспорові кислоти.

Вперше бісексуальність в нищих грибів була відкрита в 1904 році англійським вченим Блекслі, який вивчав умови утворення зигоспор у *Rhizopus nigricans*, а пізніше — у інших грибів; саме Блекслі ввів термін “гетероталлізм”.

В 1956 році вперше були отримані натуральні каротиноїди (бета-каротин, лікопін та ксантофіл) ферментативним шляхом з використанням мукових грибів сімейства *Choanephora*.

Вперше на ці мікроорганізми, як продуценти каротиноїдів, звернув увагу англійський вчений Барнет (1956 р.), пізніше — американський дослідник Циглер (1965 р.), радянські вчені В.Д. Кузнєцов (1966 р.), М.Н. Бехтерева (1969 р.), Г.К. Скрябін (1966 р.).

Деякими дослідниками (Циглер, Є.М. Вакулова, С.М. Бобнева та ін.) були вказані спеціальні умови вирощування мукових каротинсинтезуючих грибів, зокрема *Blakeslea trispora*, методом глибинного культивування при певних співвідношеннях міцелію різних статевих форм. Було виявлено, що введення в культуральну рідину або в живильне середовище для ферментації альфа- та бета-іононів або інших терпеноїдів значно стимулює біосинтез бета-каротину. А використання антиоксидантів, таких як інол, сантохін, агідол та ін., попереджає процеси перекисного окислення каротиноїдів при висушуванні та зберіганні каротиномісткої біомаси.

Подальші дослідження були направлені на модифікацію живильних середовищ та на зменшення взаємозалежності різних статевих форм гриба під час біосинтезу каротиноїдів.

Великим плюсом технології з використанням нищого грибу *Blakeslea trispora* було те, що в процесі ферментації він накопичує велику кількість біомаси а також те, що цей гриб може рости на дешевих субстратах.

Для біосинтезу каротиноїдів використовуються як спори, так і вегетативний міцелій “плюс” та “мінус” статевих форм гетероталічного грибу *Blakeslea trispora*.



Вегетативний міцелій цього грибу складається із ниткоподібних гіфів діаметром від 2 до 20  $\mu$ ; гіфи деяких із штамів цього грибу мають дрібні лопастні вирости або здуття та незабарвлену оболонку. Вміст протопласту молодих гіфів гомогенний із слабкою базофілією; з часом при старінні міцелію в них можуть з'являтися вакуолі та безбарвні або золотаво-оранжеві (різні за інтенсивністю забарвлення) ліпідні включення, а при сумісному вирощуванні “плюс” та “мінус” форм — кристали каротину та його попередників. Безстатеве розмноження лише спорангіальне, представлене стілоспорангіями та спорангіями. На міцелії грибу можуть також утворюватися хламідоспори.

Статевий процес у *Blakeslea trispora* зигогамний (гаметогамний), при якому відбувається з'єднання (кон'югація) двох специфічних клітин — гаметангіїв одного або різних таломів і утворення зигоспори.

Дослідники, які працювали з нищими гетероталічними грибами, звернули увагу на той факт, що утворенню зигот звичайно передують поява яскраво-помаранчевої каротиновмісної смуги, розташованої в місці контакту міцеліїв різних статевих знаків. Це спостереження дозволило встановити корелятивний зв'язок між статевим процесом та каротиноутворенням у фікоміцетів. Взаємозалежність цих процесів була встановлена після того, як були виділені специфічні сполуки терпенової природи — триспорові кислоти, які, як вже зазначалося, являються статевими гормонами (прогормонами) і в декілька разів прискорюють біосинтез каротиноїдів, особливо “мінус” статевої форми.

Наразі виділено та вивчено три види триспорових кислот: А, В та С. Триспорові кислоти та вітамін А являються природни-

ми стимуляторами біосинтезу каротиноїдів у *Blakeslea trispora*. Ця стимуляція відбувається на рівні рибосом.

Незважаючи на потужний стимулюючий ефект триспорівих кислот на вихід бета-каротину, практичного значення цей феномен не отримав з причини високої вартості триспорівих кислот (ТСК) та їх значної нестабільності, хоча з використанням ТСК процес отримання бета-каротину міг би здійснюватися лише за допомогою (-) форми грибу.

Крім того, триспоріві кислоти за своєю хімічною природою близькі не лише до вітаміну А, але й до іншого неприродного стимулятора біосинтезу каротиноїдів — бета-іонону, який діє в середовищах, що містять рослинні олії, багаті на лінолеву кислоту.

Стимуляторами каротиноутворення також слугують деякі аміди, лактами, гідразини, заміщені піридини, зокрема сукцинамід, який здатний майже втричі збільшувати кількість каротиноїдів при сумісному культивуванні (+) та (-) штамів грибу *Blakeslea trispora*.

Ці сполуки діють як стрес-фактори, порушуючи гомеостаз, в результаті цього відбувається інтенсифікація синтезу вторинних метаболітів, зокрема бета-каротину та лікопіну.

Спершу для біосинтезу бета-каротину використовували американські штами RR $\alpha$  9159 (-), RR $\alpha$  9216 (-), французькі штами RR $\alpha$  2456 (+), RR $\alpha$  2457 (+), польські RR $\alpha$  2869 (-) (Пазола, 1967). Пізніше були отримані шляхом селекції російські штами гриба *Blakeslea trispora* (+) 4 та (-) 5 (Скрябін Г.К., 1966), 701,811 (Бехтерева М.Н., Дедюхіна Г.І.), (+) 64; (-) 490; (+) 8А, (-) 8А (Агєєва Г.К.), К<sub>1</sub> ( $\pm$ ), К<sub>3</sub> ( $\pm$ ) (Стенько А.С. із співавторами), ВСБ — 129 (+); ВСБ — 130 (-).

## 4.3. Особливості сучасної технології промислового вирощування

### 4.3.1. Характеристика сировини

Промислове виробництво каротиноїдів шляхом мікробіологічного синтезу в нашій країні було налагоджено в 60-і роки минулого сторіччя завдяки працям таких вчених, як Г.І. Самохвалов, М.Н. Бехтерева, А.А. Імшенецький та ін.

Недоліком перших технологій біосинтезу бета-каротину було використання дефіцитної або дорогої харчової сировини. Спочатку для культивування грибу *Blakeslea trispora* використовували в'язкі та збагачені рослинними оліями та поверхнево-активними речовинами субстрати. Потім на ранніх стадіях біосинтезу в ферментері в ці середовища почали вводити стимулятори та стабілізатори каротиногенезу: альфа- та бета-іонони, сантохін. Звичайно, ці середовища містили 1—8 % рослинних олій або тваринних жирів, які частково або повністю заміняли на більш дешеву сировину — відходи миловареної, парфюмерної, молочної та олієжирової промисловості, такі як соапсток, погони дезодорації рослинних олій, соняшниковий, бавовняний та інші види шроту, терпеноїди, мікробний жир, молочну сироватку.

Наразі сировиною для біосинтезу бета-каротину являється харчова сировина (кукурудзяна та соєва мука, рослинні олії), відходи крохмалепаточного виробництва (патока кукурудзяна зелена, рідкий кукурудзяний екстракт), мінеральні солі (калій дигідрофосфат) та вітаміни (тіаміну хлорид).

### 4.3.2. Особливості технології

Промислове виробництво мікробіологічного бета-каротину та лікопіну здійснюється методом зануреного культивування в періодичному режимі вирощування. Технологічний процес починається із стадії вирощування відокремлених (+) та (–) статевих форм гриба *Bl. trispora* в пробірках із скошеним суловим агаром протягом семи діб (за умови відсутності світла протягом перших п'яти діб культивування).

На наступному етапі технологічного процесу культуру, вирощену в пробірках, пересівають в рідке середовище Андерсона (1954), розлите в колби Ерленмейера на 800 см<sup>3</sup> (із 100—150 см<sup>3</sup> поживного середовища). Вирощування інокуляту в колбах здійснюється при інтенсивному перемішуванні (180—200 обертів/хв) культуральної рідини в колбах протягом 28—56 год. Джерелом редукувальних речовин в середовищі для маточної культури слугує кукурудзяна мука (4,7 % заг. об.), яка містить вуглеводи у вигляді молекул амілози та амілопектину.

При кислотному або ферментативному гідролізі розгалужених молекул амілози та амілопектину утворюються моноцукриди глюкоза, мальтоза та продукти неповного гідролізу крохмалю, які в надлишковій кількості присутні в поживному субстраті.

Соева мука (2,3 % заг. об.) містить амінокислоти та білки, зв'язані дисульфідними зв'язками. Під час вирощування культури гриба в колбах споживається менш ніж 60 % амінокислот, решта залишається неутілізованою. Дослідження показали, що продуцент не проявляє ауксотрофності за окремими амінокисло-

там і здатний самостійно синтезувати майже всі амінокислоти, відповідно до своїх потреб.

Середовище для вирощування маточної культури гриба-продуцента збагачують дигідрофосфатом калію та вітаміном В<sub>1</sub>.

Вітамін В<sub>1</sub> сприяє зростанню біомаси в 1,1—1,5 рази в широкому діапазоні концентрацій ( $1 \cdot 10^3$ — $1 \cdot 10^7$  мкг/дм<sup>3</sup>). Крім цього, він позитивно впливає на синтез каротиноїдів — при концентрації тіамінхлориду  $2 \cdot 10^4$  мкг/дм<sup>3</sup> поживного середовища вихід каротиноїдів зростає на 5—10 %.

Поживне середовище для маточної культури містить 110—250 мкг/см<sup>3</sup> неорганічного фосфору. Основним джерелом фосфору в середовищі слугує соєва мука, яка містить 40—60 мкг/см<sup>3</sup> неорганічного фосфору та дигідрофосфат калію, який міститься у середовищі в концентрації 0,5 г/дм<sup>3</sup>.

При вирощуванні *Bl. trispora* в колбах споживається 40—70 % фосфору субстрату.

Наступна стадія розвитку гриба *Bl. trispora* здійснюється в посівних апаратах ємністю 2 м<sup>3</sup>.

Різні статеві форми гриба вирощуються в посівних апаратах окремо при постійному перемішуванні культуральної рідини протягом 44—50 год.

Під час інокуляції гриба в посівних апаратах відбувається зростання кількості біомаси до 7—20 г/дм<sup>3</sup>.

Мікроорганізм-продуцент каротиноїдів *Bl. trispora* дуже чутливий до впливу температури та до інфекції, тому на всіх стадіях технологічного процесу намагаються підтримувати постійну температуру ( $28 \pm 1$ ) °С та стерильність.

Вирощування інокуляту в посівних апаратах та подальша ферментація в ферментерах здійснюється на уніфікованому середовищі, яке містить дешеві відходи крохмалепатокового виробництва — зелену кукурудзяну патоку та кукурудзяний екстракт (джерело фосфору, вітамінів, азоту). В середовищі для ферментації, окрім цих компонентів, також міститься близько 2,0 % рослинної олії, яка необхідна для каротиноутворення.

В поживних середовищах для інокуляції та ферментації повинно міститися близько 85—90 мг % амінного азоту та близько 1,0 % редукувальних цукрів; рН середовища після стерилізації повинно становити 5,9—6,3 .

Склад поживного середовища для посівних апаратів підібраний таким чином, щоб не відбувалося лімітування гриба-продуцента за поживними речовинами — як показали дослідження, ріст грибу та накопичення біомаси відбувається значно краще на багатих середовищах, що містять певні надлишки амінного азоту та фосфору (відповідно на 20—30 % та на 50—60 %) і не обмежені за редукувальними речовинами.

Зелена патока містить, в основному глюкозу, дицукриди, продукти неповного розпаду крохмалю, меланоїдіни.

Як свідчать дослідження, глюкоза та мальтоза являються найкращими цукрами для синтезу біомаси, але надлишок певних цукрів (особливо глюкози) може негативно впливати на синтез вторинного метаболіту — бета-каротину. Мальтоза, навпаки, не інгібує каротиноутворення. Спирти (манніт, сорбіт, інозит, дульцит) а також рамноза (дезоксичукор) та арабіноза (пентоза) асимілюються грибом значно гірше, тому накопичення біомаси на цих субстратах незначне.

Наступна стадія технологічного процесу — ферментація, відбувається в ферментерах ємністю 10 м<sup>3</sup>. Коефіцієнт заповнення ферментерів поживним середовищем — 0,6. Склад середовища для ферментації практично не відрізняється від складу середовища в посівних апаратах за вмістом азоту, фосфору та рН, однак це середовище, на відміну від середовища в посівних апаратах, збагачене жирними кислотами (рослинною олією), стимуляторами та стабілізаторами каротиноутворення.

Біосинтез каротиноїдів відбувається за загальною схемою синтезу ліпідів ізопреноїдної (терпенової) групи, тому склад жирних кислот рослинних олій, які використовуються для біосинтезу, має суттєве значення. Стимулюючий вплив на каротиноутворення мають ненасичені жирні кислоти — лінолева, олеїнова, ліноленова, характерні для соєвої, соняшникової, кукурудзяної та інших видів олій.

Ліпідоутворення у муковорих грибів роду *Choanephoraceae* відбувається у дві стадії. Під час першої стадії в грибних клітинах спостерігається значне зростання структурних та цитоплазматичних білків (до 40 %) та відносно незначний синтез ліпідів (до 5—7 %). В цей період гриб має найбільш високу питому швидкість росту; серед ліпідів, які синтезуються грибом, переважають полярні ліпіди, які складають близько 50—55 % від загальної кількості ліпідів. Під час другої фази відбувається уповільнення ростових процесів та інтенсивне накопичення ліпідів: фосфоліпідів (фосфатидилхоліну, фосфатидилінозиту, фосфатидилсеріну, фосфатидилетаноламіну) та олеїнової кислоти. У складі ліпідів молодого міцелію переважають полярні ліпіди, що містять дієнові та трієнові кислоти (лінолеву та ліноленову), мають антиоксидан-

тну активність та максимальне йодне число. При старінні міцелію відбувається накопичення олеїнової кислоти, збільшення мікров'язкості ліпідів та інтенсифікація процесів вільнорадикального окислення ліпідів.

Екзоліпазна активність грибу досягає максимального значення на 30 та на 80—95 годинах ферментації. Другий пік екзоліпазної активності може спостерігатися на 80—95 годинах. Він пов'язаний із зростанням жирності біомаси за рахунок власного ліпогенезу. Звичайно, при скороченні тривалості процесу ферментації до 60—70 годин та при відсутності ліпідних підживлень на 35—47 годин ферментації другий пік екзоліпазної активності не спостерігається.

Поживне середовище для ферментації містить 90—125 мг % амінного азоту, джерелом якого являється рідкий кукурудзяний екстракт. Під час ферментації споживається лише 65—70 % амінного азоту, який міститься в середовищі. Однак практика показує, що каротиноутворення мукоровим грибом *Bl. trispora* відбувається більш ефективно, якщо вміст амінного азоту в поживному середовищі не нижче 70 мг %. Встановлений прямий корелятивний зв'язок ( $R = 32\%$ ) між початковою концентрацією амінного азоту в поживному середовищі та каротиногенезом. Ці дані свідчать про те, що поживне середовище дефіцитне за певними амінокислотами, однак очевидно, що процес лімітується не азотом, а іншими компонентами, які містяться в екстракті — біотином, карнітином, рутином, мікроелементами.

Деякі технологічні процеси отримання каротиноїдів передбачають використання в складі поживних середовищ недефіцитних джерел азотного харчування, зокрема неорганічних форм



азоту: нітратів, солей амонію, нітритів, карбамідів. Особливо перспективним джерелом азотного харчування являються солі амонію (хлорид, сульфат) та сечовина.

Джерелом вуглеводів в поживному середовищі для біосинтезу каротиноїдів слугує зелена кукурудзяна патока, гідрол, глюкоза та ін. Кількість редукувальних речовин в середовищі для ферментації повинно становити 0,9—1,2 %. Редукувальні речовини швидко утилізуються мікроорганізмом вже під час трофофази (до 70 %), яка триває до 27—30 год ферментації; протягом ідіофази споживається решта цукрів.

При збільшенні концентрації глюкози в середовищі для ферментації понад 1,2 % спостерігається глюкозна репресія каротиногенезу. Концентрація глюкози понад 1,7 % статистично достовірно пригноблює каротиноутворення, але позитивно корелює з виходом біомаси (в діапазоні 0,9—2,7 %).

Оптимальне значення рН поживного середовища для ферментації 5,9—6,4.

Збільшення рН поживного середовища понад 6,4 приводить до зниження інтенсивності біосинтезу каротиноїдів. Крива рН під час біосинтезу має складний характер. На початку біосинтезу (протягом перших декількох годин ферментації) рН культуральної рідини знижується на 0,1—0,3, а після 15—20 годин вирощування починає знову зростати, поступово досягаючи до 36 годин початкового рівня кислотності. До кінця ферментації відбувається плавне зростання рН культуральної рідини до 6,7—7,1.

Закислення середовища в перші години ферментації пояснюється накопиченням органічних кислот, особливо пірвіноградної.

Зростання значення рН культуральної рідини до кінця ферментації пов'язане з виділенням лужних речовин, в тому числі аміаку, в результаті процесів автолізу.

Під час ферментації здійснюють постійне перемішування культуральної рідини та подачу стерильного повітря. Витрату повітря в ферментері постійно збільшують з 450 м<sup>3</sup>/год (в перші 24 год.) до 650—800 м<sup>3</sup>/год (до кінця ферментації). Тривалість ферментації становить 60—96 год.

Після цього культуральну рідину інактивують нагріванням при температурі (75±5) °С протягом 10 хв., фільтрують через рамний фільтр-прес та направляють до сушарки.

Каротиноїди являються термолабільними речовинами. Щоб зменшити руйнування провітаміну під час висушування в сушарці в поживне середовище до початку ферментації та в культуральну рідину перед фільтрацією вводять антиоксиданти (іоноли, агідоли, сантохін, бутилоксианізол та ін.). Висушування каротиновмісткої біомаси здійснюють в вакуум-гребковій роторній сушарці протягом 5—8 годин при температурі 50—60 °С. За період висушування відбувається зміна вологості біомаси з 65—70 % до 6—7 %.

Каротиновмістку біомасу використовують у складі преміксів та комбікормів для сільськогосподарських тварин та птиці та як сировину для отримання олійних екстрактів каротиноїдів та кристалічних препаратів бета-каротину.

Каротиновмістка біомаса являється порошком від помаранчево-червоного до червоно-брунатного кольору із специфічним запахом, біомаса нерозчинна у воді.

Біомаса містить не менше 1 % бета-каротину (у перерахунку на суху речовину), піридоксин (вітамін В<sub>6</sub>) — 50—85 мкг/г, фолієву кислоту (вітамін В<sub>9</sub>) — 90—200 мкг/г та ін. Препарат в організмі тварин нормалізує мінеральний обмін, покращує обмін нуклеїнових кислот і синтез білку, сприяє утворенню всіх ферментних елементів крові, підвищує імунний статус, стимулює функцію статевих залоз і збільшує ефект запліднення тварин. Для підвищення біологічної цінності раціонів сільськогосподарських тварин та птахів, стимуляції продуктивних і відтворювальних функцій вітатон застосовують з кормом в дозі 70—150 кг препарату на 1 т преміксу, або 700—1500 г на 1 т комбікорму.

#### **4.4. Загальні тенденції розвитку виробництв каротиноїдних препаратів**

Наразі попит на каротиноїдні препарати різко збільшився у зв'язку із зростанням зацікавленості людей до здорового способу життя. Середній рівень споживання бета-каротину в країнах Заходу становить близько 3 мг/добу, в США — до 1,5 мг/добу. В Японії та інших регіонах з низьким рівнем ризику, головним джерелом каротиноїдів являються рослини, тоді як в США та в Європі — тваринні жири.

Із всіх відомих каротиноїдів лише п'ять видів каротиноїдів отримують в промислових масштабах: бета-каротин, ксантаксантин, етил- $\beta$ -апо-8-каротиноат, бета-апо-8-каротиналь, гідроксантин, тому, що із всього різномаїття каротиноїдів лише 20 мають провітамінну активність. Звичайно, основним каротиноїдом явля-

ється бета-каротин. Однак, слід відзначити, що з кінця 80-х років з'явився попит і на інші каротиноїди: лютеїн, зеаксантин, кантаксантин, родоксантин, астаксантин, однак поки що економічно вигідних біотехнологій їх отримання ще не створено.

В промисловості на сьогоднішній день відпрацьовано три способи виробництва бета-каротину.

По-перше, це екстракція із природних джерел. Каротиноїди отримують із рослинних матеріалів, таких як морква або пальмова олія. Це дуже вартісний процес і бета-каротин, отриманий цим шляхом, коштує досить дорого. Вміст бета-каротину в готовому продукті становить близько 60 %; альфа-каротину — 34 %, інших каротиноїдів — близько 6 %. Отримання бета-каротину із рослинних матеріалів пов'язане із певними труднощами, обумовленими сезонністю заготівлі та строками зберігання овочів, а головне — з необхідністю виділяти посівні площі під каротиносинтезуючу культуру.

Іншим способом отримання каротиноїдів являється хімічний синтез.

Виробництво бета-каротину синтетичним шляхом стало можливим завдяки дослідженням в галузі біосинтезу вітаміну А та завдяки вивченню закономірностей хімії полієнових сполук. В 1960 році Каррер та Інхоффен відпрацювали метод синтезу вітаміну А і, цим самим, забезпечили можливість хімічного синтезу каротиноїдів. Однак доведення молекули синтетичного бета-каротину до активної форми потребує значних матеріальних витрат. Сировиною для виробництва синтетичного бета-каротину являються продукти нафтохімії: ацетон, ізобутилен, циклогексан, ацетилен та ін.

Третій спосіб промислового виробництва бета-каротину — це біосинтез за допомогою мікроорганізмів: грибів, водоростей. Біосинтез за допомогою мікроорганізмів — найбільш перспективний шлях отримання каротиноїдів.

Наразі проводяться роботи, направлені на зменшення вартості препаратів каротиноїдів, отриманих мікробіологічним шляхом. Це досягається використанням методів генної інженерії. Генноінженерні роботи здійснюються в двох напрямках:

1) гени, відповідальні за синтез ферментів біосинтезу певного каротиноїду, намагаються клонувати та експресувати в організми, здатні швидко рости на екологічно чистих та дешевих середовищах;

2) шляхи біосинтезу намагаються змінити в батьківському організмі таким чином, щоб перетворити його в надсинтетика каротиноїдів.

Однак в обох випадках успіху перешкоджає відсутність точних відомостей про ферменти, які приймають участь у біосинтезі певних каротиноїдів.

Можливо, гени можуть бути виділені шляхом подрібнення великих шматків ДНК; успіху може сприяти компактне розміщення генів, що кодують біосинтез каротиноїдів, у вигляді кластеру.

Аналогічні дослідження проводяться з *Ervinia herbicola*, але поки що ці роботи знаходяться на стадії академічних розробок і важко передбачити чи досягнуть вони біотехнологічного рівня.

Безумовно, розвитку робіт із генної інженерії буде сприяти посилення зацікавленості до цих пігментів як до медичних антиканцерогенних препаратів. Можна зпрогнозувати, що саме анти-

оксидантні властивості каротиноїдів будуть сприяти розвитку нових біотехнологій отримання цих унікальних полієнових сполук.

В плані сучасних біотехнологій отримання біологічно активних сполук лідерна роль, без сумніву, буде належати міцеліальним грибам.

Ці еукаріотичні організми, здатні накопичувати значну кількість біомаси, можуть використовувати “нетехнологічну” сировину — целюлозу та лігнін, здатні синтезувати до 96 % біологічно активних сполук, які використовуються людиною і в тому числі, понад 3 г/дм<sup>3</sup> каротиноїдів.

Серед нових напрямків біотехнології каротиноїдних сполук слід зазначити головні:

1. Інтенсифікація біосинтезу бета-каротину у *Blakeslea trispora* зеленим світлом (1,7 В/м<sup>2</sup>) протягом 48 годин, — світло використовується не для освітлення ферментера, а для отримання спорового матеріалу, вирощеного при фотодії;

2. Блокування на певній стадії шляху біосинтезу бета-каротину за допомогою певних сполук з метою отримання попередника бета-каротину — лікопіну.

3. Отримання поряд з каротиноїдами біологічно активних сполук убіхінонової природи: коензиму Q та ін.

Таким чином, майбутнє в технології отримання каротиноїдів за муковими грибами, тому що саме вони здатні синтезувати висококонцентровані препарати біологічно активних сполук, які мають антимуtagenну та імуномодельючу активність та радіопротекторну дію.

## Контрольні запитання

1. Яку роль відіграють каротиноїди в мікроорганізмах, рослинах, тваринах?
2. Охарактеризуйте основні каротиносинтезуючі мікроорганізми.
3. В чому переваги та недоліки основних біосинтетиків каротиноїдів — водорості *Dunaliella salina* та мукорового грибу *Blakeslea trispora*?
4. Яку роль відіграють триспорові кислоти в біосинтезі каротиноїдів?
5. Які хімічні сполуки здатні відігравати роль стимуляторів каротиногенезу?
6. В чому полягає механізм дії природних стимуляторів каротиногенезу?
7. Які компоненти використовувалися раніше та використовуються наразі в якості сировини в процесі мікробіологічного синтезу каротиноїдів?
8. Охарактеризуйте основні стадії промислової біотехнології виробництва каротиноїдів за допомогою мукорового грибу *Blakeslea trispora*.
9. Які вимоги пред'являються до поживних середовищ для біосинтезу каротиноїдів на різних стадіях культивування?
10. В чому виражається і на чому ґрунтується стимулюючий ефект іонів, жирних кислот, ізопреноїдних сполук?
11. Яку роль відіграють антиоксиданти, які вводять до культуральної рідини та каротиновмісткої біомаси?

12. Як змінюються потреби у кисні та в поживних речовинах у *Blakeslea trispora* на різних стадіях промислового культивування?

13. Які вимоги висуваються до мікробіологічних препаратів каротиноїдів кормового, харчового та медичного призначення?

## **Глава 5.      ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН**

Сільське господарство являється одною із найбільш активних сфер застосування біотехнологій. В умовах ринкової економіки їх використання надає конкурентних переваг компаніям та агрофірмам.

Нині сільськогосподарський та харчовий сектор біотехнології — один із найбільш перспективних та найкраще інвестованих сегментів світової економіки — він оцінюється в \$ 45 млрд. Крім того, до агробіотехнології відносять виробництво посівного матеріалу модифікованих рослин, об'єм продажу яких оцінюється в \$ 30 млрд. на рік.

Дещо інша ситуація спостерігається на вітчизняних підприємствах АПК.

Агропромисловий комплекс України використовує такі біопрепарати, як амінокислота лізин, мікрокапсульовані, гранульовані та сипкі препарати вітамінів (бета-каротину, вітамінів В<sub>2</sub>, В<sub>12</sub> тощо), білково-вітамінні концентрати та ін. Але лише незначну частку цього ринку становить вітчизняна продукція.



Тому імпортозаміщення — це найбільш перспективний шлях використання біотехнологій для сільського господарства, адже цей ринок дуже великий і постійно зростає. Актуальною являється також задача поліпшення якості вітчизняних біопрепаратів для сільського господарства, вироблення цих препаратів у зручній для використання товарній формі, адже саме таким чином можна витіснити імпортні біотехнологічні препарати з вітчизняного ринку.

Аналогічна ситуація склалася і на російському ринку агробіопрепаратів. Так, за даними звітів російської компанії “Abercade Consulting”, близько 95 % споживання біотехнологічних розробок у тваринництві припадає на західні препарати. В Росії ж виробництво біотехнологічних препаратів здійснює лише Богдановічський комбікормовий завод. Так що західні препарати не мають ніякої конкуренції з боку російських підприємств.

Аналогічна ситуація склалася і в рослинництві. За даними маркетингового дослідження компанії “Abercade Consulting”, проведеного для компанії АТ “Біохімаш”, приблизно 75 % об’ємів споживання біотехнологічних розробок для рослинництва припадає на західні препарати. Основними їх споживачами являються крупні агропромислові комплекси. Решта 25 % припадає на російські препарати, споживачами яких являються невеликі агрофірми.

За експериментними оцінками, проведеними російськими вченими, об’єм споживання біотехнологічних препаратів для сільського господарства в найближчій перспективі будуть неухильно зростати.

Деякі господарства надають перевагу препаратам імпортного виробництва, тому що вітчизняні препарати не відповідають сучасним вимогам. Так, наприклад, деякі російські зернові компанії, що застосовують лізин у виробництві комбікормів, вимушені купувати імпортний лізин за ціною близько \$ 2000—2500 за 1 тону, тому що вважають якість російських препаратів незадовільною. Мінімальний об'єм споживання лізину в Росії оцінюється в 4000 тон на рік.

Останні досягнення в сфері біотехнології дозволяють застосувати широкий спектр методів в різних галузях агровиробництва. Зокрема, шляхом інтегрування в геном тварин певних генів можна отримати суттєвий приріст біомаси або підвищити стійкість до широкого спектру хворіб. У випадку із рослинами генноінженерним шляхом можна досягти значного зростання стійкості до несприятливих умов середовища або підвищити їх врожайність.

У тваринництві використання біотехнологій розподіляються на два основні напрямки, які можна назвати “селекцією” та “ветеринарією”:

1. Селекція. Створення нових порід тварин, здатних давати продукти із підвищеним вмістом деяких компонентів або невластивих для цих тварин компонентів, також суттєвим являється створення трансгенних тварин, які можуть бути донорами при трансплантації органів людини.

2. Ветеринарія. Профілактика захворювань тварин, розробка лікарських препаратів для тварин (в тому числі і вакцин), а також жорсткий контроль за якістю продукції тваринництва.

В рослинництві немає такого поділу як у тваринництві, однак цілі та підходи, які використовуються, приблизно такі ж самі.

Останнім часом широкої популярності набув напрямок створення трансгенних рослин. Незважаючи на це, до цього часу суттєвий внесок в отримання нових сортів рослин вносять традиційні напрямки селекції. Основні напрямки розвитку селекції рослин:

1) Отримання сортів сільськогосподарських культур з більш високою врожайністю;

2) Отримання сільськогосподарських культур, які приносять по декілька врожаїв за рік (реманентні сорти, які дають по декілька врожаїв за рік або сезон);

3) Отримання сортів сільськогосподарських рослин, що мають високу стійкість до несприятливих кліматичних умов.

Одним із пріоритетних напрямків агробіотехнології являється створення біоінсектицидів, що мають високоселективну дію, тобто діють лише на певні види комах — шкідників та абсолютно безпечні для корисних комах (наприклад, для бджіл).

Деякі генетично обумовлені ознаки — такі як інсектицидна активність, стійкість проти вірусних захворювань та гербіцидів, уповільнення старіння, стійкість до несприятливих умов навколишнього середовища, зміна забарвлення квітів, підвищення харчової цінності насіння та самонесумістність — можуть бути притаманні рослинам при введенні в їх геном одного або декількох генів. Наразі уже отримані багаточисельні трансгенні рослини на основі як культурних, так і диких видів. Найбільша увага, звичайно ж, приділяється при цьому 29 основним культурним видам рослин, які харчують людство, зокрема таким зерновим культурам, як кукурудза, пшениця, рис. Також були здійснені програми із схрещування і інших сільськогосподарських та зернових культур.

*Першу трансгенну рослину було отримано в 1983 році в Інституті рослинництва в Кельні.*

*В 1992 році в Китаї почали вирощувати трансгенний табак, який не пошкоджувався комахами-шкідниками. А в 1994 році в Америці на прилавках супермаркетів з'явився перший модифікований томат, який не боявся транспортування та довго зберігав свій товарний вигляд — ці помідори мають сповільнене дозрівання. Наступним дивом біоінженерінгу стала картопля, яку не здатний їсти колорадський жук — в геном картоплі вмонтовано ген білка, який виробляється однією ґрунтовою бактерією. Цей білок відомий вже близько 45 років. Він абсолютно безпечний для людини. Білок “блокує” систему травлення комах.*

*На сьогоднішній день вже створено близько 120 видів генетично змінених рослин — соя, кукурудза, рис, гарбузи, огірки, перець, диня та ін.*

*Деякі із цих культур в промислових масштабах вирощуються в США, Аргентині, Канаді, Австралії, Китаї, Мексиці, Іспанії, Франції, Південній Африці, Португалії та Румунії.*

*Якщо в 1996 році під посіви генетично модифікованих рослин було відведено близько 1,8 млн. га, то в 1999 році — вже близько 40 млн. га.*

*Сорти, отримані біотехнологічно, мають значно вищу врожайність, ніж звичайні сорти. Але, як і раніше, генетично модифіковані продукти становлять лише близько 1 % раціону людини (з них 99 % припадає на модифіковану сою).*

*На сьогоднішній день для використання в харчовому раціоні (але не для вирощування) в Російській Федерації дозволено 3 сорти сої, 4 сорти кукурудзи, 1 сорт цукрових буряків та 2 сор-*

ти картоплі. Це сорти американського походження, вони придатні для швидкої переробки.

На Україні, починаючи з 1988 року, українськими вченими із Інституту клітинної біології та генетичної інженерії сумісно з американською компанією American Cyanamid займаються створенням операційних систем, які здійснюють управління генами, та пошуком корисних генів у рослинній клітині.

Найбільш цікаві для генетиків групи генів: це гени корисних властивостей, наприклад, повноцінних харчових білків або ферментів, які лімітують етапи обміну, гени біораціональних пестицидів, гени інсектицидів, зацікавленність викликає сімейство хіт-глюканових (*heat-shock*) генів, які, як виявлено у 80-х роках, активізуються лише під час стресу, і гени, пов'язані з алелопатіями (природними гербіцидами).

Доля генетичних маніпуляцій залежить від того, наскільки успішними стануть способи регенерації однодольних рослин, до яких належать злаки та фуражні трави.

До цього часу не вдалося отримати серед злаків стійких рослин — регенерантів, життєздатних у ґрунті, незважаючи на те, що в культурі вже досягнуті деякі успіхи. До того ж не існує і векторів для однодольних рослин: вектори на основі Tі-плазмідів із *Agrobacterium tumefaciens* придатні лише для трансформації дводольних рослин.

Грамнегативна ґрунтова бактерія *Agrobacterium tumefaciens* — фітопатоген, який у процесі своєї життєдіяльності трансформує рослинні клітини. Ця трансформація призводить до утворення корончатого галу — пухлини, яка порушує нормальний ріст рослини. Цією хворобою, яка має серйозні агроно-

мічні наслідки, пошкоджується лише дводольні рослини, зокрема виноград, кісточкові фруктові дерева, троянди.

Утворення корончатого галу починається із проникнення, інтеграції в геном рослинної клітини та експресії специфічного сегменту бактеріальної плазмідної ДНК — Т-ДНК (від англ. *transferred DNA*). Т-ДНК — це ділянка плазмиди, яка індукує розвиток пухлини (*tumor-inducing plasmid*, Тi-плазмиди); її несуть більшість штамів *A. tumefaciens*.

Вперше Тi- плазміда була відкрита в 1974 році Дж. Шеєлем (Інститут Макса Планка, Кельн). Вчені виявили, що бактеріальні штами втрачають властивість індукувати утворення пухлин при 37 °С в результаті денатурації білків плазмід; цю властивість можна повернути штаму або за допомогою кон'югації або шляхом трансформації.

Було встановлено, що Т-ДНК Тi-плазмиди інтегрує в геном рослин, перетворюючи здорові клітини в пухлинні, здатні продукувати опініни. Шеєль встановив, що 5 генів плазмиди відповідають за пухлинне переродження клітин. За цими генами провели мутації, а Т-ДНК використали для перенесення інших генів, перш за все великих піф-генів, які продукують нітрогеназу.

Плазмиди *A. tumefaciens* також використовувалися в якості векторів для перенесення генів, які кодують у бобових рослин білок фазеолін, в рослини соняшника — гена, відповідального за синтез резервного білка кукурудзи а також гена, здатного синтезувати фермент алкогольдегідрогеназу.

Перспективним було б клонувати та перенести певні піф-гени в ендотрофну мікоризу, інтегруючи їх або в хромосому або в ДНК хлоропластів.

Однак, самого перенесення *nif*-генів ще не достатньо для виникнення у рослинних клітинах здатності до азотофіксації, адже ця нітрогеназа повинна бути захищена від процесів окислювального руйнування, крім того, в цих клітинах повинна бути створена нова система перенесення електронів та кофакторів.

Найпростіший спосіб використання природної здатності *Ti*-плазмід до трансформації рослин базується на вбудовуванні нуклеотидної послідовності, яка викликає зацікавленість у дослідника, в *T*-ДНК, а потім використання *Ti*-плазмиди та *A. tumefaciens* для клонування та вбудовування клонованого гена в геном компетентної рослинної клітини. Саме таким методом було трансформовано 15 різновидів томату, в геном яких було перенесено бактеріальний ген резистентності до канаміцину, а пізніше — в клітини петунії ген хорінгонадоотропіну людини (фірма *Monsanto*, Інститут Фрідріха Мішера, Базель, Швейцарія); ген канаміцину за допомогою вірусного вектора був перенесений в протопласти тютюну, а потім був виявлений в рослинах-регенерантах та їх нащадках.

Але, як уже зазначалося, системи переносу генів за допомогою *A. tumefaciens* ефективно працюють лише для деяких видів рослин. Зокрема, однодольні рослини, включаючи основні зернові культури (рис, пшеницю, кукурудзу), практично не трансформуються *A. tumefaciens*. Тим не менше, модифікувавши методики та ретельно контролюючи умови, вдалося трансформувати кукурудзу та рис агробактеріями *A. tumefaciens*, які несуть вектори — похідні *Ti*-плазмід. Так, наприклад, незрілі зародки кукурудзи поміщали на декілька хвилин в суспензію клітин *A. tumefaciens*,

*а потім інкубували декілька діб при відсутності селективного тиску.*

*Після цього зародки переносили у середовище з антибіотиками, в якому могли рости лише трансформовані рослинні клітини. Ці клітини витримували в темноті протягом декількох тижнів, потім переносили масу трансформованих рослинних клітин на інше поживне середовище та інкубували на світлі для того, щоб відбулася регенерація цілої трансгенної рослини.*

*В таблиці 16 вказано декілька методів трансформації одnodольних рослин. Деякі з цих методів потребують відокремлення клітинної стінки з утворенням протопластів. Останні підтримують в культурі як незалежні ростові клітини або в спеціальному поживному середовищі, в якому вони утворюють клітинні стінки: із таких клітин можливо регенерувати цілу рослину. Крім того, розроблено методи трансформації, які дозволяють вводити клонований ген в незначну кількість клітин рослинної тканини, з якої можна регенерувати цілу рослину без регенерації протопластів.*

Нині для постачання ДНК в рослинні клітини використовують або вектори на основі Ті-плазмід, або бомбардування мікрочастками. Таким чином було трансформовано близько 50 різних видів рослин.

Бомбардування мікрочастками, або біолістика, – найбільш багатообіцяючий метод введення ДНК в рослинні клітини. Золоті або вольфрамкові сферичні частки діаметром 0,4—1,2 мкм покриваються ДНК, осаджену хлоридом кальцію, спермедіном або поліетиленгліколем і “вистрілюють” ними в клітини із спеціальної



“гармати”, яка приводиться в дію газами, що утворюються при згоранні вибухівки стисненим повітрям або гелієм.

Таблиця 16. *Методи введення ДНК в рослинні клітини*

Метод	Коментарі
1	2
Використання Ті-плазмід	Відмінна високоефективна система, але придатна не для всіх видів рослин
Бомбардування мікрочастками	Використовується для широкого кола рослин та тканин; простий та дешевий спосіб
Використання векторів на основі вірусів	Неефективний спосіб перенесення ДНК в рослинні клітини
Пряме введення генів в протопласти рослин	Може використовуватися для введення генів лише в протопласти рослинних клітин, з яких можуть бути регенеровані життєздатні рослини
Мікроін’єкції	Мають обмежене застосування, оскільки одночасно ін’єкцію можна зробити лише в одну клітину; маніпуляцію можуть проводити лише спеціалісти

Електропорація	Використовується для введення генів лише в протопласти, з яких можуть бути регенеровані життєздатні рослини
Злиття ліпосом	Застосовується для введення генів лише в протопласти, з яких можуть бути регенеровані життєздатні рослини

*Таблиця 17. Генетично трансформовані рослини*

Баклажан	Лілія
Банан	Лотос
Батат	Люцерна
Біб	Морква
Бавовна	Овес
Виноград	Огірок
Вівсяниця висока	Орхідея
Вівсяниця червона	Папайя
Гвоздика	Петунія
Горох	Піон
Груша	Соняшник
Єжа збірна	Пшениця
Жито	Рис
Ялина європейська	Цукровий буряк
Ялина канадська	Цукровий тростник
Перлинне просо	Соеві боби
Полуниця	Солодка
Зелений горіх	Сорго
Канола	Спаржа
Капуста	Шавлія
Картопля	Тютюн
Ківі	Томат
Клюква	Тополя
Кукурудза	Яблуня
Латук	Ячмінь
Льон	Arabidopsis

Частки розганяють до швидкості 300—600 м/с і пробивають клітинну стінку і мембрани рослинної клітини. При цьому їхня густина така, що клітини практично не пошкоджуються.

Попавши до клітини, ДНК, яка покриває частки, якимось невідомим чином інтегрується в рослинну ДНК.

Метод бомбардування мікрочастками дозволяє трансформувати рослини різних видів, в тому числі однодольні та хвойні, в які не вдається ввести ДНК за допомогою *Agrobacterium*.

Бомбардування мікрочастками можна використати для введення чужерідної ДНК в суспензію рослинних клітин, в меристематичні тканини, незрілі зародки, протокорми, комоптилі та пилки широкого кола рослин.

Крім того, за допомогою цього методу були транспортовані гени в хлоропласти та в мітохондрії. Звичайно, більшість генів рослинної клітини локалізовані в ядерній ДНК, однак хлоропласти та мітохондрії також містять гени, які кодують ряд важливих та унікальних функцій. При цьому не всі білки, які знаходяться в цих органелах, закодовані в їхній ДНК.

Деякі з них кодуються ядерною ДНК, синтезуються в цитоплазмі, а потім за допомогою спеціального механізму імпортується до відповідної органели.

Розроблено два способи введення чужерідного білка в мітохондрії або хлоропласти. Один спосіб — це злиття гена, який кодує чужерідний білок, і послідовності сигнального пептиду, який вказує напрямок переміщення білка до органели.

Другий спосіб передбачає вбудовування гена, який кодує чужерідний білок, безпосередньо в ДНК хлоропласту або мітохондрії.

Звичайно при введенні чужерідного гена в рослину одночасно вводиться і селективний маркерний ген. Хоча до цього часу не було ніяких вказівок на те, що будь-який з цих генів має негативний вплив на людей, тварин або навколишнє середовище, наслідки, до яких в принципі може призвести включення в рослину селективних маркерних генів, викликають неспокій у громадськості. Наприклад, продукти деяких маркерних генів можуть бути алергенами або токсинами, а гени стійкості до антибіотиків можуть потрапити до патогенних ґрунтових мікроорганізмів. Крім того, присутність селективних маркерів технічно ускладнює трансформацію рослин додатковими генами, тому що один селективний маркер не може використовуватися двічі. Щоб заспокоїти громадськість, були розроблені методи отримання трансгенних рослин без будь-яких маркерних генів.

Один із експериментальних підходів до отримання безмаркерних трансгенних рослин включає котрансформацію рослин двома різними ДНК, одна з яких несе маркерний ген, а інша — послідовності чужерідного гена, які цікавлять дослідника.

В цьому випадку від 30 до 80 % рослин містять обидва гени, які, однак, інтегровані в різні сайти хромосомної ДНК. Після відбору трансформантів маркерні гени вилучають із трансгенної рослини за допомогою звичайного схрещування.

Іноді використовують і інші методи отримання трансгенних рослин, які не містять маркерних генів.

Основною метою біотехнологічних експериментів на рослинах являється створення нових сортів культурних рослин. Більшість ранніх досліджень було направлено на отримання високоврожайних сортів рослин без зміни їх харчової цінності. В рослини

вводили гени, які повинні були забезпечити їм стійкість до комах-шкідників, вірусів, гербіцидів, несприятливих умов оточуючого середовища, та гени, які уповільнюють процеси старіння.

Для створення рослин, стійких до комах-шкідників, за допомогою генноінженерних методів використовувались різні стратегії.

В одному випадку використовували ген інсектицидного протоксину, який продукує один із підвидів *Bacillus thuringiensis*. В іншому — гени рослинних білків, таких як інгібітори амілаз або протеїназ, ефективних у відношенні широкого кола комах. Комахи, в організм яких потрапляв один із цих генів, були нездатні перетравлювати їжу, тому що інгібітори запобігали гідролізу крохмалю або рослинних білків.

Протоксини *B. thuringiensis* — це цілком безпечний засіб захисту рослин: потрапляючи в навколишнє середовище, він втрачає активність. Але, на жаль, багато шкідників хлібних злаків харчуються внутрішніми тканинами рослин, тому препарати *B. thuringiensis*, якими опилують поверхню рослин, залишаються малоефективними.

Цю проблему вирішують, забезпечуючи експресію генів токсинів в самих рослинах. Розпилювання інсектицидів у цьому випадку не потребується, і токсини не потрапляють в навколишнє середовище, крім того, не виникає проблем, пов'язаних із обмеженням часу їх дії в результаті розпаду.

Задача біотехнолога заключається у створенні трансгенної рослини, здатної синтезувати активну форму бактеріального інсектициду в кількості, достатній для захисту рослини від шкідника.

Цікавими являються дослідження із створення генетичних конструкцій, що містять ген лізоциму, в геномі рослин. Як відомо, лізоцим лізує різноманітні грамнегативні та грампозитивні бактерії, тому цей підхід може бути використаним для захисту рослин від різних патогенних бактерій.

Біотехнологами також проводяться дослідження по створенню рослин, толерантних до високих концентрацій радикалів кисню. На рослини впливає багато стрес-факторів: висока освітленість, ультрафіолетове опромінення, високі температури та концентрації солей тощо. Одним із небажаних результатів фізіологічного стресу являється утворення радикалів кисню. Найбільш поширеним радикалом кисню, який становить найбільшу небезпеку для рослин, являється супероксид-аніон.

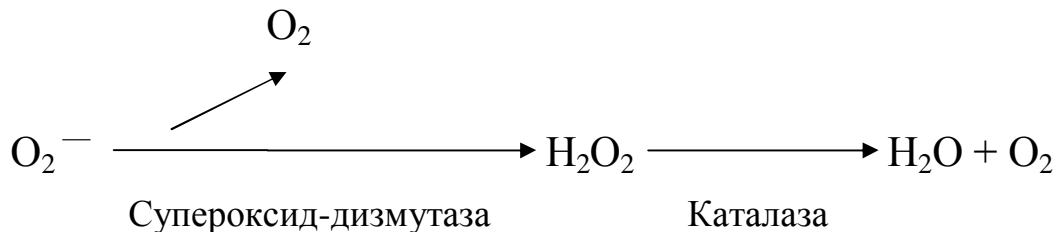
Фермент супероксид-дизмутаза нейтралізує цю сполуку, перетворюючи її в пероксид водню, який в свою чергу перетворюється у воду будь-якою із клітинних пероксидаз або каталаз. В одному із експериментів були отримані трансформовані рослини тютюну, що містили гени супероксид-дизмутази під контролем 35S-промотора вірусу тютюнової мозаїки кольорової капусти.

Вони синтезували супероксид-дизмутазу і проявляли стійкість до пошкодження радикалами кисню. Таким чином, вдалося запобігти дії окислювального стресу, від якого страждають рослини.

Крім того, трансгенні рослини тютюну, які несли гени хлоплястої Cu/Zn-супероксид-дизмутази під контролем 35S-промотора вірусу тютюнової мозаїки кольорової капусти були більш стійкими до яскравого освітлення, ніж нетрансформовані рослини. Будо виявлено, що фотосинтетична активність у транс-

генних рослин зберігалася на 94 % в умовах, при яких нетрансформовані рослини повністю її втрачали. Трансгенні рослини, що синтезували Mn-супероксид-дизмутази, яка акумулюється в хлоропластах, були в три-чотири рази менш чутливими до руйнуючої дії озону, ніж контрольні нетрансформовані.

Підвищення рівня супероксид-дизмутази дає рослинам ще одну перевагу: рослини стають більш стійкими до дії світла та до гербіциду метилвіологена. Супероксид-дизмутаза сприяє також більш тривалому зберіганню зрізаних квітів при транспортуванні. Їх зав'язання також відбувається в результаті утворення радикалів кисню. Якби вдалося створити трансгенні рослини, що містять ген супероксид-дизмутази, який знаходиться під контролем промотора, специфічного для квітів, це могло б сповільнити їх зав'язання.



*Рис. 17.* Перетворення супероксид-аніона в пероксид водню, а потім у воду та кисень

Багато рослин ростуть в регіонах, в яких часто буває посуха або сильно засолений ґрунт. Щоб пристосуватися до цих умов, вони синтезують низькомолекулярні нетоксичні речовини — осмопротектори. Ці речовини сприяють поглинанню та утриманню води, а також попереджають руйнування макромолекул, які накопичуються в клітинах рослин під час посухи або підвищеної засоленості.

Осмопротекторами являються цукри, бетаїн та інші відомі сполуки.

Однак деякі важливі сільськогосподарські культури, в тому числі картопля, не здатні накопичувати бетаїн, тому в геном таких рослин було б дуже важливо ввести ген *bet A E.coli* за допомогою Ті-плазмиди *A.tumefaciens*, відповідальний за синтез холіндегідрогенази (цей фермент каталізує перетворення холіну в бетаїн).

Рослини, в яких експресувався ген *bet A E.coli*, були на 80 % більш стійкими до високих концентрацій солей (приблизно 300 мМ), ніж нетрансформовані рослини.

Несподівані перспективи перед агробіотехнологією можуть виникнути у зв'язку природними гербіцидами — алопатичними речовинами. Вони виділяються в середовище певними рослинами, викликаючи загибель інших рослин і можуть слугувати в боротьбі із засмічуючими культурами.

Ця галузь вивчена недостатньо і поки що мало придатна для практичного використання.

Цікавим являється напрямок генної інженерії, пов'язаний із запобіганням передчасному дозріванню та пом'якшенню фруктів та овочів. Відомо, що передчасне дозрівання плодів викликає серйозні проблеми при їх транспортуванні. Встановлено, що під час дозрівання плодів в рослинах активізуються специфічні гени, які кодують ферменти целюлазу та полігалактуразу, і якщо пригнітити експресію одного або декількох із них, то дозрівання може розпочатися пізніше. Для інактивації вказаних генів були створені трансгенні рослини, в яких синтезувалися беззмістовні РНК-версії цих генів. При введенні гену, кодуючого беззмістовну полігалактуразу РНК, в рослини томату — культури, яка щоріч-



но приносить в США близько 1,3 млрд. дол. прибутку, — і кількісно відповідної мРНК, активність фермента знижувалася на 90 %. Такі генетично трансформовані томати відомі як FLAVR SAVR.

Регулятор росту рослин етилен ініціює експресію багатьох генів, відповідальних за дозрівання та старіння плодів. Він синтезується із S-аденозилметионіну через проміжну сполуку АСС.

Обробка рослин хімічними препаратами, здатними блокувати синтез етилену, затримує як процеси дозрівання, так і процеси старіння. Таким чином, передчасному зістарюванню плодів можна запобігти, пригнічуючи етилен. Таким шляхом були створені трансгенні рослини, які синтезували антизмістовні версії мРНК або АСС-синтетази, або АСС-оксидази, ферменти, необхідні для синтезу рослинами етилену. У таких рослин рівень етилену був значно нижчим від норми, а тому плоди мали тривалий термін зберігання.

Більшість робіт по виведенню трансгенних рослин із зниженим вмістом етилену стосуються томатів; декілька з цих робіт пов'язані із виведенням трансгенної мускусної дині з такими ж властивостями.

Генноінженерні методи не лише дозволяють прискорити процес отримання рослин із покращеними властивостями, але і створювати сорти з новими ознаками, яких неможливо досягти традиційними методами схрещування. Наприклад, в лабораторних умовах уже отримані такі культури з поліпшеними харчовими властивостями, як кукурудза та горох. При цьому був змінений амінокислотний склад деяких запасних білків насіння. Крім того, створені сорти олійних культур (сої, канолі, бобів), як харчових так і нехарчових, із зміненим жирнокислотним складом

плодів, а також проводилися роботи, направлені на поліпшення смакових властивостей фруктів шляхом введення в рослину гена монелліна, білка, що має солодкий смак.

Не залишилися без уваги біотехнологів проблеми, пов'язані із зміною забарвлення та зовнішнього вигляду квітів, плодів, зміною смакових властивостей овочів та фруктів.

Квіткарі вже створили тисячі нових сортів квітів, які відрізняються один від одного формою та забарвленням квіток. Для цього ними застосовувалися традиційні методи схрещування.

Альтернативою до традиційних методів селекції являються методи, які базуються на маніпуляціях з генами ферментів біосинтезу антоціанінів. Антоціаніни, сполуки із класу флавоноїдів, являються найбільш поширеними пігментами квітів. Вони синтезуються із амінокислоти фенілаланіну в ході декількох ферментативних реакцій. Забарвлення квітів визначається хімічними властивостями їх бічного ланцюга.

Генноінженерні роботи по зміні забарвлення квітів проводилися, перш за все, з тими рослинами, які займають лідерні позиції в квіткарстві. Це троянди, гвоздики, тюльпани та хризантеми — на їх частку припадає близько 70 % обсягу індустрії квіткарства, тому саме на роботу з цими рослинами були направлені зусилля генетиків.

Наприклад, були виведені трансгенні хризантеми, які несуть змістовні та беззмістовні конструкції кДНК халкосинтази. Цей фермент каталізує першу стадію біосинтезу антоціаніну.

Зміна кольору зібраних овочів та фруктів, на відміну від зміни кольору квітів, може бути серйозною перепоною при їх реалізації. Сучасна технологія харчових продуктів дозволяє боро-

тися із зміною кольору та зовнішнього вигляду продуктів, застосовуючи різні харчові добавки. Але їх застосування іноді викликає серйозні проблеми. Так, нещодавно виникли сумніви відносно безпеки одного з видів добавок-сульфітів. Зміна забарвлення овочів та фруктів починається з окислення монофенолів та о-дифенолів до о-хінонів. Каталізаторами процесу слугують ферменти поліфенолоксидази. Вони кодується ядерною ДНК, мають молекулярну масу приблизно 59000 і локалізуються в мембранах хлоропластів та мітохондрій.

Були створені вектори, що містять фрагмент або повнорозмірну кДНК поліфенолоксидази картоплі, які знаходяться під контролем одного із трьох промоторів: 35S-промотору вірусу мозаїки кольорової капусти, промотору гена синтезу гранулозв'язаного крохмалю або промотору гена пататину.

Останні два гени специфічні для картоплі.

Два сорти картоплі, трансформовані цими конструкціями, виявляли високу стійкість до чорної плямистості (ферментативна зміна кольору).

Генноінженерні дослідження, пов'язані із зміною смаку рослин, перш за все, пов'язані із введенням гена монеліну.

Монелін — це білок, виділений із плоду африканської рослини *Dioscorephyllum cumminsii Diels*. Він майже в 100000 разів солодший за цукрозу в еквімолярній кількості. Цей білок може бути замінником цукру, але має над ним ще ту перевагу, що не являється вуглеводом і тому не має негативного впливу на метаболізм.

Монелін — це дволанцюговий димер; ланцюги пов'язані між собою слабкими нековалентними зв'язками, які руйнуються

при нагріванні під час приготування їжі або під дією органічних кислот, в результаті цього білок втрачає свої смакові якості.

Задача створення трансгенних рослин або мікроорганізмів, здатних синтезувати монелін, ускладнювалася тим, що необхідно клонувати та здійснити координовану експресію двох окремих генів. Щоб вирішити цю проблему, був синтезований хімічним шляхом ген монеліну, здатний одночасно кодувати А- та В- ланцюги поліпептиду. Були створені трансгенні рослини томату та салату, здатні синтезувати химерний білок. Синтетичний ген монеліну вводили в рослинні клітини, інфікуючи їх *A. tumefaciens*, та використовуючи коінтегративну векторну систему на основі Ті-плазмід.

Вже нині біотехнологи здатні в будь-якій рослині створити вакцину як проти хвороб молодняка худоби так і для вакцинації дітей. При цьому тварин можна просто кормити звичайним листям — і вони перестануть хворіти та вмирати.

В США зареєстрована вакцина для дітей проти декількох хвороб (полівакцина), отримана в банані.

Виробництво антитіл та їх фрагментів за допомогою трансгенних рослин має ряд переваг перед їх синтезом в клітинах рекомбінантних мікроорганізмів. Трансформація рослин носить стабільний характер, чужерідна ДНК практично незворотно вбудовується в рослинний геном, в той час як більшість мікроорганізмів трансформується плазмідами, які можуть втрачатися під час ферментації.

Крім того, процесінг та укладка чужерідних білків в рослинах аналогічні таким же процесам в тваринних клітинах, в той же

час як в бактеріях процесінг, укладка та посттрансляційна модифікація еукаріотичних білків ускладнена.

Крім того, крупномасштабне вирощування рослин не потребує великих витрат і не лімітується можливостями процесу ферментації.

І на останок, можна створити умови, при яких чужерідні білки будуть синтезуватися в насінні, що буде гарантувати збереження їх цілісності протягом тривалого часу. Це, перш за все, стосується створення рекомбінантних білків із алеозинів (білків оліїстих тілець, що містяться в насінні різних рослин) та водорозчинних білків. Рекомбінантні білки будуть акумулюватися в оліїстих тільцях, що дозволить відносно легко їх очистити і тим самим здешевити процедуру очищення білків, синтезованих рослинами.

Багаточисленні трансгенні рослини із зміненими властивостями та покращеною харчовою цінністю пройшли успішну перевірку в лабораторіях, а деякі і в польових умовах.

Всі трансгенні сорти надходять до Мінздраву, в Мінпромнауку, до Держкомітету по дослідженню та охороні селекційних досягнень.

Поки що в жодній із країн світу не зареєстровано жодного факту, який би свідчив про небезпечність модифікованих продуктів.

## **Контрольні запитання**

1. Коли було створено першу трансгенну рослину?

2. Які види генетично-модифікованих рослин створені та найшли застосування в народному господарстві?
3. Як розвивалася генетична інженерія рослин на Україні?
4. Чому до цього часу не вдалося створити векторів для однодольних рослин?
5. Яку роль відіграла Tі-плазміді в генетичній інженерії рослин?
6. Які гени вдалося інтегрувати в геном рослин за допомогою Tі-плазміді?
7. Порівняйте основні методи введення ДНК в рослинні клітини.
8. В чому заключається сутність методу бомбардування ДНК ядра та органел рослин мікрочастками?

## **Глава 6.      ТРАНСГЕННІ ТВАРИНИ**

### **6.1. Історія створення трансгенних тварин**

Для виведення покращених порід домашніх тварин та птахів (корів з більш високою удоїністю, вівців з якісною шерстю, курей з більш високою яйценосністю та ін.) проводять багато раундів схрещування та відбору, кожний раз використовуючи тварин з найкращими характеристиками. В результаті з часом можна отримувати більш або менш чисті лінії високопродуктивних порід тварин. Стратегія схрещування та відбору, яка вимагає значних затрат часу та матеріальних витрат, тим не менше, виявилася

досить успішною, і наразі всі аспекти біологічних основ схрещування порід домашньої худоби можуть бути зведені до неї.

Однак після того як ефективна генетична лінія отримана, вводити нові ознаки методом схрещування та відбору стає все важче. Крім того, селекційовані лінії можуть нести і “шкідливі” гени, в результаті чого нащадки можуть виявитися менш продуктивними, ніж предки.

Крім того, в середині 80-х років перед селекціонерами постало питання про необхідність створення тварин, здатних виробляти невластиві їм білки — гормони, вакцини тощо. Цьому сприяла скандальна історія, пов’язана з американським м’ясом. В середині 80-х років на Європу відбувся наступ цілої лавини дешевого м’яса із США. М’ясо було дешевим, тому що американські фермери кормили своїх тварин різними гормонами, стимулюючими зростання біомаси тварин. Пізніше виявилось, що діти, які споживали це м’ясо, росли швидше, але при цьому набирали зайву вагу. Вибухнув гучний скандал. Вчені прийшли до висновку, що потрібно не вводити гормони росту, а зробити так, щоб тварина сама їх синтезувала.

Схематично це виглядає так. В лабораторії конструюється молекула, що містить ген, відповідальний за синтез необхідного гормону. Потім ця конструкція інтегрується в генний апарат тварини, організм якої під впливом своїх елементів управління, промоторів, починає синтезувати всередині ці самі гормони. Це можуть бути гормони росту, інсуліноподібні фактори росту, інші гормони. Вже зараз в США в організм свиней, корів, курей вбудовуються гени, які значно прискорюють їх ріст та покращують

якість м'яса. А їжі ці тварини споживають значно менше, ніж звичайні.

Генетично модифіковані лососеві набирають вагу в чотири рази швидше, ніж звичайні риби.

Окрім синтезу гормонів росту (для швидкого збільшення маси у м'ясних порід) в організмі тварини можна посилити синтез деяких інших речовин, що містяться, наприклад, в молоці. Так у Великій Британії вже створена череда корів, молоко яких ідеально підходить для приготування сиру чеддер.

Особливо актуальним являється створення тварин, здатних продукувати невластиві їм види білків. Так, наприклад, уже повідомлялось про наукові розробки, направлені на отримання свиней, здатних продукувати інтерферон людини, потреба в якому у сучасній медицині достатньо велика. Іншим прикладом являються корови, здатні продукувати молоко з лактоферріном (він не входить до складу звичайного коров'ячого молока), який використовується при штучній годівлі малюків.

Цей білок в природі існує лише в молоці людини, він важливий для фармацевтичної промисловості, і, тому, достатньо дорогий; отримання великих партій цього препарату нереальне із-за дефіциту сировини. Виробництво ж лактоферіну з молока трансгенних тварин зніме цю проблему. Був навіть запропонований новий термін "фармінг", якій відноситься до процесу отримання з молока трансгенних домашніх тварин ("pharm") тваринних аутентичних білків людини або фармацевтичних препаратів.

Іншим прикладом являється отара трансгенних вівців, які живуть в підмосковних Горках. Ці тварини, яким був пересаджений ген від бика, продукують разом із молоком хімоцин великої



рогатої худоби — фермент, необхідний для виробництва твердого сиру. За старою технологією хімосин отримували із екстрактів шлункової тканини новонароджених телят. Тільки від однієї вівці за одну лактацію можна отримати до 30 г цього фермента, якого достатньо для осадження казеїну в 300000 кг молока та отримання 30 т сиру.

Приведені приклади відображають основний напрямок створення трансгенних тварин в якості живих “фабрик” з виробництва біологічно активних речовин (в основному білків), що знаходять широке застосування в різних галузях промислового виробництва та медицини.

Що ж таке трансгенні тварини?

Трансгенними називаються тварини, чий генотип був змінений шляхом введення чужерідної (екзогенної ДНК). Звичайно, цей генотип повинен нормально функціонувати.

Весь процес отримання трансгенних тварин (трансгенів) був названий трансгенною технологією або трансгенозом.

Створення трансгенних тварин може сприяти вирішенню багатьох проблем, з якими стикається людство на всьому проміжку своєї історії. Це, перш за все, продовольча проблема.

Так, за даними ООН більш ніж 1,5 мільярди людей (кожний четвертий) на землі голодує.

Сучасні генетики працюють над ідеєю створення штучного м'яса із безсмертної клітини. Для цього необхідно отримати таку клітину (тобто надати клітині здатність до необмеженого розмноження в умовах *in vitro*). Відомо, що лімфоцити людини за межами організму живуть 1—2 доби, еритроцити — 3 місяці, нервові клітини можуть жити до 100 років, а стовбурні клітини по-

повнюють запас клітин крові, м'язів та інших тварин. Зокрема, міобласти — також стовбурні клітини — слугують в організмі джерелом клітин м'язів (скелетних м'язів). Міобласти діляться кожні 12—18 годин, час подвоєння тваринних клітин в культурі — 20—40 годин. Тобто, клітини м'язів здатні до досить тривалого розмноження, однак нервовій, епітеліальній та покривній тканині така здатність не властива.

Існує можливість штучно зробити клітину безсмертною. Для цього достатньо ввести в її ДНК відповідний ген — ген безсмертя. Такі ділянки знаходяться у вірусних онкогенах, які живуть в кожному вищому організмі. В гені безсмертя закодований термочутливий білок, який синтезується при 33 °С і робить клітину безсмертною. При зростанні температури до 40 °С синтез цього білка зупиняється, і клітина повертається до нормального стану. Таким чином, регулюючи температуру, можна управляти процесом розмноження.

## **6.2. Основи трансгенезу**

### **6.2.1. Клонування методом перенесення ядер**

Успішною була методологія з введення чужерідних генів в клітини ссавців. Вона дала можливість створення генетично ідентичних тварин шляхом перенесення ядра з ембріональної клітини в яйцеклітину з вилученим ядром (перенесення ядра, клонування). В результаті такого перенесення в хромосому ДНК вищих тварин включають окремі функціональні гени або їх цілі кластери.

Ця стратегія заключається в слідуєчому:

- Клонований ген вводять в ядро із заплідненою яйцеклітиною.
- Інокульовані запліднені яйцеклітини імплантують в рецєпієнтну чоловічу особу.
- Відбирають нащадків, які розвиваються з інплантованих яйцеклітин, що містять клонований ген у всіх клітинах.
- Схрещують тварин, які несуть імплантований ген, і отримують нову генетичну лінію.

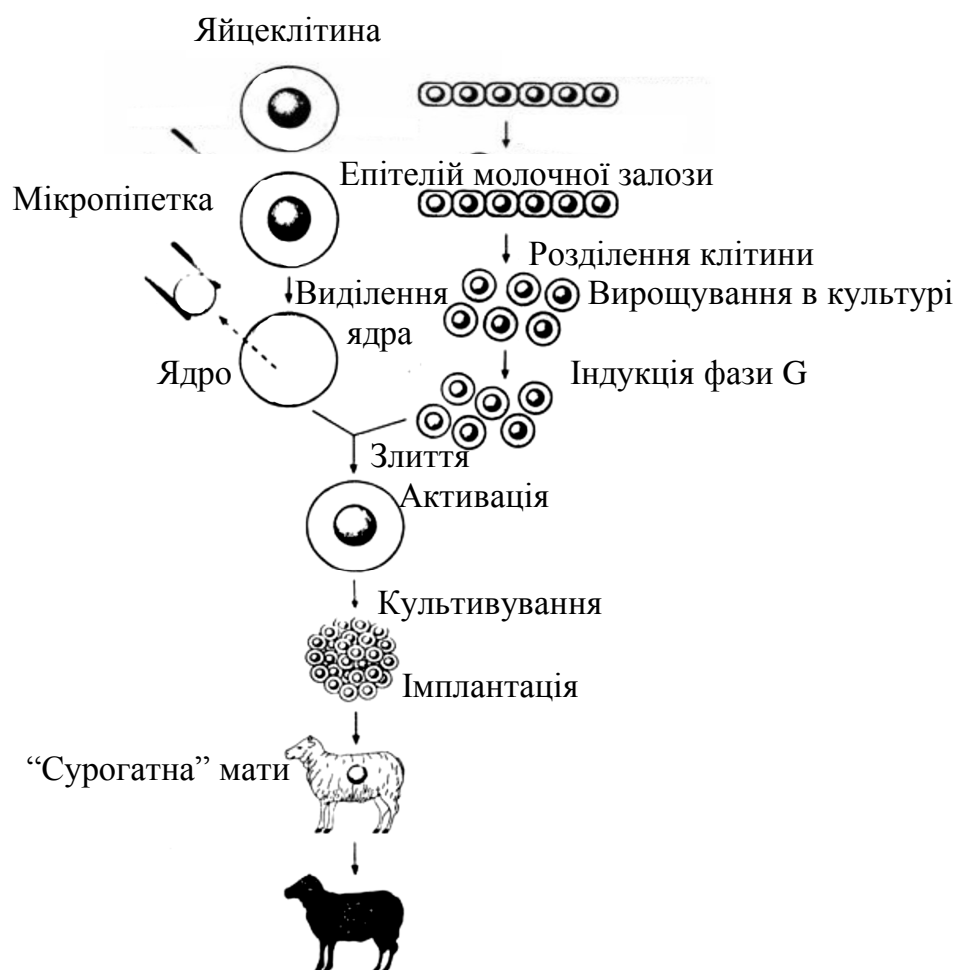
Саме за цією технологією влітку 1976 року в Единбурзі (Шотландія) була отримана вівця, яка нічим не відрізнялася від своїх родичів.

Її отримали в Інституті Росліна шляхом перенесення ядер клітин ранніх ембріонів вівці в незапліднену клітину вівці.

Здавалося б, що незвичного було в цій вівці? Адже повідомлення про клонування, тобто про отримання за допомогою генетичного матеріалу соматичної клітини ідентичного організму вперше з'явилися ще в п'ятдесяті роки минулого сторіччя, коли шляхом пересадження ядер малька в ікринку жаби був отриманий новий мальок, тобто принципова можливість "зворотньої" диференціації клітин вже була доведена. Крім того, в тому ж Інституті Росліна ще раніше вже була клонована пара вівців, яких було названо Мєган та Морган.

Однак всі ці, а також і деякі інші менш відомі експерименти ніяк не могли впевнити людство в принциповій можливості клонування. І лише завдяки вівці, названій Долі, було підтверджено можливість отримання генетично ідентичних дорослих тварин.

Безпосереднє клонування здійснювалося за допомогою технології ядерного переносу. В процесі перенесення використовуються дві клітини. Рецепієнтна клітина являється незаплідненою яйцеклітиною, відібраною безпосередньо після овуляції. Ця клітина обробляється таким чином, що зупиняється в своєму розвитку до того моменту, доки не буде індукована спеціальними речовинами. Донорська клітина відбирається з клонованої тварини. Потім за допомогою електронного мікроскопу та спеціальних інструментів (мікропіпетки) з рецепієнтної клітини вилучається ДНК (на цій стадії розвитку (Go) яйця клітини її хромосоми не організовані у відокремлене ядро). Потім донорська клітина, що містить ядро з хромосомною ДНК, з'єднується з яйцеклітиною, що не містить генетичного матеріалу. Після цього деякі із злитих клітин починають ділитися, а потім, після їх перенесення в матку сурогатної матері, розвиваються в повноцінний ембріон.



## Клонована вівця

*Рис. 18.* Клонування методом перенесення ядер

При отриманні Долі в якості донорських клітин використовували зрілі, диференційовані фібробласти (один із типів сполучної тканини) із нижньої частини вим'я вівці, яка знаходилася на четвертому місяці вагітності.

Вагітна тварина була вибрана тому, що під час вагітності клітини вим'я активно діляться, і тому добре виживають в культурі. Крім того, такі фібробласти містять стабільні за фізичною структурою хромосоми, що дозволяє сподіватися на збереження всієї генетичної інформації.

За повідомленнями спеціалістів Інституту Росліна та біотехнологічної компанії PPL Therapeutics, разом з якою проводився експеримент, всі отримані яйцеклітини (277 яйцеклітин) почали нормально ділитися та розвиватися. Однак, при підсаджуванні їх сурогатній матері з нез'ясованих причин лише деякі зиготи стали розвиватися в ембріони (29 ембріонів). Крім цього, після народження клонів були відмічені певні патології. Так, деякі із новонароджених були ненормально великими, що на думку дослідників було пов'язано із запізненням в підсаджуванні ембріонів, що розвиваються, в матку сурогатної матері.

Таким чином, підтвердилися статистичні дані попередніх досліджень з ядерного переносу, згідно з якими нормально розвивається лише один із тридцяти отриманих ембріонів.

Ядро яйцеклітини вилучають за допомогою мікропіпетки. Культивують епітеліальні клітини молочної залози дорослої вівці і індукують їх перехід у фазу G. Здійснюють злиття клітин в G-фазі та яйцеклітин, позбавлених ядра, і вирощують відновлені клітини з ядрами в культурі до ранніх стадій ембріогенезу, після чого трансплантують в матку сурогатної матері, де і відбувається їх подальший розвиток. В експериментах, проведених Уілмутом та ін. ( Wilmut et al, 1997 ) було проведено злиття 277 яйцеклітин з вилученими ядрами з клітинами молочної залози у фазі G<sub>0</sub>; із 29 ембріонів лише один розвинувся до життєздатного плоду.

### **6.2.2. Технології отримання трансгенних мишей**

Трансгенні технології відпрацьовувалися та удосконалювалися на лабораторних мишах. Трансгенні миші відіграли свою роль в дослідженні можливості крупномасштабного синтезу лікарських речовин, а також у створенні трансгенних ліній, які дозволяють моделювати різні генетичні захворювання людини (їх відомо близько 2000), викликані відсутністю або дефектами генів.

Введення чужерідної ДНК мишам можна здійснити різними методами:

1) за допомогою ретровірусних векторів, інфікуючих клітини ембріону на ранніх стадіях розвитку перед імплантацією ембріону в самку-рецепієнт;

2) мікроін'єкцією у збільшене ядро сперматозоїда (чоловічого пронуклеуса) заплідненої яйцеклітини;

3) введенням генетично модифікованих ембріональних стовбурних клітин в попередньо імплантований ембріон на різних стадіях розвитку;

4) заміною ядра яйцеклітини, що містить гаплоїдний набір хромосом на ядро соматичної клітини з диплоїдним (подвійним) набором хромосом з попередньо введеним в них геном безсмертя;

5) мікроін'єкцією чужерідного гена (гена безсмертя) в зиготу (запліднену клітину). Цей метод був запропонований ще в 1970 році Андерсоном та Діакуманосом. Він знайшов досить широке застосування, але являється досить малопродуктивним — звичайно чужерідний ген успадковується лише у 5—10 % народжених трансгенних тварин.

У всіх випадках народжуються трансгенні тварини, здатні успадковувати чужерідні гени.

### **6.2.3. Використання вірусних векторів**

Векторами (vector) вважаються молекули ДНК (наприклад, бактеріальні плазміди, віруси), здатні до самореплікації, які використовуються в генній інженерії для перенесення генів від організму донора в організм — реципієнт, а також для клонування нуклеотидних послідовностей.

Вірус, з цієї точки зору, являється досконалою векторною системою. Як відомо, в залежності від здатності створювати захисну оболонку навколо рекомбінантної ДНК всі віруси можна поділити на дві групи: ті, що володіють такою здатністю — кор-

пускулярні вектори, та ті, що не мають такої здатності — молекулярні вектори.

В якості векторів використовуються майже всі крупні таксони ДНК — містких вірусів. Вперше віруси були використані в якості векторів в 1976 році Єнішем (Каліфорнія). Єніш інфікував ембріони мишей, які знаходилися на стадії морули, вірусом лейкозу мишей (М-Ми LV) та інтегрував їх самкам реципієнта. Через декілька місяців він спостерігав за проявом хвороби у 10—40 % дорослих нащадків. Ці віруси вбудовувалися в клітини зародкового шляху. Експресія генів певною мірою визначалася ділянкою вбудовування вірусу в геном клітини. Вбудовані гени передавалися наступному поколінню.

Віруси з групи, до якої відноситься вірус лейкозу мишей, розглядалися рядом спеціалістів як ефективні вектори перенесення генів (це була молекула ондониткової РНК); при враженні клітини вірусом зворотня транскриптаза синтезувала молекулу ДНК, комплементарну РНК; утворена при цьому ДНК-копія вбудовувалася в ДНК клітини у вигляді “провірусу”.

На кінцях векторної ДНК розміщувалися довгі кінцеві повтори (LTR), які забезпечували як інтеграцію гену, так і індукцію синтезу білка, що транслювався цим геном.

Пізніше в якості векторів почали використовувати гібридні молекули ДНК, збудовані з ДНК вірусу SV-40 та невірусної ДНК. В ДНК вірусу SV-40 був вбудований ген гемоглобіну кролика ( $\beta$ -глобін).

Цими гібридними молекулами експресувалася ДНК мавп, які почали синтезувати  $\beta$ -глобін.



Вірус SV-40 мав високу трансформуючу здатність (тобто здатність робити клітину безсмертною), іншими словами, викликав імуорталізацію клітин. Крім того, цей вірус не проявляв онкогенність по відношенню до людини. Ще раніше, в 60-і роки вірус SV-40 був використаний у складі поліомієлітної вакцини, що не призвело до збільшення кількості онкогенних захворювань.

Ретровіруси використовують переважно в якості молекулярних векторів. Вони мають обмежені системи реплікону, тому що здатні до реплікації за рахунок клітинних ДНК-полімераз.

Переваги методу, який базується на використанні ретровірусних векторів, перед іншими методами трансгеноза заключаються в його ефективності. Однак, ретровірусні вектори здатні переносити лише обмежені (до 8 т.п.н.) вставки, в результаті чого трансген може залишитися без прилеглих регуляторних послідовностей, необхідних для експресії. Крім того, використання цих вірусів не являється безпечним, особливо для виробництва продуктів, що мають комерційної цінності.

Лінії трансгенних мишей з використанням ретровірусних векторів звичайно отримують за слідуючою схемою:

- Спочатку ембріон, який знаходиться на стадії восьми клітин, інфікують рекомбінантним ретровірусом, який містить трансген;
- Самки, яким був імплантований ембріон (“сурогатні” матері) народжують трансгенних нащадків;
- Проводять ідентифікацію мишенят, які несуть трансген в клітинах зародкової лінії, схрещуючи мишенят з предками.

#### 6.2.4. Метод мікроін'єкцій ДНК

Інший метод введення генів в популяцію клітин заключається в наступному: фрагмент ДНК, що містить ген, змішують з ДНК-носієм і осаджують з розчину фосфатом кальцію. Такий осад здатний проникати в деякі клітини, а введений в клітини ген здатний експресуватися та передаватися нащадкам.

На початку 70-х років Андерсоном та Діакуманосом був розроблений метод мікроін'єкцій ДНК в клітину. Цей метод вдосконалював метод ін'єкцій мишиних ядер в ооцити жаби відпрацьований Дж. Гордоном. Для трансгенозу важлива стадія дифференціації клітин, з яких виділяються гени.

Введення чужерідних генів в клітини ембріону, в тому числі в клітини зародкового шляху, дозволяє вивчати певні аспекти ембріонального розвитку, тому що при цьому виникає можливість прослідкувати, що відбувається із введеним геном (кластерами генів) у трансгенних тварин. Спочатку генно-інженерні дослідження проводили із крупними яйцеклітинами амфібій, а потім перейшли до яйцеклітин та ембріонів мишей, які тривалий час були найбільш вивченими в генетичному відношенні ссавцями. Перші дослідження з ембріонами мишей були проведені на початку 60-х років у Ветеринарній школі Пенсильванського університету.

Спочатку із самок-донорів виділяли яйцеклітини, в яких була індукована гіперовуляція. Перед цим самкам вводили сироватку вагітної кобили, а через 48—50 год — хоріонічний гонадотропін людини. В результаті гіперовуляції утворювалося близько 35 яйцеклітин замість звичайних 5—10. Далі проводили схрещування з самцями самок з гіперовуляцією та їх знищення.

Потім розчиняли захисну оболонку яйцеклітини за допомогою протеолітичних ферментів. Після цього з ядром яйцеклітини проводили різні маніпуляції та вводили в них мікрокількості ДНК. Яйце діаметром близько 0,1 мм поміщали на кінець мікропіпетки, та за допомогою мікроскопа та скляного капіляра із зовнішнім діаметром не більше декількох десятих часток мікрона вводили в яйце об'єм в декілька піколітрів ( $10^{-12}$  дм<sup>3</sup>). Як правило, ін'єкцію здійснювали в чоловічий пронуклеус яйцеклітини.

У ссавців після проникнення сперматозоїдів в яйцеклітину ядро спермія (чоловічий пронуклеус) та ядро яйцеклітини існують окремо. Після того, як остання закінчить мітотичний поділ та стане жіночим пронуклеусом, може відбутися злиття ядер (каріогамія). Чоловічий пронуклеус звичайно більший за жіночий, його легко локалізувати за допомогою секційного мікроскопа та ввести в нього чужерідну ДНК. При цьому яйцеклітину на час проведення мікроін'єкцій можна переміщати та орієнтувати необхідним чином або фіксувати.

Ін'єкція — це найбільш важлива частина експеримента, тому що саме в цей момент можливо заподіяти незворотне руйнування яйця або ембріону.

Яйцеклітини мікрохірургічним шляхом імплантують в “сурогатну” матір, в якій викликають “хибну” вагітність. Імплантують лише ті яйця, які вижили; за результатами експерименту спостерігають або ж на ембріонах, або ж у наступних поколіннях.

Для ідентифікації трансгенних тварин виділяють ДНК із невеликого шматочка хвоста та тестують її на присутність трансгену за допомогою блот-гібридизації за Саузерном методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Щоб визначити, чи знахо-

диться трансген в клітинах зародкової лінії тварини, трансгенну мишу схрещують з іншою мишою, а потім проводять схрещування нащадків для отримання чистих (гомозиготних) трансгенних ліній.

Метод мікроін'єкцій має ряд недоліків, але використовується досить часто.

### **6.2.5. Перенесення генів за допомогою штучних дріжджєвих хромосом**

Більшість трансгенів являються кДНК, невеликими генами ( $\leq 20$  т.п.н.) або фрагментами генів. Дуже часто кДНК погано експресуються в клітинах ссавців, а коли трансгеном слугує геномна ДНК, важливі геноспецифічні регуляторні послідовності, які розміщуються до та після гену-мішені, звичайно не входять до складу вставки. Крім того, повнорозмірні гени та мультигенні комплекси ( $\geq 100$  т.п.н.) занадто великі для створення звичайних векторів. Враховуючи все це для трансгенозу почали використовувати дріжджєві хромосоми (УАС).

В останні роки дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* стали таким же популярним об'єктом молекулярно-генетичних досліджень, яким в 60-і роки була *Escherichia coli*. Зміна об'єктів дослідження, що відбулася, характеризує загальний перехід молекулярної біології від вивчення бактерій до вивчення еукаріотичних клітин.

Вибір дріжджів як основного експериментального об'єкту був підготовлений багаторічними генетичними та біохімічними

дослідженнями. Із геному дріжджів виділено більше 500 генів, переважну більшість цих генів вже розшифровано.

Основні переваги дріжджів:

- 1) перш за все, не виділено жодного виду сахароміцетів, який був би патогенним для людини;
- 2) будучи еукаріотами, дріжджі здатні здійснювати деякі модифікації гетерологічних білків вищих організмів, необхідних для забезпечення їх біологічної активності;
- 3) дріжджі — один із найбільш освоєних промислових об'єктів, тому багато наробітків, зроблених на дріжджах, в короткий термін можуть бути впроваджені у виробництво;
- 4) генетичний фонд одних лише сахароміцетів дуже багатий, а використання поряд з ним генофонду всіх інших дріжджів робить можливості генетичної інженерії цих мікроорганізмів практично безмежними.

ДНК *Saccharomyces cerevisiae* має довжину близько 2 мкм — на основі цієї ДНК сконструйовано багато плазмід. Крім того, найбільш перспективна група векторів для цілей прикладної генетичної інженерії сконструйована на основі криптичної плазмиди дріжджів — омікронної ДНК (оДНК). Ця група векторів отримала назву епісомних векторів або векторів типу УЕр. ОДНК представляє собою ковалентно замкнуту молекулу ДНК довжиною близько 6 т.п.н.

Вміст оДНК в клітині (плазміда має ядерну локалізацію) складає від 30 до 100 копій на геном.

Вдається проводити рекомбінацію цих плазмід з чужерідними генами та використовувати їх як вектори для переносу та клонування цих генів в дріжджевих клітинах.

Налагоджена трансформація протопластів дріжджєвих клітин. В березні 1981 року співробітниками відділу генетики Вашингтонського університету в Сієтлі був вбудований ген лейкоцитарного інтерферону людини в клітини дріжджів.

Стосовно трансгенних мишей слід зазначити, що їх також отримували трансфекцією ES-клітин штучною дріжджевою хромосою, що містила декілька споріднених генів або один великий ген. Штучний ген містив кластер із п'яти функціональних генів  $\beta$ -глобіну людини загальною довжиною 250 т.п.н. — ці гени експресували  $\beta$ -глобін людини в мишиних клітинах в той час і в тих кількостях, як того вимагали потреби клітини. Експресія забезпечувалася дією промоторів та регуляторних елементів, які знаходилися у фланкуючих послідовностях на кінцях функціональних генів.

За допомогою штучних дріжджєвих хромосом (УАС) вдалося синтезувати природні антитіла, складні тетрамірні конструкції, які складаються з двох пар важких (H), та двох пар легких ( $\lambda$  або K) білкових ланцюгів, організованих у домени. Це була надзвичайно важка задача, адже гени, які відповідають за синтез цих 4-х білків, знаходяться в різних місцях геному, розділені інтронними послідовностями (послідовностями, які транскрибуються, але не містять кодонів та вирізаються із транскрипта в ході процесінгу з утворенням функціональної РНК).

#### **6.2.6. Трансгенез великої рогатої худоби, птахів та риб**

Біотехнологи запропонували використати молочну залозу рогатої худоби в якості “біореактора”. За допомогою цієї залози можна досягнути значного збільшення певних білків (наприклад, фактора Крістмаса, який запобігає виникненню тромбозів) в молоці.

Процедура трансгенезу великої рогатої худоби складається із наступних стадій:

1. Збір ооцитів корів, забитих на бійні.
2. Дозрівання ооцитів *in vitro*.
3. Запліднення бичачою спермою *in vitro*.
4. Центрифугування запліднених яйцеклітин для концентрування жовтка, який в нормальній яйцеклітині заважає візуалізації чоловічого пронуклеуса, за допомогою секційного мікроскопа.
5. Мікроін’єкція ДНК в чоловічий пронуклеус.
6. Розвиток ембріонів *in vitro*.
7. Нехірургічна імплантація одного ембріона реципієнтній самці під час тічки.
8. Скринінг ДНК нащадків на присутність трансгена.

Метою трансгенезу великої рогатої худоби, як зазначалося вище, являється зміна вмісту в молоці певних компонентів, таких як К-казеїн, лактоза, антитіла,  $\beta$ -казеїн тощо.

Трансгенез великої рогатої худоби — це перспективний напрямок біотехнології. Але створення трансгенних тварин потребує часу, поки що процедура трансгенезу ВРХ досить малоефективна.

Останнім часом біотехнологи виявляють зацікавленість до створення трансгенних курчат. Уже отримані трансгенні курчата та звичайні перепілки, які несуть чужерідні гени в клітинах заро-

дкової лінії. Ці гени інтегрувалися в геном завдяки ретровірусним векторам з порушеною реплікацією, що несли бактеріальні маркерні гени. Звичайно такі птахи не продукують вільних вірусних часток, однак м'ясо таких курчат не може вважатися безпечним. Тому більш перспективним являється метод з використанням рекомбінантних ембріональних клітин, який застосовують для покращення генотипу вже існуючих порід — надання їм стійкості до вірусних інфекцій та захворювань, зниження рівня жиру та холестерину в яйцях, поліпшення якості м'яса тощо. Цей метод складається із наступних етапів:

1. Виділення клітин бластодерми з курячого ембріона.
2. Трансформація клітин бластодерми за допомогою катіонних ліпідів (ліпосом), зв'язаних з трансгенною ДНК (ліпосомна трансфекція).
3. Повторне введення трансформованих клітин в підзародкову зону свіжевідкладеного яйця.
4. Виділення химерних птахів.
5. Проведення декількох раундів схрещування між химерними тваринами для отримання чистих ліній.

Більшість перших досліджень з трансгенозу риб були направлені на дослідження впливу трансгена гормона росту на швидкість росту. Як правило, трансгени вводили мікроін'єкцією ДНК або електропорацією запліднених яйцеклітин різних видів риб.

Лінеарізовану трансгенну ДНК риbam вводять не в пронуклеус, а в цитоплазму (пронуклеус у риб погано видно) запліднених яйцеклітин або клітин ембріонів, які досягли стадії чотирьох бластомерів. Риби мають досить високий відсоток виживання ем-



бріонів після мікроін'єкцій, тому частка трансгенних нащадків може досягати 70 %.

Описаним способом були отримані трансгенні лососі, форель, карпи, зубатки та інші види риб.

Трансгенні риби були значно крупнішими, ніж контрольні риби та швидше набирали в рості. Наприклад, трансгенні лососі майже в 11 разів переважали за вагою нетрансгенних осіб. В подальшому планується вводити риbam гени стійкості до інфекційних захворювань та до стресових ситуацій.

Таким чином, за допомогою трансгенозу були отримані трансгенні корови, вівці, свині, птахи та риби, які мали покращений генотип. Трансгеноз дозволить в майбутньому вивести нові породи сільськогосподарських тварин з новими ознаками. Крім того, планується використати дійних тварин (корів, овець, кіз) в якості "біореакторів" для отримання клонованих генів, секретованих в молоко.

### **Контрольні запитання**

1. Охарактеризуйте основні напрямки розвитку генетичної інженерії тварин.
2. Які досягнення генетичної інженерії тварин вам відомі?
3. Які основні стадії генно-інженерних маніпуляцій при створенні трансгенних тварин?
4. Що таке трансгенні тварини?
5. Як здійснюється клонування методом перенесення ядер?
6. В чому полягають особливості різних технологій отримання трансгенних мишей?

7. Які види векторів застосовуються в генетичній інженерії тварин?
8. В чому полягає сутність методу мікроін'єкцій ДНК?
9. Яке застосування знайшли еукаріотичні вектори (штучні дріжджеві хромосоми) в генетичній інженерії тварин?
10. В чому полягають переваги дріжджевих векторів перед іншими видами векторів в генетичній інженерії тварин?
11. Охарактеризуйте процедуру трансгенозу великої рогатої худоби.

## **Глава 7. ЛІСОПЕРЕРОБНА БІОТЕХНОЛОГІЯ**

### **7.1. Характеристика сировинної бази**

Ліс на Землі займає майже 30 % суші. Світові запаси лісу становлять близько 350 мільярдів кубометрів; лише в Росії, яка володіє майже четвертою частиною всього лісного масиву планети, щорічно заготовляють до 150 мільйонів кубометрів деревини.

Між тим кількість відходів в цій галузі досягає 50 мільйонів кубометрів на рік, із них близько 80 % вдається переробити, а більше 10 мільйонів кубометрів втрачається.

Значна частина відходів йде на виготовлення деревностружкових (ДСП) та деревноволокнистих (ДВП) плит, частина йде на виробництво спирту.

Однак, частину відходів, наприклад, щепу, просто спалюють, іншу, наприклад, лігнін (відхід гідролізного виробництва, який при промисловій переробці стає паливом, а може бути і сировиною для виробництва активованого вугілля, сорбентів, біотехнологічних препаратів та ін.) — звалюють безпосередньо по-

ряд з підприємством, несприятливо впливаючи на екологічну ситуацію в локальній екосистемі. Між тим, відходи лісопереробної промисловості являються цінною сировиною для виробництва багатьох необхідних сполук.

Технологія переробки відходів лісопереробної промисловості також пов'язана із забрудненням навколишнього середовища токсичними речовинами.

Традиційні технологічні процеси вироблення ДСП включають, по-перше, підготовку деревного волокна або стружок, та по-друге, гаряче пресування із них плит з використанням синтетичних речовин. Для склеювання (“зшивання”) деревних часток використовуються, як правило, синтетичні фенолформальдегідні та карбамідні смоли. Затрати на них складають близько 30 % від вартості плит.

Крім того, в готових плитах ці смоли поступово руйнуються із виділенням шкідливих для людини фенолу та формальдегіду.

Проблема отримання нетоксичних деревних плит без синтетичних зв'язників вже давно займала біотехнологів, які протягом останніх 15 років працюють в напрямку трансформації деревини за допомогою мікроорганізмів, зокрема, деяких грибів та продуктів їх життєдіяльності — ферментів. За рахунок хімічної дії ті та інші надають клеючих властивостей самій деревині, і це відкриває шляхи для створення нових екологічно чистих деревних пластиків.

## **7.2. Характеристика продуцента**

Руйнування мікроорганізмами рослинних залишків — природний процес, за рахунок якого відбувається колообіг вуглецю в природі. Серед мікроорганізмів відомо понад 2000 видів грибів, які викликають руйнування деревини.

Найбільшою руйнуючою властивістю володіють вищі базидіальні гриби білої гнилі, здатні виробляти комплекс ферментів, зокрема таких, які руйнують геміцелюлозу, лігнін, пектин, воск, жири, білки, смоли. На целюлозу, геміцелюлозу та лігнін припадає близько 96 % ваги сухої деревини; частка лігніну в залежності від породи деревини складає 16—33 %, а геміцелюлози — 7—25 %. Напрявлене руйнування саме цих двох біополімерів покладено в основу біотехнології.

Клітинні оболонки деревини поступово розчиняються під дією ферментів грибу, які відщеплюють бічні відгалуження геміцелюлози та видозмінюють лігнін; молекули целюлози при цьому майже не змінюються.

Гриби, які використовуються в біотехнології виробництва будівельних матеріалів (гнильні білі гриби) відносяться до їстівних. Створені за їх допомогою деревні плити, на відміну від плит на основі синтетичних зв'язуючих, не являються небезпечними для людини — це екологічно чисті матеріали. Крім того, нову біотехнологію можна вважати не лише екологічно чистою, але і повністю безвідходною.

### **7.3. Особливості технології**

Промислове виробництво ДСП біотехнологічним шляхом складається із трьох основних стадій — підготовка стружок, ферментація та виготовлення плит (рис. 19).

На стадії підготовки стружок відходи деревопереробної промисловості — щєпа, стружка або тирса — завантажуються в приймальний бункер а потім сортуються. Дрібна кондиційна стружка діаметром 1—2 мм надходить в накопичувальний бункер і використовується для отримання зв'язуючої складової, а більш крупні стружки (20 мм) надходять до іншого бункера, звідки одна їх частина після висушування знову направляється на лінію виготовлення ДСП, а інша — знову подрібнюється та використовується повторно.

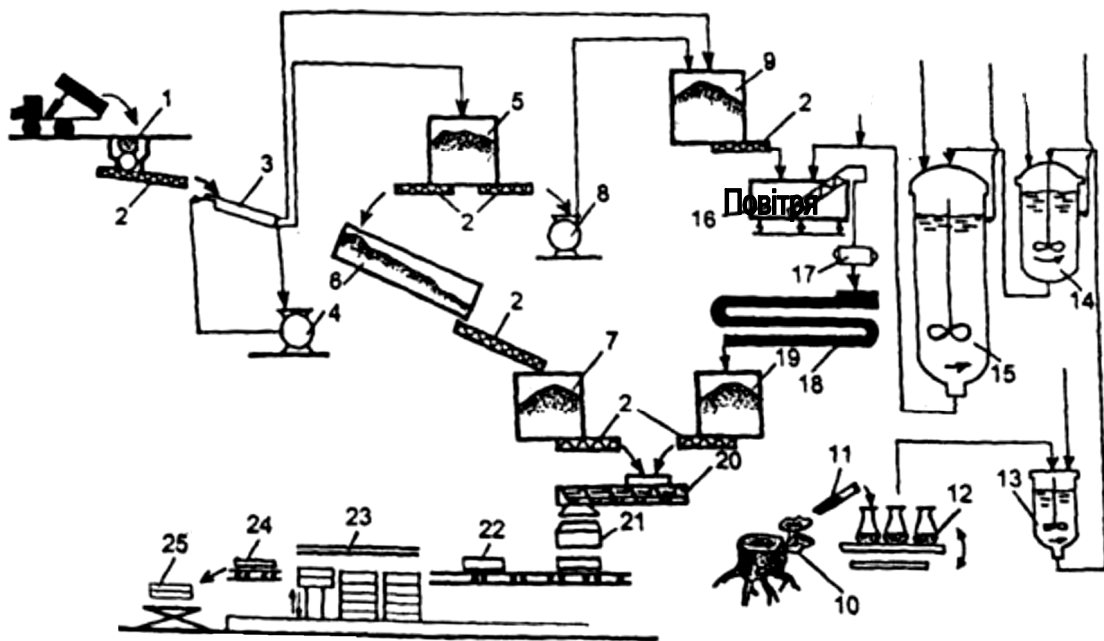


Рис. 19. Схема виробництва ДСП за біотехнологією: 1 — бункер приймання щіпок; 2 — гвинтовий конвейер; 3 — сортувальна машина; 4 — стружковий станок; 5 — бункер вологих кондиційних стружок; 6 — суша-

рка; 7 — бункер сухих кондиційних стружок; 8 — подрібнювач; 9 — бункер дрібних вологих стружок; 10 — дереворуйнуючий гриб; 11 — чиста культура; 12 — качалочні колби; 13 — інокулятор; 14 — засівний апарат (100 дм<sup>3</sup>); 15 — промисловий ферментер (1000 дм<sup>3</sup>); 16 — пристрій для ферментації стружок; 17 — центрифуга; 18 — пневматична сушарка; 19 — бункер сухих ферментованих стружок; 20 — змішувач; 21 — формуюча машина; 22 — плита; 23 — прес; 24 — ДСП; 25 — штабелеукладач плит

На ділянці ферментації в стерильних умовах при температурі 28—30 °С відбувається вирощування гриба методом глибинного культивування. Гриб, виділений із природної білої цвілі, зберігається в пробірках у вигляді чистої культури. Нарощування біомаси гриба на синтетичному живильному середовищі відбувається в декілька стадій — в качалочних колбах, засівних апаратах, в промисловому ферментері ємністю до 1000 дм<sup>3</sup>. Готова культуральна рідина, яка містить міцелій грибу та багато ферментів, а також стружки надходять до пристрою для біоферментації. Процес обробки триває від декількох годин до декількох діб. Після його завершення пульпа із вологими стружками може використовуватися повторно, а попередньо оброблена грибом деревна біомаса висушується та збирається в накопичувальному бункері.

На ділянці вироблення ДСП, з біомаси отримують однорідну формовочну суміш.

Для цього в змішувач в пропорції 1:1 подають суху не оброблену грибом стружку та деревну біомасу. В формуючій машині готова суміш рівномірно розподіляється на піддонах та надходить до пресу, на якому при тиску 30—35 атмосфер та температурі 170—190 °С плити впорядковуються (в ділянках контакту розірваних молекул лігніну та геміцелюлози в результаті дії ви-

соких температур та тиску виникають нові міцні зв'язки між молекулами та утворюється єдина полімерна структура), а після остуджування набувають експлуатаційних властивостей ДСП. В подальшому їх поверхня може бути покращена нанесенням плівчатих матеріалів, таких, наприклад, як деревний шпон.

Окрім описаної біотехнології виробництва ДСП розроблено й інші біотехнології утилізації лігніно- та целюлозомістких субстратів за допомогою мікроорганізмів.

Серед них унікальне місце займають базидіоміцети. Основні представники базидіоміцетів здатні розщеплювати целюлозу та активні щодо утилізації лігніну. Класичним об'єктом цих технологій являється представник базидіоміцетів *Sporotrichium pubverulentum* (*Phanerochaete chrisosporium*). В цикл гідролізу лігніноцелюлозних матеріалів цим грибом включено близько 10 ферментів, серед проміжних продуктів розпаду целюлози та лігніну міститься  $H_2O$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2$ ,  $O$ ; целобіоза, глюкоза, целобіонова кислота, феноксильні радикали.

Комплекс ферментів діє кооперативно, каталізуючи утворення олігоцукридів, целобіози та глюкози, а кінцевим продуктом розпаду являється глюкоза.

В природі біоконверсія та біодеградація лігніноцелюлозних субстратів здійснюється асоціаціями мікроорганізмів.

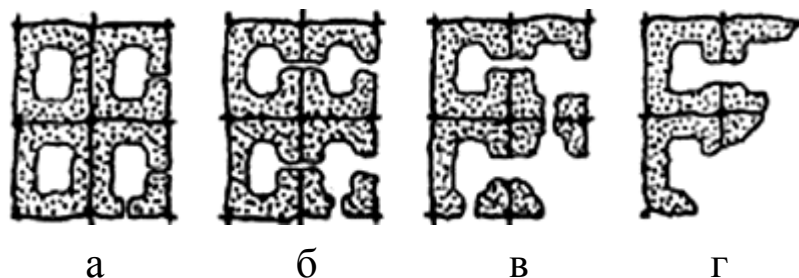


Рис. 20. Схема розпаду натуральних целюлозомістких матеріалів мікроорганізмами

Тому цілком зрозуміло, що саме симбіотичні мікроорганізми на перших порах розглядалися як найбільш перспективні для процесів біоконверсії деревини та сільськогосподарських відходів в білково-вуглеводні продукти. Один із таких процесів оснований на лужній обробці соломи, після якої вона перетворюється в субстрат для *Trichoderma viride*. Дослідження здатності до гідролізу такого субстрату ізольованими целюлазами показали, що ефективність розщеплення делігніфікованої соломи досягає 82 %. Суттєве збільшення виходу білка досягалося при використанні симбіотичної культури *Tr. viride* та швидкоростучої *C. utilis*. Вирощування культури здійснювалось протягом семи-десяти діб.

Більш ефективний процес з використанням *Thermosperma fusca*, описаний Крофордом із співавторами. При вмісті целюлозних відходів в середовищі 5 г/дм<sup>3</sup> близько 90 % матеріалу протягом 24 годин перетворювалося в кінцевий білково-вуглеводний продукт.

Пенсильванським університетом відпрацьований аналогічний процес, оснований на вирощуванні термофільного актиноміцета *Termodictinomyces sp.*, який росте на целюлозному матеріалі різного походження при 55 °С та рН 7,5—7,8.

В процесі вирощування спостерігали активну деградацію целюлози, яка досягала 80 %. Максимальна ступінь деградації целюлози досягалася після обробки лугами. Недоліком процесу являється висока продукція екзогенного білка, який становить близько 50 % біомаси. Аналогічний процес з грибом *Myrothecium verrucaria* описаний для целюлозних відходів після проварювання.



Значний інтерес викликає процес, оснований на вирощуванні бактерій роду *Cellulomonas* (види *uda* та *sp.*) на целюлозних субстратах. На першому етапі рослинну сировину гідролізують лугом, а потім після відокремлення основної маси лігніну матеріал, збагачений целюлозою, використовують для культивування мікроорганізмів. В результаті вирощування *Cellulomonas* вихід біомаси досягає 240 кг на 1 т сировини. Незважаючи на те, що отриманий білок декілька дорожчий за соєвий, біомаса бактерій значно переважає сою за вмістом білка, який становить 55 %.

Недоліком цієї технології являється накопичення лігніну, необхідність сепарації біомаси та відносно невисокий вихід продукту.

Однак процес можна вдосконалити. Інтенсивне дослідження лігнінолітичних грибів дає можливість сподіватися на використання лігніну в процесах мікробної біоконверсії з отриманням білкових та інших продуктів.

Таким чином, в більшості вказаних процесів використовується традиційна лужна делігніфікація целюлози. Делігніфікація та амортизація целюлози суттєво збільшують атакуємість субстрату целюлазами. Однак, лужної обробки деревини недостатньо для підвищення чутливості целюлози до гідролітичного розщеплення ферментами. Тому біотехнологи звернули увагу на удосконалення методів підготовки лігніноцелюлозної сировини шляхом пергідролізу  $\text{CO}_2$ , ферментативного гідролізу, термолізу, автогідролізу-вибуху, радіолізу, делігніфікації, або шляхом комбінування цих методів. В результаті такої обробки сировини целюлоза може зруйнуватися до целобіози та глюкози, а лігнін розщепитися або перейти в розчинну форму (в спирті або лузі).

В результаті цих процесів компоненти деревини стають висококочувливими до ферментативного розпаду.

Ферментативний розпад компонентів деревини, який здійснюється в природі, як уже зазначалося, асоціаціями мікроорганізмів і протікає дуже повільно.

До факторів, які уповільнюють цей процес, слід віднести: кристалічну структуру полімерів (індекс кристалічності); компактність структури полімерів, яка обмежує поверхню, що атакується ферментами; присутність лігніну (лігнін являється фізичним бар'єром для дії ферментів і відноситься до найбільш стійких компонентів деревини); полімерність субстрату (від числа мономерних сегментів залежить число актів ферментативного розщеплення).

В природі зустрічаються мікроорганізми, які мають окремі каталітичні функції, а також ті, які володіють всіма основними ферментативними системами розщеплення та утилізації полімерів рослинних тканин (це, наприклад, базидіоміцети, про які вже зазначалося вище).

Однак проблему ферментативного гідролізу можна вирішити і шляхом використання ферментних препаратів геміцелюлаз та целюлаз із *Tr. reesei* та *Asp. niger*. Ступінь деструкції геміцелюлози та целюлози ферментними препаратами може досягати 80—95 %. Однак ферментні препарати досить дорогі і їх використання призводить до значного зростання вартості білка. Пошуки збільшення продукції целюлаз найбільш перспективними штамми грибів не принесли певних успіхів. Тому почали енергійно розвиватися дослідження з молекулярного клонування генів целюлаз. В якості донорів генів целюлаз використовують бактерії

родів *Cellvibrio*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Rumonococcus*, *Tr. reesei*.

Із основних напрямків генетичної інженерії в галузі біоконверсії рослинної сировини слід виділити наступні:

1. Конструювання штамів мікроорганізмів, здатних з високою ефективністю утилізувати під час росту та ферментації основні компоненти гідролізатів деревини.

2. Конструювання штамів мікроорганізмів, що мають високу стійкість до токсичних компонентів гідролізатів деревини, а також використання цих речовин в якості джерела вуглецю.

3. Конструювання суперпродуцентів целюлаз та геміцелюлаз для прямої та непрямой біоконверсії та ферментації поліцукридів рослин.

4. Отримання, вивчення та конструювання мікроорганізмів, активних щодо деструкції лігніну та інтермедіатів його розпаду.

5. Конструювання нового покоління штамів для гідролізої та інших галузей промисловості на основі сахароміцетів.

6. Часткове або повне суміщення виробництва білка одноклітинних мікроорганізмів з масштабним виробництвом ферментів, вітамінів, пігментів, нуклеотидів, антибіотиків тощо на основі нового покоління штамів, отриманих шляхом гібридизації та молекулярного конструювання.

7. Отримання гібридів дріжджів та рослинних клітин для суміщення виробництва лікарських сполук та кормового білка.

8. Поліпшення властивостей популяції целюлолітичних мікроорганізмів, які проживають в рубці жуйних тварин та використовуються для отримання компосту, біогазу.

Що ж конкретно необхідно зробити для вирішення поставлених задач? Першим етапом будь-якої генно-інженерної роботи являється клонування необхідного гену. Так як целюлази представляють складний комплекс ферментів, то в цьому випадку необхідно клонувати гени всіх ферментів — і компонентів комплексу, що ускладнюється рядом обставин.

Для досягнення ефективного гідролізу целюлози необхідні ферменти, щонайменше, трьох типів — ендоглюканази (ЕГ), целобіогідролази (ЦБГ) та  $\beta$ -глюкозидази (БГ), причому найбільш ефективний гідроліз кристалічної целюлози здійснюється при синергічній взаємодії всіх цих ферментів. Більшість мікроорганізмів має по декілька ферментів кожного типу — в цілому їх загальна кількість може перевищувати 20 ферментів.

Клонувати гени всіх ферментів досить важко, а відсутність чіткої картини щодо механізму ферментативного гідролізу целюлози не дає можливості визначити мінімальний набір цих ферментів, необхідних для ефективної роботи целюлозного комплексу. Крім того, ці комплекси, у різних мікроорганізмів незбалансовані, їх необхідно відкоригувати, тобто гени, відповідальні за синтез певних ферментів комплексу, бажано отримати із різних організмів.

Суттєве значення для генетичної інженерії целюлаз має вибір організма-донора для клонування генів, який визначається властивостями синтезованих цим організмом целюлазних ферментів. Найбільш жорсткі вимоги пред'являються до ферментів, які планується використати в технологічних процесах. Вони повинні володіти наступними властивостями:

- високою термостабільністю (час перетворення протягом декількох діб при 60—65 °С);
- низьким інгібуванням кінцевим продуктом реакції;
- високою питомою активністю;
- високою константою адсорбції на целюлозі.

Нині невідомий організм, здатний продукувати ідеальний комплекс. Целюлази *T. reesei* та інших грибних комплексів мають високу питому активність та здатність до адсорбції, але низьку термостабільність та сильно інгібуються кінцевими продуктами реакції.

Останнім часом все більша увага приділяється бактеріальним целюлазам, які продукуються *Clostridium thermocellum*, *Thermomonospora sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Streptomyces flavogriseus*, *E. coli* та іншими бактеріями.

Перші дослідження з клонування генів целюлаз були розпочаті в 1980—1981 р., і за останні 20 років досягнуто значного прогресу в цій галузі.

Для клонування генів целюлаз створено банк генів ДНК відповідних мікроорганізмів. Системи відбору клонів з генами целюлаз практично у всіх випадках базувалися на їх експресії в клітинах організма-рецепієнта, тобто в клітинах проводилося тестування целюлазної активності.

Були досягнуті певні успіхи з клонування ендоглюканази *Thermomonospora UX*; клоновано гени целюлаз із *Clostridium fimi*, целюлазний комплекс із *Clostridium thermocellum*, клоновано гени екстремально термофільної бактерії *Caldocellum saccharoliviticum* та ін. Для перенесення клонованих генів, як правило, використо-

ували плазмиду pBR 322, за допомогою якої трансформували клітини *E. coli*.

Але практично у всіх роботах з клонування целюлазних генів *E. coli* спостерігався низький рівень експресії та відсутність секреції синтезованих ферментів. Тому останнім часом увагу генних інженерів все більше привертає конструювання целюлолітичних дріжджів (представників роду *Candida*, сахароміцетів), використання яких може привести до створення нових, менш енергоємних процесів гідролізу рослинної сировини та до отримання в подальшому нових кормових та білкових препаратів.

Аналіз досліджень та проектів в галузі біоконверсії рослинної сировини свідчить про те, що точне сполучення методів фізико-хімічної переробки рослинної сировини, його ферментативної та мікробіологічної конверсії дасть можливість створити досконалий та високоефективний процес комплексного використання цього джерела енергії та речовин вже в недалекому майбутньому.

### **Контрольні запитання**

1. Охарактеризуйте особливості виробництва деревностружкових плит за біотехнологією.
2. Як вирішується проблема утилізації фенолів біотехнологічним шляхом?
3. Які класи грибів використовуються в біотехнології виробництва будівельних матеріалів?

4. Які біотехнології утилізації лігніно- та целюлозовмістких субстратів ви знаєте?
5. Дайте визначення основних напрямків генетичної інженерії в галузі біоконверсії рослинної сировини.
6. Які чинники впливають на ефективність гідролізу целюлози?
7. В чому полягають труднощі з клонування целюлазних генів?

## **Глава 8. КОРМОВИРОБНИЦТВО**

### **8.1. Особливості аеробних і анаеробних процесів біоконверсії рослинних субстратів**

Рослинна біомаса в наш час розглядається як найбільш перспективне постійно оновлюване джерело органічної речовини, яке не лише забезпечує харчові потреби людини, але і слугує сировиною для промисловості та являється джерелом значної частини засвоюваної енергії.

Якщо виходити з принципу, що енергію (кормові одиниці) та білок кормів повинне забезпечити сучасне інтенсивне землеробство, то задача біотехнології заключається в створенні процесів отримання кормових добавок типу незамінних амінокислот, вітамінів, антибіотиків, а також в реалізації мікробіологічних процесів для консервування сільськогосподарської продукції та раціональної конверсії менш цінних компонентів в більш цінні.

Крім того, необхідно забезпечити отримання кормів не лише для жуйних, але і для моногастричних тварин. Тому перед біотехнологіями стоїть задача виділити із зеленої маси протеїн та конвертувати в доступну для моногастричних тварин целюлозу та геміцелюлозу.

Біоконверсію рослинних матеріалів можна здійснити як в аеробному, так і в анаеробному процесі. Вихід мікробної біомаси значно вищий в аеробному процесі, але акумуляція енергії в кормах в результаті аеробного процесу становить близько 60 % проти 90 % та вище у випадку анаеробного бродіння (табл. 18).

**Таблиця 18. Баланс вуглецю та енергії при аеробній та анаеробній ферментації органічних субстратів**

Показник	Аеробний процес	Анаеробний процес
Вуглець	Близько 50 % конвертується в біомасу мікроорганізмів та 50 % в CO <sub>2</sub>	Близько 95 % перетворюється в продукт (біогаз) та 5 % — в біомасу
Енергія	Близько 60 % переходить в біомасу мікроорганізмів та 40 % втрачається при нагріванні.	Близько 90 % енергії субстрату переходить в біогаз, 5—7 % споживається для росту біомаси та 3—5 % — втрачається на нагрівання

Необхідно зазначити, що за технічним оснащенням аеробні процеси значно складніші ніж анаеробні; їх організація та експлуатація обладнання обходяться значно дорожче.

Субстратами біоконверсії являється зелена маса рослин, фуражна мука, солома та відходи ферм.



## **8.2. Фракціювання зеленої маси з використанням мікробіологічних процесів**

Одною із причин відставання тваринництва, зокрема молочної галузі, являється слабкість кормової бази.

В більшості господарств корми містять менше протеїну, ніж рекомендується вченими. Приходиться таких кормів скормлювати тваринам все більше та більше. Так, наприклад, в Фінляндії на центнер молока витрачається 0,8 центнерів кормових одиниць, а в нас — майже вдвічі більше. Крім того, у нас врожайність високобілкових кормових культур (таких як рапс) майже вдвоє нижча, ніж, наприклад, у Швеції.

Одним із способів збільшення кормової цінності кормів являється їх протеїнізація шляхом мікробіологічної біотрансформації.

Розглянемо технологію мікробіологічного фракціювання.

Задачею фракціювання являється відокремлення від зеленої маси разом із соком частини розчинного білка для моногастричних. Сировиною для даного процесу може слугувати люцерна, рапс, різнотрав'я, бадилля та інші види рослинної біомаси.

Подрібнену масу відтискають на пресах, потім за технологією Пірі сок нагрівають при 85—90 °С, зкоагульований білок відокремлюють центрифугуванням та висушують. В сухому концентраті міститься близько 50 % білка, каротин, вітаміни, інші біологічно активні речовини та невелика кількість клітковини. Залишок рідкої фракції — бурштиновий сік упарюють у вакуум-апаратах та використовують як зв'язуючий агент при гранулюван-

ні сушеного жому, призначеного для корму жуйним. За деякими технологіями цей сік скормлюють тваринам у рідкому вигляді.

Виробництво кормових протеїнових концентратів із зеленої маси рослин здійснюється в багатьох країнах — в Угорщині (Verex), Франції (Proxan), Іспанії (Arro-Alfa), Латвії, Естонії, Росії.

В зоотехнічних дослідах на різних тваринах показано, що білком із зеленої маси рослин можна замінити 30—40 % протеїну сої або інших традиційних білкових добавок. Крім того, протеїновий концентрат містить високий вміст каротину та інших біологічно активних речовин.

Спосіб переробки зеленої маси, розроблений Verex, передбачає використання бурштинового соку для вирощування дріжджів. Крім того, цей сік можна застосовувати при силосуванні соломи, зброджувати в анаеробних умовах з кислотоутворюючими бактеріями, що дозволяє після упарювання отримувати або ж 10—20 % концентрат органічних кислот — консервант для кормовиробництва, або (після збагачення азотом) кормову добавку.

Сік можна використовувати і як компонент поживного середовища для отримання гідролітичних ферментів.

В Інституті мікробіології ім. А. Кірхенштейна (Латвія) був розроблений спрощений енергозберігаючий процес переробки зеленої маси, названий ТПФ-1. В основі цього процесу лежить анаеробна біоконверсія вуглеводів соку та жому в органічні кислоти та отримання стабілізованих продуктів без висушування.

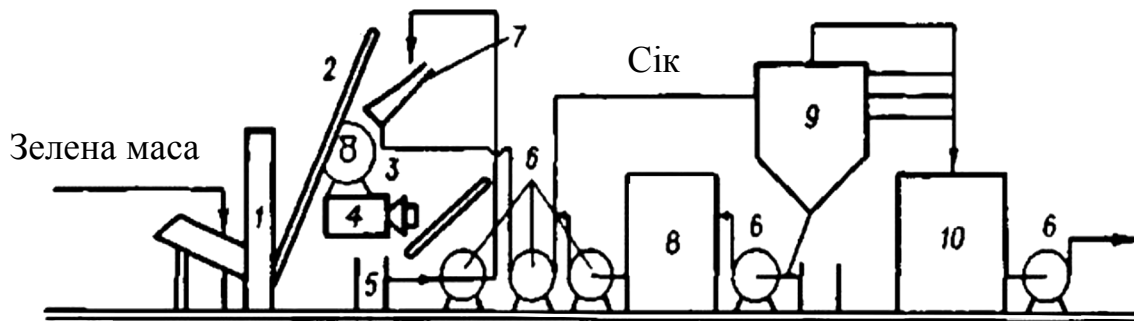


Рис. 21. Фракціювання зеленої маси бобових за технологією ТГРР-1: 1,2 — транспортери зеленої маси; 3 — подрібнювач-мацератор; 4 — шнек-прес; 5 — збірник соку; 6 — насоси; 7 — дугове сито-відокремлювач волокон; 8 — збірник коагуляту; 9 — ферментер-коагулятор; 10 — збірник ферментованого соку

Кислотоутворюючі та протеолітичні епіфітні бактерії рослин переходять в сік. Під час спонтанного зброджування соку при кімнатній температурі (20 °С) вже через 48 годин титр кислотоутворюючих бактерій досягає 500—700 млн/см<sup>3</sup>, що становить 98—99 % від загальної кількості бактерій, тобто ці мікроорганізми пригноблюють всі інші види мікроорганізмів.

Під час зброджування вуглеводи конвертуються в основному в органічні кислоти, при цьому рН середовища досягає 4,0—4,75. Співвідношення молочної та оцтової кислот через 48 годин спонтанної ферментації становить близько 3:1. Зміна рН середовища призводить до коагуляції білків. Протягом доби в нижній частині апарату утворюється шар коагуляту, який займає 1/4—1/3 його висоти. Вміст сухої речовини в коагуляті становить 10—15 %, в тому числі істинного білка — 25—45 %. Білок ферментативного коагуляту збагачений метіоніном, що пояснюється присутністю бактеріальних клітин.

В результаті ферментативних процесів частина компонентів соку переходить в газоподібний стан, тому мають місце втрати сухої речовини соку, які можуть становити за 48 годин ферментації 5—8 %.

При тривалому зберіганні ферментованого соку при 15—25 °С сухі речовини можуть частково витрачатися на забезпечення життєдіяльності мікробних клітин.

Протягом першого тижня спонтанного бродіння високобілкового соку відбувається протеоліз білка. За 3—4 доби гідролізується до 30 % протеїну. Під час ферментації частково інактивуються сапоніни (на 50—60 %), інгібітор трипсину та ряд інших небажаних домішок.

Використання заквасок молочнокислих бактерій (монокультура *Lactobacillus phantarum* або спеціальна асоціація) прискорює та стабілізує процес анаеробної ферментації.

При дослідженні процесу силосування жому встановлено позитивний вплив заквасок кислотоутворюючих бактерій на якість силосу. Необхідно відзначити, що жом зеленої маси має знижену, у порівнянні із звичайною масою для силосування, вологість, що сприяє утворенню переважно молочної кислоти.

Таким чином, механічне фракціювання зеленої маси робить кормовиробництво менш залежним від кліматичних умов; кормова цінність жому збільшується за рахунок подрібнення маси та руйнування рослинних клітин. Ферментований сік та коагулят, які отримують за цією технологією, використовують як кормову добавку влітку (сік) та взимку (коагулят).

Енергозатрати за даною технологією переробки зеленої маси майже на порядок нижчі, ніж при штучному висушуванні трав'яної муки.

### **8.3. Отримання мікробного протеїну із місцевої сировини**

Вміст протеїну в хімічно обробленій соломі можна підвищити до 10—12 % шляхом аеробної та анаеробної ферментації з використанням міцеліальних грибів *Trichoderma lignorum* (та інших видів). Процес збагачення білком целюлозолігнінових матеріалів прискорюється при використанні асоціацій мікроміцетів та дріжджів. Так, в результаті кислотної обробки соломи отримують гідролізат, на рідкій фракції якого в умовах зануреного культивування вирощують гриб *Polyporus squamosus*, отримуючи біомасу в концентрації 15—18 г/дм<sup>3</sup>, що містить до 60 % сирого протеїну. Негідролізований залишок соломи використовують для виготовлення компостів.

Збагачення білків фуражної муки може бути досягнуто шляхом вирощування *Endomycopsis filuliger*. Це дріжджеподібний гриб, якому властива амілолітична активність, тому він здатний накопичувати біомасу під час культивування на крохмалевмісних субстратах без їх попереднього оцукрювання. В умовах зануреного культивування на середовищі, що містить ячмінну муку (70 г/дм<sup>3</sup>) та мінеральні солі, протягом 16 годин спостерігається збільшення вмісту протеїну в сухій речовині з 12 до 19 %. Одночасно в середовищі накопичуються амілолітичні ферменти

од. /100 см<sup>3</sup>: амілаза — 8—10; декстриназа — 8—10; глюкоамілаза — 40—50. По закінченню ферментації клітини інактивують прогріванням середовища до 60—65 °С. Ця технологія наразі використовується в Латвії. Використання в раціонах свиней 2—3 дм<sup>3</sup>/добу культуральної рідини призводить до збільшення середньодобових показників ваги на 7—10 %.

Інститутом мікробіології та вірусології Казахстану розроблена технологія дріжджування крохмалевмісткої сировини з використанням для його оцукрювання зеленого ячмінного солоду та спеціальних дріжджевих культур.

Після дріжджування масу скормлюють молочній худобі разом з пропареною соломою. Використання корму призводить до збільшення жирності молока від 3,6 до 3,9 %.

Інститутом ВНДІбіотехніка (Москва) був розроблений метод протеїнізації корму після його попередньої обробки гідролітичними ферментами.

В Інституті мікробіології ім. А. Кірхенштейна (Латвія) та у Відділі мікробіології АН Молдови створені установки на базі типових кормозмішувачів для протеїнізації кормів за умов твердофазної ферментації.

Таким чином, із зеленої маси, зерна та соломи, використовуючи мікробіологічні процеси, за умов біоцехів можна збільшити ресурси кормового протеїну для моногастричних тварин.

## **Контрольні запитання**

1. В чому полягають переваги та недоліки аеробної та анаеробної біоконверсії рослинної біомаси?
2. Як реалізується механізм протеїнізації шляхом мікробіологічної біотрансформації?
3. Які мікроорганізми приймають участь в анаеробній ферментації кормів?
4. В чому заключається роль молочнокислих та кислотоутворюючих бактерій в процесі силосування зелених кормів?
5. Які хімічні перетворення відбуваються при анаеробному зброджуванні кормів?

# Зміст

Вступ.....	3
<b>Частина 1. Біотехнологія харчових продуктів.....</b>	<b>5</b>
Глава 1. Виробництво харчових кислот.....	5
1.1. Виробництво харчового оцту.....	7
1.1.1. Загальна характеристика виробництва.....	7
1.1.2. Історія виробництва.....	8
1.1.3. Апаратурне оформлення процесу.....	12
1.1.4. Технологічні витрати.....	25
1.2. Технологія виробництва молочної кислоти .....	26
1.2.1. Характеристика кислоти.....	26
1.2.2. Характеристика продуцентів.....	32
1.2.3. Особливості технології.....	37
1.3. Мікробіологічний синтез глютамінової кислоти....	42
1.3.1. Характеристика кислоти.....	42
1.3.2. Характеристика промислових продуцентів моло- чної кислоти.....	43
1.3.3. Особливості технології.....	45
1.4. Технологія виробництва лимонної кислоти.....	53
1.4.1. Історія відкриття і виробництво.....	53
1.4.2. Вимоги, які пред'являються до харчової лимонної кис- лоти.....	55
1.4.3. Характеристика мікроорганізмів — продуцентів лимон- ної кислоти.....	56



1.4.4. Особливості технологічного процесу.....	57
1.4.5. Культивування на поверхні твердого середовища	58
1.4.6. Поверхневе культивування на рідкому середовищі.....	59
1.4.7. Застосування лимонної кислоти.....	65
Глава 2. Біотехнологія напоїв .....	67
2.1. Соки та напої, отримані шляхом зброджування ...	67
2.1.1. Характеристика продуктів.....	67
2.2. Технологія виробництва пива .....	74
2.2.1. Сучасний стан ринку пива в Україні.....	74
2.2.2. Характеристика продукту.....	75
2.2.3. Особливості технології.....	80
2.2.4. Характеристика пивних дріжджів.....	90
2.2.5. Новітні технології виробництва пива.....	93
2.3. Особливості біотехнології квасу .....	101
2.3.1. Характеристика квасу.....	101
2.3.2. Особливості технологічного процесу.....	102
2.3.3. Характеристика продуцентів.....	105
Глава 3. Мікробіологічна технологія виробництва спирту.....	115
3.1. <i>Сучасний стан вітчизняної галузі виробництва спирту</i> .....	115
3.2. Характеристика сировини.....	115
3.3. Підготовка сировини у виробництві спирту.....	120
3.3.1. Підготовка зерна.....	121
3.3.2. Підготовка картоплі.....	

3.3.3. Підготовка меляси.....	121
3.3.4. Підготовка оцукрюючих матеріалів.....	125
3.3.5. Гідродинамічна та теплова обробка замісу....	126
3.4. Особливості технологічного процесу.....	129
3.4.1. Оцукрювання крохмалевмісної сировини.....	131
3.4.2. Характеристика продуцентів.....	134
3.4.3. Збродження оцукреної маси.....	134
3.4.4. Виділення спирту із бражки та його очищення....	135
3.4.5. Утилізація відходів спиртових заводів.....	140
<b>Частина 2. Агробіотехнологія.....</b>	<b>143</b>
Глава 1. Виробництво кормових дріжджів.....	144
1.1. Історія виробництва.....	151
1.2. Характеристика готового продукту.....	151
1.3. Технологія виробництва кормових дріжджів на нафтових дистиллятах.....	151 152
1.4. Вирощування кормових дріжджів на післядріж- джевій бражці.....	155
1.5. Вирощування кормових дріжджів на мелясній барді.....	159
1.6. Очищення стічних вод дріжджевих заводів.....	
Глава 22. Біоконверсія відходів плодоовочевої продукції.....	160 164
2.1. Характеристика сировинної бази.....	
2.2. Особливості технології.....	168
Глава 3. Виробництво біоінсектицидів.....	

3.1. Загальна характеристика інсектицидів.....	168
3.2. Характеристика продуцентів біоінсектицидів..	
Глава 4. Біотехнологія каротиноїдів.....	172
4.1. Історія відкриття та вивчення каротиноїдів.....	175
4.2. Біологічні продуценти каротиноїдів.....	177
4.3. Особливості сучасної технології промислового вирощування.....	186
4.3.1. Характеристика сировини.....	190
4.3.2. Особливості технології.....	
4.4. Загальні тенденції розвитку виробництва кароти- ноїдних препаратів.....	197
Глава 5. Генна інженерія рослин.....	198
Глава 6. Трансгенні тварини.....	
6.1. Історія створення трансгенних тварин.....	205
6.2. Основи трансгенезу.....	210
6.2.1. Клонування методом перенесення ядер.....	232
6.2.2. Технології отримання трансгенних мишей.....	232
6.2.3. Використання вірусних векторів.....	236
6.2.4. Метод мікроін'єкцій ДНК.....	236
6.2.5. Перенесення генів за допомогою штучних дріж- джевих хромосом.....	240
6.2.6. Трансгенез великої рогатої худоби, птахів та риб..	243
Глава 7. Лісопереробна біотехнологія.....	
7.1. Характеристика сировинної бази.....	246

7.2. Характеристика продуцента.....	248
7.3. Особливості технології.....	252
Глава 8. Кормовиробництво.....	252
8.1. Особливості аеробних і анаеробних процесів біо- конверсії рослинних субстратів.....	253 254
8.2. Фракціювання зеленої маси з використанням мі- кробіологічних процесів.....	265
8.3. Отримання мікробного протеїну із місцевої си- ровини.....	265
Література .....	266
	270
	273

## Література

1. Альберт Сассон. Биотехнология: Сверхшения и надежды.: — М.: Мир, 1987.
2. Баев А.А. Биотехнология. — М.: Наука, 1984.
3. Беккер М.Е. Введение в биотехнологию. — М.: Пищевая промышленность, 1978.
4. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология — М.: Наука, 1986.
5. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология, — М.: Из-во МГУ, 1989.
6. Б. Глик, Дж. Пастернак Молекулярная биотехнология. Принципы и использование. М.: Мир, 2002.
7. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. — Киев: Наукова думка, 1984.
8. Дубинин Н.П. Новое в современной генетике. — М.: Наука, 1986.
9. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. — СПб.: ИФ „Наука”, 1995.
10. Жвирблянская А.Ю., Бакушинская О.А. Микробиология в пищевой промышленности. — М.: Пищевая промышленность, 1963с.
11. Кантере В.М. Теоретические основы микробиологических производств. — М.: ВО „Агропромиздат”, 1990.

12. Красота В.Ф., Завертяев Б.П. и др. Биотехнология в животноводстве. — М.: Колос, 1994.
13. Мосичев М.С., Складнев А.Л., Котов Б.Г. Общая технология микробиологических производств. — М.: Лёгкая и пищ. пр-сть, 1982.
14. Муромцев Г.С., Прокофьев М.И. и др. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. — М. Мир, 1987.
15. Непрерывное культивирование микроорганизмов /Под редакцией И. Малена и З. Фенцля/ М.: Пищевая промышленность, 1968.
16. Промышленная микробиология /Под ред. Егорова Н.С./ М.: Высшая школа, 1989.
17. Пищевая промышленность, 1/1998, С. 6—7.
18. Пищевая промышленность, 1/2002, С. 12—15.
19. Пищевая промышленность, 1/1997, С. 33—36.
20. Сельскохозяйственная биотехнология /Под ред. В.С. Шевелухи. — М.: Высшая школа, 1998.
21. Технология и оборудование пищевых производств /Под редакцией Н.И. Назарова/ М.: Пищевая промышленность, 1977, С. 238—299.
22. Харчова і переробна промисловість 7/2002, С. 12—13.

**Наукове видання**

**Ірина Володимирівна Бондар,  
Віталій Михайлович Гуляєв**

# ***ПРОМИСЛОВА МІКРОБІОЛОГІЯ.***

Харчова і агробіотехнологія

## **Навчальний посібник**

Підписано до друку 20.04.2004. Формат 60×84 1/16  
Папір друк. Друк – різнограф. Ум.-друк. арк. 12,99.  
Облік. вид. арк.– 12,46. Тираж – 200. Зам. № 942

Ціна договірна.

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до державно-  
го реєстру видавців серія ДК № 1349

Друкарня  
51918, Дніпродзержинськ,  
ДДТУ, вул. Дніпробудівська, 2