



ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Доцент кафедры Технологии органического синтеза

к.х.н. Токарева Мария Игоревна

Культивирование микроорганизмов

- **Культивирование** – выращивание микроорганизмов на специальных питательных средах. Культивирование проводят в лабораторных и производственных условиях с целью:
 - количественного и качественного анализа микрофлоры различных объектов: пищевых продуктов, воды, воздуха и т.д.;
 - изучения свойств микроорганизмов и их идентификации;
 - выращивания полезных микроорганизмов (приготовление заквасок, получение продуктов микробиологического синтеза, ферментов, белка и т. д.).

Биотехнологические продукты микроорганизмов - продуцентов

- сами клетки как источник продукта
- крупные молекулы (ферменты, токсины, антигены, антитела, пептидогликаны и др.)
- низкомолекулярные метаболиты, необходимые для роста клеток (аминокислоты, витамины, нуклеотиды, органические кислоты).
- антибиотики, алкалоиды, токсины, гормоны

Основные продукты, которые получают при помощи биотехнологии

В медицине	В ветеринарии и с/х	В пищевой промышленности	В химической промышленности и энергетике
Антибиотики Витамины Аминокислоты Гормоны Вакцины Компоненты крови Диагностические препараты Нуклеиновые кислоты Противоопухолевые агенты	Кормовой белок Пищевые антибиотики Витамины Гормоны Вакцины Биологические средства защиты растений Инсектициды	Аминокислоты Пищевой белок Ферменты	Ацетон Этилен Бутанол Биогаз Спирты

- Известно много процессов культивирования микроорганизмов. Они различаются по:
 - состоянию питательной среды (поверхностные и глубинные);
 - наличию или отсутствию перемешивания (динамические или статические);
 - содержанию кислорода (аэробные или анаэробные);
 - способу действия (закрытые, чаще периодические, и открытые, чаще непрерывные);
 - количеству ферментеров (одно-, дву- и многостадийные);
 - способу управления (хемотратные, турбидостатные и другие).
- Культуры микроорганизмов можно подразделять на **открытые и закрытые системы**.
- **Открытая система** – это система, в которую все компоненты могут поступать или покидать ее.
- **Закрытой** называют такую **систему**, в которой хотя бы один из существующих компонентов не может ни поступать в систему, ни покидать ее.

- Для выращивания м/о продуцентов применяют два способа культивирования – **поверхностный** и **глубинный (погружённый)**.
- **Поверхностный способ культивирования** заключается в том, что м/о выращиваются на поверхности тонкого слоя жидкости или твердого субстрата и применяется при производстве белка, белково-ферментативных препаратов и концентратов.
- **Выращивание м/о глубинным способом** происходит во всем объеме жидкой питательной среды в специальном аппарате – **ферментаторе или биореакторе**.
- Его преимущества перед поверхностным культивированием:
 - Меньше затрат труда и занимаемых площадей;
 - Меньше риск инфекции;
 - Более точный контроль и более легкая автоматизация процесса;
 - Получают более высокие выходы продуктов, исходя из веса сухой биомассы.

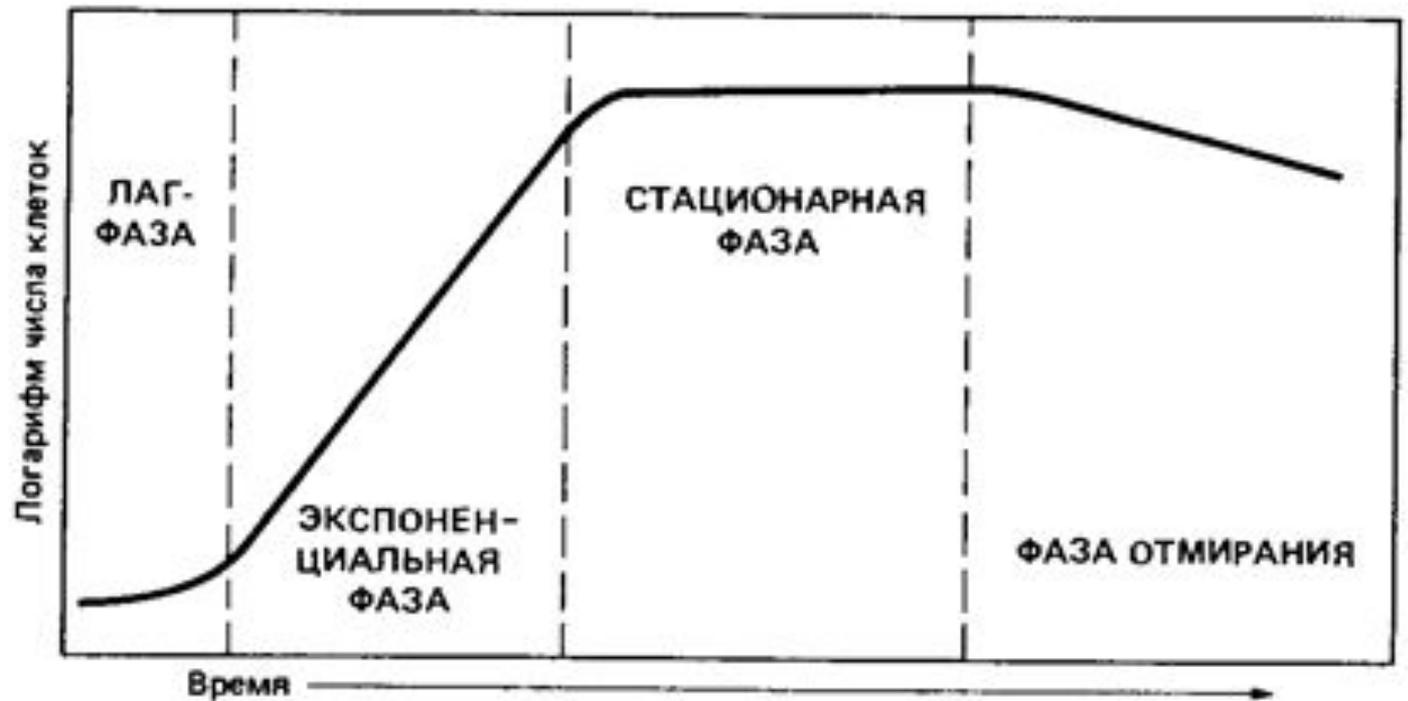
Различают два вида культивирования микроорганизмов:

- **Периодическое культивирование** – при культивировании в сосуд загружают сразу весь объем питательной среды и вносят посевной материал. Выращивание м/о проводят в оптимальных условиях (t , рН, аэрация) в течение определенного времени, после чего процесс останавливают и выделяют целевой продукт.
- **Непрерывное культивирование или метод проточных культур** – характеризуется непрерывным введением питательного раствора при одновременном удалении продуктов метаболизма и части бактериальной суспензии.

- Следовательно, **все непрерывные культуры**, в которых происходит, с одной стороны, приток питательной среды, с другой – отток биомассы и других продуктов, **являются открытыми системами.**
- **Простая периодическая культура**, содержащая ограниченное первоначальное количество питательного субстрата, **служит примером закрытой системы.**
- В закрытой системе скорость роста биомассы должна стремиться к нулю либо из-за недостатка субстрата, либо из-за непереносимости токсичного продукта при его дальнейшем накоплении.
- Следовательно, такие системы находятся в неустойчивом состоянии. В отличие от этого в открытых системах всегда есть возможность установления стабильного состояния.

Рост микроорганизмов в периодической культуре

- При внесении микроорганизмов в питательную среду они обычно растут до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых им компонентов среды не достигнет минимума, после чего рост прекращается.
- Если на протяжении этого времени не добавлять питательных веществ и не удалять конечных продуктов обмена, то получим так называемую **периодическую культуру** (популяцию клеток в ограниченном жизненном пространстве).
- Рост в такой «закрытой системе» подчиняется закономерностям, описываемым «кривой роста».



Кривая роста бактериальной культуры.

- Кривая, описывающая зависимость логарифма числа живых клеток от времени, называется **кривой роста**. Типичная кривая роста имеет S-образную форму и позволяет различить несколько **фаз роста**, сменяющих друг друга в определенной последовательности.

● Фазы роста:

- начальная (или лаг-) фаза,
- экспоненциальная (или логарифмическая) фаза,
- стационарная фаза,
- фаза отмирания.

В **начальной фазе роста** клеткам приходится сначала адаптироваться к новым условиям выращивания.

Экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток. В этой фазе происходит выделение **метаболитов** (низкомолекулярных органических соединений), которые необходимы клетке для роста, развития и размножения – **первичные метаболиты (аминокислоты, органические кислоты, витамины, нуклеотиды)**.

Стационарная фаза роста наступает тогда, когда число клеток перестает увеличиваться. Скорость роста зависит от концентрации субстрата - при уменьшении этой концентрации, еще до полного использования субстрата, она начинает снижаться. Поэтому переход от экспоненциальной фазы к стационарной происходит постепенно.

В этой фазе происходит выделение **вторичных метаболитов**, которые не являются необходимыми для роста и развития продуцента – **антибиотики, гормоны, алкалоиды, токсины** и др.

В **фазе отмирания** число живых клеток может снижаться экспоненциально. Клетки **лизуются** под действием собственных ферментов (**автолиз**).

Недостатки периодического культивирования:

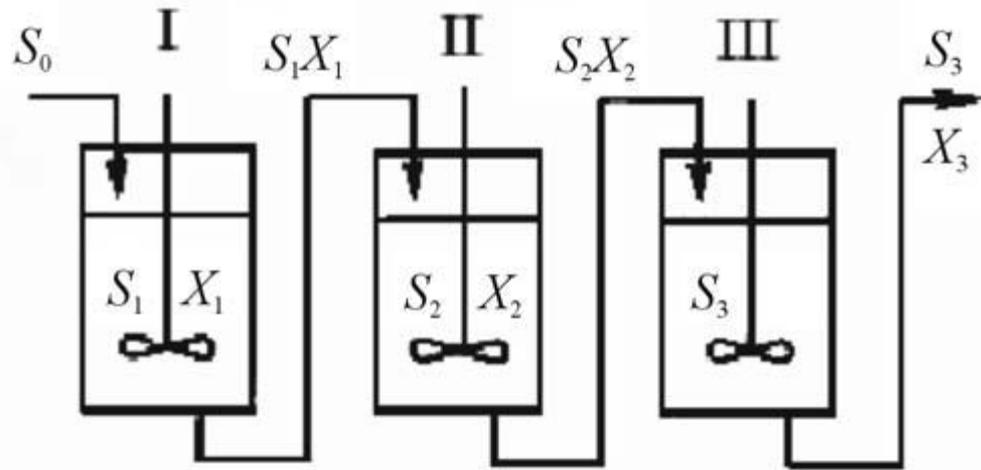
- Не используется в полной мере способность м/о к максимальному размножению, часть времени уходит на лаг-фазу и период замедления роста. Тратится время на загрузку и выгрузку аппарата, вспомогательные операции.
- Клетки все время находятся в меняющихся условиях. Вначале в питательной среде имеются в избытке все питательные вещества (ингибирование высокими концентрациями), затем постепенно наступает недостаток питания и накопление продуктов жизнедеятельности м/о, ингибирующих рост клеток.

- 
- Фазу экспоненциального роста можно увеличить (т.е. избежать ингибирования высокими концентрациями), если то же количество питательных веществ вводить дробно (постепенно). Этот метод называется **культивирование с дробным дозированием субстрата**.
 - Также эту фазу можно продлить, снизив концентрацию продуктов жизнедеятельности путем удаления через определенные промежутки времени части культуральной жидкости и добавления такого же количества свежей питательной среды – **это отъемно-доливной метод культивирования**.

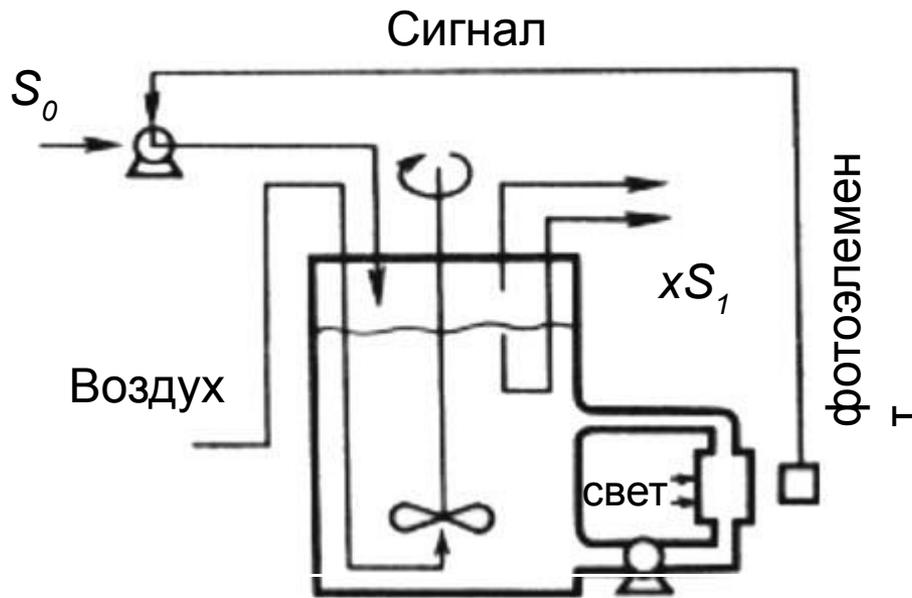
Непрерывное культивирование

- В периодической культуре условия все время меняются: плотность популяции бактерий возрастает, а концентрация субстрата уменьшается.
- Во многих случаях представляется, однако, желательным, чтобы клетки могли долгое время находиться в фазе экспоненциального роста или стационарной фазе.
- В какой-то мере приблизиться к такому положению можно, многократно и достаточно часто перенося клетки в новую питательную среду.
- Той же цели было бы, очевидно, проще достичь, если в сосуд, содержащий популяцию растущих бактерий, непрерывно вводить новый питательный раствор и одновременно удалять из него соответствующее количество бактериальной суспензии.

- Именно такой метод положен в основу непрерывного культивирования.
- Непрерывное культивирование можно проводить в режиме **полного вытеснения** или **полного смешения**.
- Непрерывное культивирование в режиме полного смешения осуществляют в специальных аппаратах двух типов:
- **хемотрат** (рост микроорганизмов регулируется концентрацией лимитирующих веществ питательного субстрата – источников С, азота, витаминами, микроэлементами и т.п.);
- **турбидостат** (процесс контролируется по изменению концентрации микроорганизмов путем измерения оптической плотности, мутности в прозрачных питательных средах).



- Хемостат базируется на использовании биореактора, в который с постоянной скоростью подаётся питательная среда с микроорганизмами и одновременно с той же скоростью отбирается клеточная суспензия. При этом объём выращиваемой суспензии остаётся постоянным.
- Благодаря аэрации и механическому перемешиванию, в культиваторе создаются оптимальные условия для снабжения клеток кислородом и более быстрого и равномерного распределения питательных веществ, поступающих с новыми порциями раствора, и отвода метаболитов от клеток.

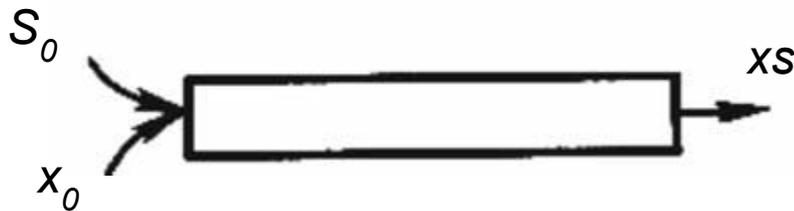


S_0 – концентрация субстрата в подаваемой среде;
 S_1 – концентрация субстрата в вытекающей культуре;
 X – концентрация клеток

В **турбидостате** подача питательной среды осуществляется по команде фотоэлектрического элемента, регистрирующего оптическую плотность культуры. **Скорость разбавления сама устанавливается в соответствии с заданной плотностью популяции.** Этим турбидостат отличается от хемостата, в котором фиксируется скорость разбавления, соответственно которой устанавливается концентрация биомассы.

- **Непрерывно-проточное культивирование** может осуществляться в одном ферментере (**одностадийный процесс**) или в двух и более ферментерах (**многостадийный, многоступенчатый процесс**).
- В промышленности одностадийный процесс культивирования применяется для получения микробной массы или тех продуктов, кинетика накопления которых повторяет кинетику роста биомассы.
- Применение многостадийных систем позволяет получать культуру при любой скорости роста – от лаг-фазы до экспоненциальной и стационарной. Многостадийные системы обычно используются для получения вторичных продуктов микробного синтеза, накопление которых в той или иной степени отстает от кинетики роста биомассы. Многостадийное культивирование с успехом применяется при получении молочной кислоты, этилового спирта и т. д.

Системы культивирования полного вытеснения.



- Этот способ культивирования используется для анаэробных условий.
- Открытая система полного вытеснения отличается от системы идеального смешения тем, что культура в ней не перемешивается и представляет собой поток жидкости через трубку.
- Наиболее распространенным аппаратом является трубчатый реактор. Он может иметь различную форму (прямую, S-образную, спиральную) и устанавливается горизонтально или вертикально.

- 
- Система полного вытеснения представляет собой пространственный вариант периодической культуры. Такая культура за время от посева до выгрузки проходит через все стадии периодической культуры, т. е. **фазы роста распределены не во времени, а в пространстве**, причем каждой части ферментера в установившемся режиме соответствует определенный отрезок кривой роста.
 - Засев осуществляется непрерывно на входе в ферментер одновременно с подачей среды.
 - По такому принципу ведут стадию брожения при производстве пива в башенных проточных емкостях.
 - В настоящее время появились аппараты, обеспечивающие процессы с режимом, приближающимся к полному вытеснению и в аэробном режиме. Это вращающиеся трубчатые реакторы с насадкой или внутренними аэрирующими элементами, а также многосекционные колоночные аппараты.

Преимущества непрерывного культивирования перед периодическим:

- Возможность специализации аппаратуры для каждой операции непрерывного процесса;
- Стабилизация его во времени;
- Легкость регулировки процесса;
- Улучшение качества продукта;
- Возможность автоматизации.

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

- Технологический процесс биотехнологического производства представляет собой совокупность взаимосвязанных технологическими потоками операций, обеспечивающих переработку исходных материалов в готовый продукт.
- **Промышленный биотехнологический процесс**, в котором для производства коммерческих продуктов используют клеточные системы или микроорганизмы, обычно включает **три ключевые стадии**:
 - **Подготовительную** (обработка сырья, приготовление питательных сред, стерилизация воздуха, приготовление посевного материала, подготовка биокатализатора, подготовка оборудования).
 - **Биотехнологическую** (ферментация или биотрансформация с образованием целевого продукта).
 - **Получения готового продукта** (стадии выделения и очистки целевого продукта от культуральной среды, клеточной массы и примесей).



- Биотехнологическое производство имеет разную степень сложности по протяженности технологических цепей.
- Например, **быстрое производство**, когда целевой продукт - это биомасса (получение дрожжей, получение бифидумбактерий). **Отдаленный процесс**, если конечный продукт – это лекарственный препарат (например, антибиотики), то в этом случае технологических стадий будет больше.
- Любой биообъект требует условий для создания продукта:
 - условия для поддержания его жизнедеятельности
 - условия для синтеза целевого продукта
 - предотвращение контакта с посторонней микрофлорой, когда необходимо защищать продуцент от конкуренции.



- Эти стадии технологического процесса осуществляются в специальных цехах или их отделениях.
- 1. **Обработка сырья**, если оно поступает в непригодном для использования состоянии. Например, при получении спирта пшеницу сначала дробят, а затем подвергают ферментативному процессу «осахаривания». Другой пример, использование древесины для получения дрожжей: её сначала измельчают, потом нагревают до 200 °С в кислой среде с образованием раствора глюкозы и лигнина. Раствор глюкозы (гидролизат) и используют в культивировании дрожжей.
- 2. **Приготовление среды**, включающей необходимые компоненты питания для конкретного продуцента, **и её стерилизация**. Данная стадия заключается в растворении веществ растворимых в воде и тщательное суспензирование нерастворимых компонентов среды.

3. **Подготовка и стерилизация воздуха для аэробных процессов.** Воздух освобождается от пыли, влаги и микроорганизмов, включая споры.

4. **Подготовка посевного материала.**

● Процесс культивирования штаммов – продуцентов с целью получения разнообразных продуктов имеет ряд особенностей, однако **во всех случаях применяется общая технологическая схема**, в основу которой положен **принцип многостадийного выращивания м/о – продуцента при постепенном увеличении её объема.**

● Ферментация проводится в аппаратах большого объёма и засев их малым количеством посевного материала привел бы к нерациональному использованию ферментационных ёмкостей.

● **Посевным материалом** называют чистую культуру м/о-продуцента, «размноженную» до такого кол-ва (объема), которое необходимо для засева промышленных аппаратов.

МЕТОДЫ ХРАНЕНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ

- Каждая производственная культура имеет паспорт, в котором указаны:
 - название (род, вид),
 - коллекционный номер,
 - серия и дата выпуска,
 - средний уровень активности,
 - срок годности,
 - подробные описания морфологии и физиологии,
 - характеристика сред для выращивания и хранения культуры.

- Чтобы свойства культуры продуцента оставались без изменения, ее надо **хранить в соответствующих условиях.**
- При длительном хранении, особенно при частых пересевах, легко **изменчивыми (вариабельными)** являются прежде всего **физиологические признаки культуры**, т.е. те, которые представляют наибольший интерес для получения целевого продукта.
- В основе хранения культур лежит **охлаждение, замораживание или обезвоживание.**
- Во всех этих случаях ограничивается или прекращается клеточный обмен веществ.
- При замораживании и обезвоживании клетки приводят в состояние **анабиоза или преданабиоза.**

Способы хранения продуцентов:

- **На косом агаре при низкой температуре** ($1 \div -5^{\circ}\text{C}$) можно хранить культуру 1-2 месяца, а иногда и дольше.
- Для увеличения срока хранения на агаризованных средах (замедление высыхания агара) ватные пробки пробирок заливают парафином или пробирки заворачивают в медицинскую пленку. Это удлиняет срок хранения до 12 месяцев.
- По истечении срока хранения требуется пересев на свежую агаризованную среду.
- Преимуществом метода периодических пересевов являются простота и визуальный контроль чистоты культуры, а также возможной морфологической изменчивости колоний.
- Недостаток – возможность заражения посторонней микрофлорой, краткосрочность хранения, периодический пересев, что может привести к вырождению культуры, трудоемкость и большой расход реактивов, входящих в состав питательных сред.

- **Замораживание и хранение при температуре ниже -20°C .**
- Позволяет хранить культуру в течение нескольких месяцев.
- Нежелательно многократное оттаивание и замораживание.
- **Замораживание и хранение при низких и ультранизких температурах ($-20^{\circ}\text{C} \div -80^{\circ}\text{C}$).**
- Сохранение жизнеспособности м/о при замораживании зависит от природы организмов, возраста и плотности популяций, условий культивирования, криопротекторов, скорости замораживания – оттаивания и других факторов.
- Особенно хорошо сохраняют свои свойства не только обильно спорулирующие культуры, но и аспорогенные штаммы, обладающие пониженной жизнеспособностью (культуры с медленным обменом веществ).
- Для чувствительных к низким температурам штаммов: добавляют криопротекторы – р-р глицерина 10-15%, ДМСО 7-10%, сахароза 10-20%.

- Для реактивации замороженной культуры с ее поверхности, не размораживая, соскабливают споры, мицелий или клетки, которые переносят на свежую питательную среду и выращивают при оптимальной температуре.
- Часто замораживать – размораживать не рекомендуется.
- Преимущество метода – простота, исключение опасности высыхания и загрязнения культуры.
- Недостаток – гибель культуры при выходе из строя морозильной установки.

- **Хранение под слоем минерального масла.** На твердых средах под слоем стерильного парафина или минерального масла можно хранить дрожжи, плесневые грибы.
- Менее пригоден этот метод для хранения актиномицетов.
- Слой масла над поверхностью косога агара должен быть не менее 1 см.
- Масло предохраняет культуру от высыхания и доступа кислорода.
- Метод применяется для сохранения крупных коллекций и в лабораторных условиях.
- Преимущество метода – прост, не требуется специальная аппаратура и обеспечивается относительно длительное сохранение жизнеспособности и стабильности признаков большинства м/о различных систематических групп.

- Для хранения применяют высокоочищенное вазелиновое масло ($d=0,8-0,9$) стерилизованное в автоклаве (60 мин, 1 атм), затем прогревают в сушильном шкафу при 150°C для удаления воды.
- Толщина слоя ~ 1 см.
- Хранят культуры при $+5^{\circ}\text{C}$ или комнатной температуре в темноте.
- Для м/о различных систематических групп устанавливают определенные сроки пересева.
- Особо чувствительные м/о пересевают из-под масла 1-2 раза в год.
- Большинство видов дрожжей пересевают раз в год.
- Мицелиальные грибы в начале хранения пересевают через год, а затем каждые два-три года.
- Большинство испытанных сапрофитных бактерий сохраняют жизнеспособность под вазелиновым маслом без пересевов в течение 8-14 лет.
- Во Всесоюзной коллекции м/о штаммы рода *Vac.* сохраняют 6 лет, грибы 4 года.

- **На агаре без добавления питательных веществ** (допускаются очень незначительные добавки питательных веществ), так хранят актиномицеты.
- **Хранение в стерильной смеси песка и глины.** Нанесенные на эту смесь м/о или суспензию спор, сушат при комнатной температуре и при такой же температуре хранят в посуде, закрытой ватной пробкой.
- **Консервация спор (актиномицеты) в песке.** Около 1 г стерильного песка насыпают в пробирку, засевают туда же споры и сушат их в эксикаторе над селикагелем или хлористым кальцием. После сушки пробирки герметично закрывают пробками и заливают парафином.
- Так хранят споры актиномицетов, грибов и бактерий.

● **На разваренном зерне.**

- В качестве субстрата используют дробленое и недробленое зерно различных с/х культур и семена других растений.
- Разваренное зерно засыпают по 15-16 г в стерильные флаконы емкостью 250 мл и стерилизуют при 115°C 40 минут. Испытывают на стерильность.
- Каждый флакон засевают 2 мл густой взвеси спор в воде или 3 мл двухсуточного вегетативного мицелия. Флаконы встряхивают.
- В зависимости от природы продуцента его выращивают при 24 или 28°C ежедневным встряхиванием.
- Затем культуру высушивают в вакуум-аппарате, влажность пшена после сушки не более 8%.
- Часть флаконов испытывают на присутствие посторонней микрофлоры, у остальных ватные пробки заливают парафином и хранят при комнатной температуре в сухом и темном месте.
- Таковую культуру можно многократно использовать для получения антибиотиков.

● **В виде почвенных культур.**

- Измельченную и просеянную садовую почву, добавляют 2-3% мела (если почва кислая), насыпают по 1-2 г в пробирки, добавляют 2-3 капли воды, закрывают ватными пробками и дважды стерилизуют.
- Испытывают на стерильность и засевают.
- Выращивают в термостате при оптимальной температуре в течение необходимого времени.
- Затем контролируют отсутствие посторонней микрофлоры и жизнеспособность м/о.
- Культуры хранят при комнатной температуре в темном месте или через 1,5-2 месяца, когда почва станет воздушно-сухой, культуру из каждой пробирки пересевают в 5-6 стерильных ампул с перетяжками, которые запаивают под вакуумом и хранят при комнатной температуре.
- Этот метод дает возможность восстанавливать утраченные культурами некоторые характерные признаки.

- **Хранение штаммов в лиофильно высушенном состоянии.**
- Для предохранения клеток от инактивации используют защитные среды (сыворотка крови, бульон, сахароза, смесь песка и глины и др.).
- Лиофилизированную чистую культуру в ампулах хранят в течение нескольких лет.
- Метод лиофильного высушивания предусматривает сублимацию (возгонку) воды под вакуумом из замороженного материала.
- Для это готовят густую суспензию спор в нормальной лошадиной сыворотке без консервантов или в жидкости, содержащей 10% сахарозы и 1% желатина, рН которой равен 6,8-7,0. Суспензию разливают по 0,2 мл. в ампулы с перетяжками, замораживают в смеси твердой углекислоты с этиловым спиртом ($-70 \div -80^{\circ}\text{C}$) в течение 5 минут и помещают в вакуум аппарат для высушивания (остаточное давление 6-130 кПА). Остаточная влажность не более 3-5%. Ампулы запаивают и хранят при комнатной температуре или 50°C .

- **Хранение штаммов в лиофильно высушенном состоянии.**
- Для высева ампулы вскрывают и содержимое петлей переносят на агаризованную среду, помещают в термостат или ампулу вносят 0,2-0,3 мл стерильной дистиллированной воды, материал мгновенно растворяется, содержимое высевают.
- При реактивации высушенных этим методом м/о на степень их выживаемости влияют условия, в которых окажутся м/о сразу после поглощения влаги.
- Выживаемость можно повысить, если не сразу высевать, а поддержать некоторое время м/о в условиях пониженного обмена (в воде).
- Преимущества метода – не нужен пересев, поэтому исключается опасность загрязнения культур, обеспечивается консервация ценных свойств штаммов.
- Небольшие размеры лиофильных ампул позволяют сократить площадь для хранения.
- Через некоторое время культуру пересевают.

Получение посевного материала

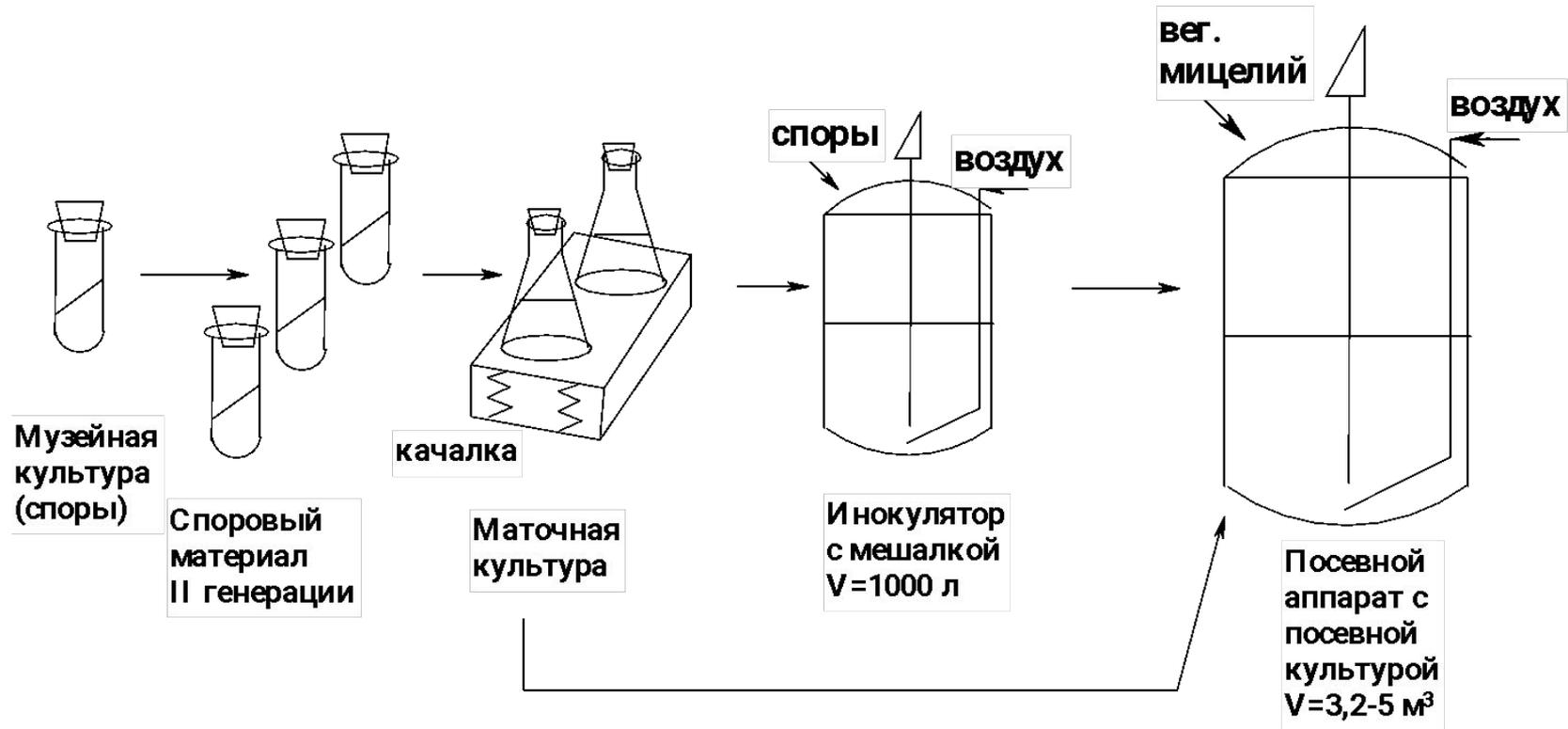
- Перед началом технологического процесса **музейную культуру**, полученную из НИИ или хранящуюся в лаборатории (ЦЗЛ), размножают в посевной лаборатории цеха в стерильных условиях при оптимальном составе среды и режиме выращивания (рН, температура, длительность).
- В лаборатории из музейной пробирки культуру продуцента смывают стерильной водой и суспензию переносят в несколько пробирок на свежую скошенную агаризованную питательную среду для получения спорового материала второго поколения (в случае грибов).
- Продуцент инкубируют в оптимальных условиях. Полученные споры используют для получения вегетативного посевного мицелия (грибов) по следующей схеме:

Споровый посевной материал в виде культуры на агаризованной среде

Маточная культура (время выращивания 2-4 суток)

Посевная культура (время выращивания 1-2 суток)

Культура в посевном аппарате (1-2 аппарата последовательно, 1-4 суток)



- Для разных продуцентов схема может меняться.
- Например, в производстве пеницилина продуцент хранится на разваренном пшенице в виде спор. Такой спорный материал засевают непосредственно в инокулятор, минуя размножение на жидкой питательной среде в колбах.
- Для обеспечения стабильного выхода активных веществ в производственных условиях надо создать достаточный запас культуры продуцента на длительный период времени (год и более), но нельзя часто менять технологию приготовления посевного материала.
- В пр-ве β -каротина вегетативный материал из колб высевают в посевные аппараты, минуя стадию инокуляции.
- В производстве дрожжей (на белковую массу – корма) посевная вегетативная культура выращивается в 4 ступени: колба \rightarrow малый посевной аппарат $V = 300$ л \rightarrow большой посевной аппарат $V = 3200$ л \rightarrow малый ферментатор $V = 50$ м³.

- Пересев с агаризованной среды в колбы производят в стерильных условиях.
- Бактериологической иглой суспендируют споры в стерильной воде и переносят в колбы Эрлеймейера $V=750$ мл, содержащие 50-100 мл среды, колбы закрывают ватной пробкой и помещают в термостат ($28-30^{\circ}\text{C}$) на качалку.
- Перемешивание, которое осуществляется встряхиванием качалки (200-300 об/мин), увеличивает скорость роста культуры, благодаря интенсификации массообмена (18-36 часов). Эта культура называется маточной.
- Стадия контролируется на отсутствие посторонней микрофлоры и по морфологическим показателям.
- На второй стадии выращивания посевного материала готовую культуру из колб стерильно переносят в инокулятор $V \sim 1000$ л.
- Для приготовления посевного материала используют стерильную, полноценную среду, тщательно проверенную различными химическими и микробиологическими методами.

- Количество питательной среды в аппарате не должно превышать 60% общего объема.
- Если культуру в инокулятор вносят из колб, то количество посевного материала $1/100$ от V среды.
- Такое небольшое количество посевного материала требует длительного периода инокуляции (2-4 суток).
- Для посевных ферментаторов используют 10-12% инокулята, поэтому время приготовления посевного материала на этой стадии уменьшается (1-2 суток).
- Во время выращивания надо следить, чтобы поддерживался в аппаратах оптимальный режим культивирования.
- Для создания оптимального режима инокулятор и посевные аппараты оснащают мешалкой (для непрерывного перемешивания), аэрирующим устройством, КИП-ом для регулирования температуры, рН, уровня пены и др.
- Три раза в сутки производится отбор проб для микробиологических и биохимических анализов. Посевной материал для главной ферментации готовят в количестве 5-20% объема используемой питательной среды.

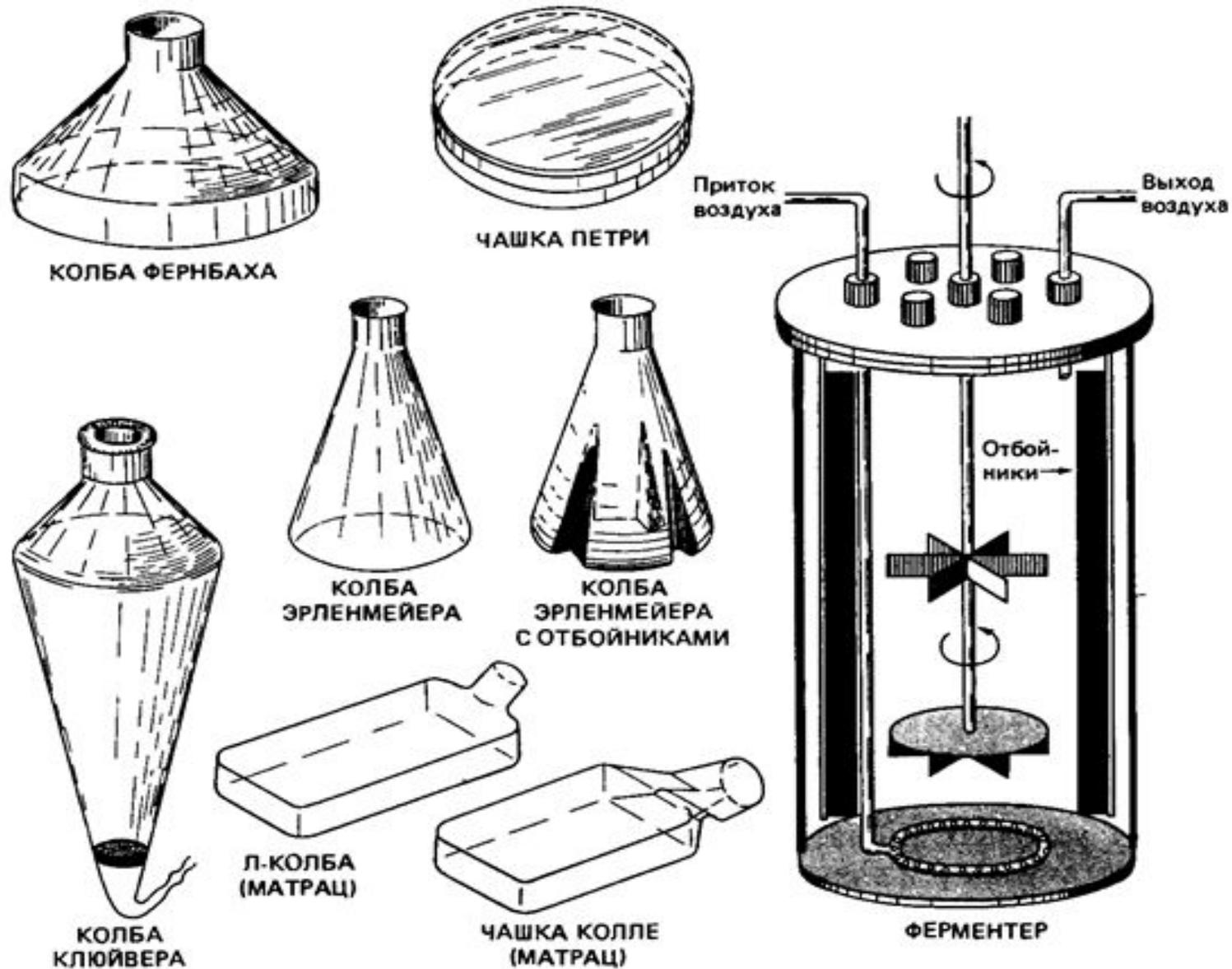


Рис. 6.2. Лабораторная посуда для поверхностных и глубинных культур аэробных микроорганизмов.



