

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.09 Промышленная микробиология

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	
1.1 Лекция № 1 Введение в промышленную микробиологию и биотехнологию	3
1.2 Лекция № 2 Молочнокислое брожение. Молочнокислые бактерии, их распространение и использование в промышленности	8
1.3 Лекция № 3 Спиртовое брожение. Физиология дрожжей и химизм спиртового брожения. Характеристика дрожжей, применяемых в промышленности	11
1.4 Лекция № 4 Маслянокислое и уксуснокислое брожение. Особенности брожения, возбудители	15
1.5 Лекция № 5 Пропионовокислое брожение. Общая характеристика и распространение пропионовокислых бактерий	19
1.6 Лекция № 6 Получение белка. История использования микроорганизмов для получения белка	21
1.7 Лекция № 7. Производство вакцин, бактериофагов и препаратов, нормализующих микрофлору человека	24
1.8 Лекция № 8 Биогеотехнология	27
2. Методические указания по выполнению лабораторных работ	
2.1 Лабораторная работа 1 (ЛР-1) Техника безопасности и структура лаборатории. Способы и особенности технологии промышленного культивирования микроорганизмов	32
2.2 Лабораторная работа 2 (ЛР-2) Типовая технологическая схема микробиологического производства	34
2.3 Лабораторная работа 3 (ЛР-3) Изучение микрофлоры кисломолочных продуктов	40
2.4 Лабораторная работа 4 (ЛР-4) Микроорганизмы, участвующие в порче кисломолочных продуктов	42
2.5 Лабораторная работа 5 (ЛР-5) Итоговое занятие за 1 модуль	47
2.6 Лабораторная работа 6 (ЛР-6) Дрожжи. Спиртовое брожение	47
2.7 Лабораторная работа 7 (ЛР-7) Маслянокислые и уксуснокислые бактерии. Микроорганизмы, разрушающие целлюлозу и пектиновые вещества	50
2.8 Лабораторная работа 8 (ЛР-8) Итоговое занятие за второй модуль	51
2.9 Лабораторная работа 9 (ЛР-9) Получение азотфикссирующих бактериальных препаратов. Свойства клубеньковых бактерий	56
2.10 Лабораторная работа 10 (ЛР-10) Получение газообразного и жидкого топлива. Получение биогаза. Получение спиртов. Получение тепловой энергии при бактериологическом окислении.	56
2.11 Лабораторная работа 11 (ЛР-11) Препараты микроорганизмов против животных – вредителей растений	61
2.12 Лабораторная работа 12 (ЛР-12) Итоговое занятие за третий модуль	66
2.13 Лабораторная работа 13 (ЛР-13) Мембранные методы разделения биопрепараторов. Методы высушивания биопрепараторов. Оборудование	66
2.14 Лабораторная работа 14 (ЛР-14) Итоговое занятие за четвертый модуль	68

КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция №1 (2 часа).

Тема: «Введение в промышленную микробиологию и биотехнологию».

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Промышленная биотехнология. Задачи. Основные направления.
2. Вклад генетической инженерии в микробную биотехнологию.

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

Биотехнология как наука является важнейшим разделом современной биологии, которая, как и физика, стала в конце XX в. одним из ведущих приоритетов в мировой науке и экономике. В нашей стране значительное расширение научно-исследовательских работ и внедрение их результатов в производство также было достигнуто в 80-е годы. Однако в дальнейшем внимание к проблемам биотехнологии в стране ослабло, а их финансирование сокращено. Современные биотехнологические процессы основаны на методах рекомбинантных ДНК, а также на использовании иммобилизованных ферментов, клеток или клеточных органелл. Современная биотехнология — это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

Современная биотехнология тесно стыкуется с рядом научных дисциплин, осуществляя их практическое применение или же являясь их основным инструментом.

1. Промышленная биотехнология. Задачи. Основные направления.

Условно микробные производства можно разделить на три типа:

- основанные на использовании живой или инактивированной биомассы микроорганизмов; сюда относится производство пекарских, винных и кормовых дрожжей, вакцин, белково-витаминных концентратов (БВК), средств защиты растений, заквасок для получения кисломолочных продуктов и силосования кормов, почвоудобрительных препаратов;
- производящие продукты микробного биосинтеза, к числу которых относятся антибиотики, гормоны, ферменты, аминокислоты, витамины;
- производства, основанные на получении продуктов брожения, гниения, например утилизация целлюлозы и различных отходов с целью получения углеводов, биогаза, биоэтанола. Сюда же относятся получение спиртов, органических кислот, растворителей, а также биотехнология утилизации неприродных соединений.

Биоэнергетика. Растительный покров Земли составляет более 1800 млрд. т сухого вещества, что энергетически эквивалентно известным запасам энергии полезных ископаемых. Леса составляют около 68% биомассы суши, травяные экосистемы - примерно 16%, а возделываемые земли - только 8%.

Метановое «брожение», или биометаногенез, - давно известный процесс превращения биомассы в энергию. Он был открыт в 1776 г. Вольтой, который установил наличие метана в болотном газе.

Для всех метанобактерий характерна способность к росту в присутствии водорода и углекислого газа, а также высокая чувствительность к кислороду и ингибиторам производства метана. Метановое «брожение» происходит в водонепроницаемых цилиндрических цистернах с боковым отверстием, через которое вводится ферментируемый материал. Над дайджестером

находится стальной цилиндрический контейнер, который используется для сбора газа. Как правило, в газовом куполе имеется трубка для отвода биогаза. Обычно дайджестеры загружают в землю, чтобы использовать изоляционные свойства почвы.

Производство биогаза путем метанового «брожения» отходов - одно из возможных решений энергетической проблемы в большинстве сельских районов развивающихся стран. Производство биогаза имеет следующие достоинства: это источник энергии, доступный на семейном и общем уровне; отходы процесса служат высококачественными удобрениями и в довершение сам процесс способствует поддержанию чистоты окружающей среды.

Биотехнология в состоянии внести крупный вклад в решение проблем энергетики посредством производства достаточно дешевого **биосинтетического этанола**, который кроме того является и важным сырьем для микробиологической промышленности при получении пищевых и кормовых белков, а также белково-липидных кормовых препаратов.

Источником углеводородов также могут служить *водоросли*. У широко распространенной зеленой водоросли *Botryococcus braunii* углеводороды в зависимости от условий роста и разновидностей могут составлять до 75% сухой массы. Встречается несколько разновидностей *B.braunii*, отличающихся пигментацией и структурой синтезируемых углеводородов. Для определения перспективности использования *B.braunii* необходимо провести следующие исследования:

- определить условия, обеспечивающие максимальную скорость роста и образования углеводородов в лабораторных и полевых условиях;
- выяснить, можно ли добиться скорости роста *B.braunii*, сопоставимой с известной для других водорослей;
- разработать соответствующие методы выращивания, сбора и переработки;
- оценить применимость получаемого продукта как альтернативного источника топлива и смазочных веществ. Исследования, связанные с выделением и возможностью утилизации углеводородов *B.braunii*, могут также способствовать лучшему пониманию вопроса о происхождении нефти.

2. Вклад генетической инженерии в микробную биотехнологию.

Генетическая инженерия видоизменила структуру и содержание современной промышленной микробиологии. Во-первых, существенно повысилась продуктивность промышленных микроорганизмов - продуцентов классических продуктов путем введения дополнительных генов, увеличения их количества или активности. Во-вторых, вводя в микробную клетку новые гены, удалось изменить питательные потребности микроорганизма. Далее микроорганизмы "научили" синтезировать несвойственные им вещества и таким образом увеличили разнообразие биотехнологической продукции. Некоторые белки человека, клонированные в микробной клетке, в том числе инсулин, интерфероны, интерлейкины, находят в настоящее время терапевтическое применение. Наконец, подверглась пересмотру вся логика селекции микроорганизмов-продуцентов. Так, если раньше сначала искали активный штамм микроорганизма и затем создавали конкретную биотехнологию с учетом физиологических свойств и питательных потребностей продуцента, то теперь можно взять приспособленный к условиям производства штамм и ввести в него генную конструкцию, которая обеспечит эффективный синтез целевого продукта.

К числу важных практических достижений генной инженерии необходимо отнести выделение, клонирование и получение диагностических препаратов. Сегодня уже более 200 новых диагностикумов введены в медицинскую практику, разработаны способы диагностики

такого опасного заболевания, как СПИД. Широко применяются методы генной диагностики, то есть выявления дефектных генов, включая пренатальную диагностику.

К самому большому классу лекарств, получаемых путем микробного синтеза, относятся антибиотики. По разнообразию и показаниям к применению они занимают первое место среди продукции мировой фармацевтической промышленности. Сегодня известно более 6000 видов антибиотиков, более 100 из которых находят применение в медицинской практике, в том числе при лечении таких тяжелых заболеваний, как туберкулез, менингит, плеврит, пневмония. Отдельные антибиотики применяют при лечении онкозаболеваний. Объем мирового рынка антибиотиков увеличивается в последнее время на 10-12% в год и составляет более 23 млрд долларов.

Второй класс лекарственных веществ, производимых биотехнологическим путем, - гормоны. К традиционным микробиологическим продуктам относятся стероидные гормоны - кортизон, преднизолон, которые широко применяют при лечении различных аллергических заболеваний, в том числе такого тяжелого, как бронхиальная астма, а также ревматоидного артрита и других недугов. Спектр гормональных препаратов, производимых путем микробного синтеза, значительно пополнился за счет пептидных гормонов, представляющих генно-инженерные продукты. Следует отметить такие антивирусные, антиопухолевые и иммуномодулирующие агенты, как интерфероны и интерлейкины.

Среди лекарственных средств особое место занимают ферменты. Так, известно применение протеолитических ферментов при лечении заболеваний пищеварительных органов. Эти же ферменты используют при лечении ожоговых поражений и различных ран для удаления некротических тканей. При лечении патологий обмена веществ применяют также липазы. Протеиназы с фибринолитическим действием используют для растворения тромбов. С помощью таких препаратов, как стрептокиназа и урокиназа, лечат тромбоз коронарных сосудов сердца, легких, конечностей.

Важный вклад микробной биотехнологии в медицину состоит в получении профилактических препаратов, причем этот вид продукции не имеет дублера в химической промышленности. Чтобы понять важность вакцинации, приведем несколько примеров. В развитых странах, где профилактическая служба находится на должном уровне, смертность от инфекционных заболеваний составляет всего 4-8 против 30-50% в развивающихся странах. Вакцина против оспы позволила полностью искоренить эту болезнь. В 1955 году в США и Канаде полиомиелитом заболевали 200 человек на 1 млн населения. В настоящее время распространенность этого заболевания снизилась в 4000 раз (1 человек на 20 млн населения). Также быстро снизилась заболеваемость корью, краснухой, дифтерией после введения соответствующих вакцин в практику. Большие перспективы в получении новых вакцин открывает генная инженерия. При этом необходимый защитный антиген можно получить с помощью непатогенного микроорганизма и, таким образом, избежать опасностей, связанных с токсичностью обычных вакцин.

По прогнозам, к 2050 году население Земли возрастет до 10 млрд человек и для обеспечения его потребности в продукции сельского хозяйства нужно будет увеличить объемы производства на 75%. Анализ проблемы обеспечения человека продовольствием специалистами разных стран показал, что в основном она заключается в недостатке белка животного происхождения, который по аминокислотному составу более богат, чем растительный белок. Промышленная микробиология поставляет животноводству по крайней мере три вида важных веществ: кормовой белок или белково-витаминные концентраты (БВК), незаменимые аминокислоты и кормовые антибиотики. Добавление 1 т БВК в корма обеспечивает экономию 7

т фуражного зерна и дополнительное производство 0,8 т свинины или 5 т мяса птицы. Включение 1 т кормовых дрожжей в рацион телят и поросят позволяет экономить 6 т цельного молока. Наиболее продуктивным сырьем для получения микробного белка следует считать клетчатку, причем преимущественно используются не отходы древесины, а подсолнечная лузга, кукурузные кочерыжки, солома и другие отходы сельского хозяйства, которые ежегодно воспроизводятся. Второй вид биотехнологической продукции - незаменимые аминокислоты, производство которых для медицины и сельского хозяйства интенсивно развивается во всем мире. Среди них такие, как лизин и метионин, обязательно должны содержаться в готовом виде в пище человека и кормах животных. Метионин производят с помощью химической технологии, а лизин - в основном биотехнологически. Внесение в корма лизина высвобождает фураж и увеличивает объем мясной продукции: на 1 т лизина высвобождается 40-50 т фуражного зерна и получается дополнительно более 10 т мяса.

В дополнение к сказанному необходимо отметить, что так называемая биологическая система животноводства и растениеводства приобретает все большую популярность. В настоящее время в разных странах производят более 100 видов биопрепараторов, применяемых в растениеводстве, в том числе энтомопатогенные препараты: энтомбактерин, инсектин, токсобактерин, боверин, вирин, а также гербициды, фунгициды, бактериальные удобрения: нитрагин, азотбактерин, фосфоробактерин. Использование биологических средств защиты растений, стимуляторов роста животных и растений, микробных удобрений позволяет снизить дозы применяемых химических средств защиты и минеральных удобрений, что приводит к повышению качества продукции и созданию экологически чистых технологий.

Еще одно направление повышения урожайности растений связано с использованием бактерий, фиксирующих атмосферный азот. Известно, что с помощью азотфиксрующих бактерий ежегодно около 17,5 " 10⁷ т молекулярного азота атмосферы превращается в органические соединения. Фиксацию азота обеспечивают ферменты - продукты nif-генов. В настоящее время практически решена проблема увеличения дозы nif-генов у клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*. Большинство генов, контролирующих способность этих бактерий к симбиозу с бобовыми растениями, локализуется на плазмidaх. Это расширяет возможности использования методов генной инженерии для увеличения эффективности азотфиксации и как следствие - улучшения азотного питания растений. Имеются предпосылки к созданию методами генной инженерии злаковых растений-азотфиксаторов.

Связь промышленной микробиологии с проблемами природоохранительного плана многообразна и заслуживает специального рассмотрения. Мы ограничимся наиболее яркими примерами. Известно, что основными загрязнителями природных водоемов являются стоки химических предприятий, содержащие различные синтетические органические соединения, разложение которых в природе происходит крайне медленно. Мертвым грузом накапливаются токсические вещества, так называемые ксенобиотики - соединения, не включающиеся в метаболизм живых организмов. Это вещества, созданные фантазией человека, которых не знает природа. На помощь приходят бактерии, разнообразие путей метаболизма которых настолько велико, что среди них найдется хотя бы один представитель, способный утилизировать самые необычные, в том числе и токсичные, соединения. Опираясь на глубокие знания физиологии бактерий, микробиологи изучают пути катаболизма ксенобиотиков, возможность их разложения и детоксикации. На основе этих исследований создают биотехнологические способы очистки воды от загрязнения неприродными соединениями, а также методы, позволяющие контролировать загрязнения окружающей среды. Так, специальные микробные

продукты для контроля и мониторинга загрязнений имеют ежегодный объем продажи около 10 млн долларов, а в перспективе этот объем может достичь 200 млн долларов.

Следующая серия природоохранительного плана направлена на очистку земель и водоемов от загрязнений нефтью. Последние занимают большие площади вокруг отработавших нефтепромыслов и превращают в безжизненный субстрат бывшие плодородные почвы. Нередко загрязнения углеводородами связаны с авариями на танкерах, когда нефтью заливаются акватория и берега рек. Для разработки штаммов-деструкторов, способных разлагать массивные скопления нефтепродуктов, используют методологию генной инженерии. Так, например, у псевдомонад обнаружены плазиды биодеградации, определяющие способность этих бактерий утилизировать толуол, нафталин, а также расти в экстремальных условиях. Созданные микробные сообщества ремедиаторов, содержащих рекомбинантные плазиды биодеградации, и соответствующие биотехнологии решают уже сегодня проблемы охраны окружающей среды, а также позволяют разработать безотходные технологии во многих областях промышленности.

Известно, что потребление энергетических ресурсов во всем мире намного превосходит процессы восстановления запасов полезных горючих ископаемых в земных недрах. Все ускоряющиеся темпы развития цивилизации приводят к истощению энергетического потенциала. Понятно, что необходимы поиски новых нетрадиционных решений. Мощный потенциальный источник энергии - это биомасса зеленых растений, которые являются консервантами солнечной энергии. Растительный покров Земли составляет более 1800 млрд т сухого вещества, что энергетически эквивалентно $30 \cdot 10^{21}$ Дж и соответствует запасам энергии всех полезных ископаемых. При этом леса составляют 68% биомассы, травяные, то есть ежегодно возобновляемые, экосистемы - 16, а возделываемые земли - только 8%. Всего 2% биомассы растений используется для пищи человека и на корм животных, остальное количество в 20 раз превышает годовое потребление энергии полезных ископаемых. Иными словами, конверсия растительной биомассы в энергию может помочь решить энергетические проблемы. Известно, что значительную долю энергетического потенциала растительной биомассы используют путем непосредственного сжигания дров, древесного угля, сухого навоза. Однако такое использование малоэффективно, так как при этом реализуется только 10% энергозапасов, окружающая среда загрязняется дымом, в атмосфере накапливается CO_2 . Конверсия биомассы в биогаз и биоэтанол дает возможность реализовать 50-80 % потенциальной энергии, без загрязнения атмосферы и практически без каких-либо отходов (отходы служат высококачественным удобрением). В получении биогаза ($\text{CH}_4 / \text{CO}_2 = 2/1$) из отходов сельского хозяйства пионером является Индия, где в настоящее время функционирует около 1 млн установок для получения газа, который используется для отопления домов, теплиц и т.п. Основным продуцентом здесь являются метаногенные бактерии. В Китае функционирует более 70 млн малых метантенков, которые служат основным источником энергии в сельской местности и удовлетворяют нужды 70% крестьянских семей, где биогаз используют для приготовления пищи.

Впервые идея применения этанола для энергетических целей возникла в 1975 году в Бразилии, а к 1997 году было сэкономлено 35,6 млрд долларов на уменьшении экспорта нефти. Затем подобная программа была разработана в 1978 году в США и в 1998 году в Канаде. Биоэтанол используется в качестве моторного топлива либо в чистом виде, либо с добавлением бензина, например газохолл содержит 10% этанола, биодизель - 15, газолин - 24%. Масштабы производства этанола в качестве топлива с каждым годом увеличиваются. Правительство США

в 2000 году выделило 242 млн долларов на научные исследования в этой области, а к 2010 году утроит объемы производства биотехнологической продукции для энергетических нужд.

По оценкам экспертов, в ближайшие годы биотехнология обеспечит прирост сельскохозяйственной продукции на 15-20%. Биосистемы получения энергии смогут обеспечить 10-15% производства энергии в таких странах, как США, Канада, и составят основу энергетики в Бразилии, Китае, Индии, на Филиппинах. Природоохранные технологии уже сегодня позволяют эффективно очищать сточные воды химических производств и проводить биоремедиацию земель и акваторий, заливых нефтью. Здравоохранение получит эффективные противоопухолевые и противовирусные средства, нейротропные препараты, вакцины нового поколения, а также методы диагностики генетических заболеваний. Важно отметить, что биотехнологическая промышленность относится к самым наукоемким отраслям в мире.

1.2 Лекция №2 (2 часа).

Тема: «Молочнокислое брожение. Молочнокислые бактерии, их распространение и использование в промышленности».

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Химизм молочнокислого брожения.
2. Характеристика молочнокислых бактерий.
3. Продукты молочнокислого брожения.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Химизм молочнокислого брожения

В 1857 г. Луи Пастер обнаружил в кислом молоке микробов, морфологически отличных от дрожжевых клеток. При дальнейшем изучении молочнокислого брожения он пришел к выводу, что действие микробов специфично, что брожение является энергетическим процессом - особой формой обмена веществ, проявляющейся у микроорганизмов в отсутствие кислорода воздуха и заменяющей им дыхание, свойственное высшим животным и растениям. Чистая культура молочнокислых бактерий, названная *Streptococcus lactis*, была выделена в 1877 г., Листером.

Химизм процессов в начальной стадии одинаков для всех типов брожения. Он начинается с разложения моносахаридов, среди которых ведущее значение отводится глюкозе. Процесс начального этапа брожения называется гликолиз (греческое "glicus" – сладкий и латинское "lizis" – разложение, распад).

Это очень сложный, многостадийный процесс, протекающий в анаэробных условиях. Выделяют 10 стадий гликолиза, которые катализируются различными ферментами. Продукт реакции каждого предыдущего фермента является субстратом для последующего. Конечным продуктом гликолиза служит пировиноградная кислота или пируват.

Реакции гликолиза сопровождаются высвобождением энергии, которая аккумулируется в АТФ. Далее пути брожений расходятся, названия различных типов брожений даны по конечным продуктам.

По характеру возбуждаемых биохимических реакций молочнокислые бактерии делятся на две группы: типичные (гомоферментативные) и нетипичные (гетероферментативные).

Типичные молочнокислые бактерии осуществляют расщепление сахаров до молочной кислоты без образования заметных количеств каких-либо побочных продуктов. Нетипичные же молочнокислые бактерии наряду с молочной кислотой всегда продуцируют большее или меньшее количество побочных продуктов - уксусной кислоты, янтарной кислоты, этилового спирта, углекислого газа и пр. Это обстоятельство свидетельствует о различии в сущности протекающих биохимических реакций.

Однако с момента образования пировиноградной кислоты механизм процесса изменяется: в комплексе ферментов у молочнокислых бактерий отсутствует карбоксилаза, в результате чего вместо расщепления пировиноградной кислоты на уксусный альдегид и углекислый газ она восстанавливается в молочную кислоту. Процесс восстановления пировиноградной кислоты в молочную катализируется ферментом редуктазой.

Для гетероферментативного молочнокислого брожения чаще всего приводят следующее схематическое уравнение:

Возникновение побочных продуктов брожения может быть объяснено тем, что микроорганизмы, вызывающие гетероферментативное молочнокислое брожение, в комплексе ферментов содержат карбоксилазу. Пировиноградная кислота расщепляется при этом до уксусного альдегида и CO₂ лишь частично. В результате разнообразных превращений уксусного альдегида и пировиноградной кислоты и происходит возникновение янтарной, уксусной кислот и этилового спирта.

Таким образом, гетероферментативное молочнокислое брожение протекает более сложно, чем гомоферментативное. Количественные соотношения между накапливающимися побочными продуктами гетероферментативного молочнокислого брожения могут быть самыми различными: молочной кислоты может накопиться до 40% от количества сброшенного сахара, янтарной кислоты - около 20%, этилового спирта и уксусной кислоты примерно поровну - по 10%, газов - около 20%. Иногда выход газов уменьшается, но тогда в среде появляется муравьиная кислота (HCOOH).

2. Характеристика молочнокислых бактерий

Большинство молочнокислых бактерий - факультативные анаэробы, однако все же лучше всего они развиваются без доступа кислорода. Сбраживающая способность у типичных молочнокислых бактерий по отношению к различным моно- и дисахаридам довольно высокая. Сбраживать же крахмал и другие полисахариды они не способны, так как в их ферментативном комплексе нет соответствующих гидролитических ферментов. К источникам азотистого питания типичные молочнокислые бактерии чрезвычайно требовательны. Для их развития необходимы некоторые аминокислоты или еще более сложные органические соединения азота (пептоны, полипептиды, растворимые белки). Нуждаются типичные молочнокислые бактерии и в некоторых витаминах, так как продуцировать их сами не в состоянии. Высокая чувствительность этих бактерий к отдельным аминокислотам и витаминам используется при аналитическом определении количественного содержания таких веществ в различных средах. Нетипичные молочнокислые бактерии к источникам азота менее требовательны и лучше развиваются в аэробных условиях.

Наиболее важные в техническом отношении молочнокислые бактерии следующие.

Типичные молочнокислые бактерии. Молочнокислый стрептококк (*Streptococcus lactis*). Это небольшая, очень короткая палочка (1-1,5 x 0,5-1,0 мкм), вызывающая естественное скижение молока. В молодых культурах имеет вид типичного стрептококка. При росте на агаре образует мелкие (точечные) колонии с ровными гладкими краями. Факультативный анаэроб, хорошо сбраживает глюкозу, мальтозу, лактозу, образуя в среде до 0,8-1% молочной кислоты. Кардиальные температурные точки - минимум 10 °C, оптимум 30-35 °C, максимум 45 °C. При оптимальной температуре вызывает свертывание молока за 10-12 ч. Источником азота для молочнокислого стрептококка является пептон. Казеин и желатину этот микроб гидролизует слабо. *Streptococcus lactis* широко используется в молочной промышленности для получения разнообразных кисломолочных продуктов - творога, сметаны, простокваша, кислосливочного масла и пр.

Сливочный стрептококк (*Streptococcus cremoris*). Особый вид молочнокислого стрептококка, образующий длинные цепочки. Клетки его сферической формы размером 0,6-0,7 мкм. Развивается при температурах несколько более низких, чем *Streptococcus lactis*: оптимум 25-30 °C, максимум 35-38 °C. Сбраживает глюкозу и лактозу. Сливочный стрептококк несколько более слабый кислотообразователь и дает продукты с более мягким вкусом. Применяется в заквасках вместе с молочнокислым стрептококком.

Болгарская палочка (*Lactobacillus bulgaricus*). Выделена И. И. Мечниковым из болгарской простокваси. Это длинная неподвижная палочка (5-20 мкм). Сбраживает глюкозу и лактозу. Оптимальная температура развития 40-45 °C, минимальная 20 °C. Сильный кислотообразователь, может накапливать в молоке до 3,7% молочной кислоты. При развитии на агаре с молочной сывороткой образует колонии, напоминающие спутанные волокна ваты.

Сырная палочка (*Lactobacillus casei*). Сырная палочка представляет собой небольшую (2-6 x 0,7-0,9 мкм) палочку. В культурах она чаще встречается в виде более или менее длинных цепочек с ясно выраженной зернистостью клеток. Хорошо сбраживает глюкозу, лактозу, мальтозу. Сырная палочка весьма кислотоустойчива. Кардинальные температурные точки ее развития: минимум 22 °C, оптимум 30-35 °C, максимум 55 °C. Темп развития этой молочнокислой бактерии довольно медленный - она вызывает сквашивание молока лишь на 3-5-е сутки. Однако благодаря наличию протеолитических ферментов сырная палочка легко расщепляет казеин до аминокислот. Этот процесс весьма важен в технологии изготовления сыров, поэтому эта бактерия находит широкое применение в сыроделии.

Нетипичные молочнокислые бактерии. Капустная палочка (*L. brevis*) является возбудителем молочнокислого брожения при квашении капусты. Располагаются клетки капустной палочки в одиночку, парами и короткими цепочками, часто образуют длинные нити. Концы палочек закруглены. При сбраживании сахаров капустная палочка образует молочную и уксусную кислоты, этиловый спирт (до 2,4%) и CO₂. Сахарозу сбраживает энергичнее, чем лактозу. Молочной кислоты в рассолах может накапливаться до 1,2%. Одновременно с указанными продуктами капустная палочка при брожении способна образовывать и ароматические вещества, придающие сквашиваемому продукту приятный вкус и аромат.

Порчу томатов и томатного сока возбуждает еще одна бактерия - *Lactobacillus lycopersici*. Это - грамотрицательная газообразующая палочка. Клетки ее располагаются одиночно, парами и в виде цепочек. Интересно то, что *Lactobacillus lycopersici* способна развиваться как в аэробных, так и в факультативно анаэробных и даже анаэробных условиях. Плоды томатов *Lactobacillus lycopersici* поражает во время их роста, возбуждая вершинную гниль. Порчу цельноконсервированных томатов и томатного сока вызывает в том случае, если во время стерилизации был нарушен температурный режим. В консервах в этом случае сохраняются жизнеспособные клетки, сбраживающие углеводы и органические кислоты томатного сока. При этом образуется спирт, уксусная и молочная кислоты и CO₂. В аэробных условиях *Lactobacillus lycopersici* способна развиваться и за счет других органических веществ.

При нормальном проведении технологического процесса порчи консервированных томатов и томатного сока не происходит, так как *Lactobacillus lycopersici* не образует спор, а ее вегетативные клетки погибают при температуре ниже 100 °C - в пределах 77-80 °C.

3. Продукты молочнокислого брожения.

Ацидофильное молоко относится к продуктам молочнокислого брожения, для приготовления которого применяется ацидофильная палочка. Ацидофильная палочка в отличие от других молочнокислых бактерий хорошо приживается в желудочно-кишечном тракте. Это объясняется тем, что ацидофильные бактерии относятся к постоянным обитателям желудочно-кишечного тракта молодняка и детей находящихся на молочном вскармливании. При переходе на смешанное кормление ацидофильная палочка заменяется другими микроорганизмами. Ацидофильная палочка образует больше молочной кислоты, антибиотических веществ, чем другие молочнокислые бактерии, которые губительно действуют на гнилостные, болезнетворные виды бактерий. Поэтому рекомендуют использовать **ацидофильные препараты, в виде пробиотиков, для профилактики и лечения болезней желудочно-кишечного тракта при дисбактериозе, а также для ускорения восстановления полезной микрофлоры кишечника после приема антибиотиков.**

Сметана. В пастеризованные и охлажденные до 30°C сливки вносят 0,5-3% закваски, состоящей из чистой культуры *Str.lactis* или *Str.cremoris*. Заквашивание происходит через 8-10 часов. При микроскопии препаратов, приготовленных из сметаны, в поле зрения должны быть

видны молочнокислые стрептококки, расположенные парно или в виде коротких цепочек без присутствия посторонней микрофлоры.

Простокваша. В домашних условиях для приготовления простокваши сырое молоко ставят в теплое место на 6-8 часов. В нем последовательно проходят все фазы - от бактерицидной до молочнокислой, при этом накапливается молочная кислота и образуется сгусток. **Молоко в фазе молочнокислого брожения – называется «простоквашей»**, которую для предотвращения повышенной кислотности ставят в холодное место для созревания. При микроскопии препаратов, приготовленных из простокваши, преобладают молочнокислые стрептококки.

Продукты комбинированного брожения

Кефир – кисломолочный продукт смешанного брожения, для приготовления которого используются кефирные грибки. Кефирные грибки имеют определенную структуру и ведут себя биологически, как живой саморегулирующийся организм: они растут, делятся и обладают наследственностью.

При гистологическом исследовании срезов видны переплетения нитей, которые образуют строму грибка, удерживающую остальную группу микроорганизмов состоящую из:

1. Мезофильные молочнокислые стрептококки (*Str.lactis*);
2. Мезофильные молочнокислые палочки (*Beta-* и *Streptobacterium*);
3. Термофильные молочнокислые палочки (*L.casei*);
4. Молочные дрожжи прочно связаны со стромой гриба.

Молочнокислые бактерии, гидролизуя лактозу, снабжают молочные дрожжи кислотой, необходимой им для жизнедеятельности, а дрожжи, вызывая спиртовое брожение, насыщают продукт углекислотой, что придает кефиру особый вкус.

Методика приготовления грибковой кефирной закваски: в пастеризованное и охлажденное до 20⁰С молоко вносят 5% кефирных зерен, заквашивание происходит в течение 12-14 часов. Затем грибковую закваску процеживают через сито и используют, как производственную закваску, для приготовления потребительского кефира, у которого определяют вкус, запах и качество сгустка.

Качество закваски регулярно проверяют, определяют активность (скорость сквашивания, кислотность), органолептические качества, наличие посторонней микрофлоры путем просмотра микроскопического препарата в 10 полях зрения микроскопа.

Кумыс – кисломолочный напиток готовят из кобыльего молока, которое сильно отличается от коровьего по химическому составу (жира – только 1,5-2,0%, сахара – до 6% и высокое содержание альбумина, а у коров большое количество казеина).

В молоке кобылиц преобладает альбумин, который при воздействии молочной кислоты образует рыхлый осадок, неплотный сгусток с мелкими хлопьями, благодаря этому сквашенное кобылье молоко остается однородным, без осадка.

Кумыс, как и кефир, является продуктом смешанного брожения. В результате большого содержания молочного сахара, деятельность дрожжей активизируется, и количество спирта у зрелого кумыса доходит до 2,5%.

При получении кобыльего молока необходимо строго соблюдать все санитарно-гигиенические требования, так как кобылье молоко нельзя пастеризовать. При пастеризации оно свертывается, поэтому закваску вносят в парное не пастеризованное кобылье молоко.

1.3 Лекция №3 (2 часа).

Тема: «Спиртовое брожение».

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Физиология дрожжей и химизм спиртового брожения.
2. Характеристика дрожжей, применяемых в промышленности.

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Физиология дрожжей и химизм спиртового брожения.

Основные возбудители спиртового брожения — дрожжи, играют большую роль в жизни человека. Дрожжи традиционно используют в хлебопечении, для получения спирта и многих других продуктов. По значимости для народного хозяйства с ними могут конкурировать только молочнокислые бактерии. Пожалуй, нет на земном шаре ни одного человека, который бы в своей повседневной жизни не пользовался «трудами» этих микроорганизмов.

На Востоке в качестве возбудителя спиртового брожения при производстве рисового пива (сакэ) применяется *Aspergillus oryzae*. Спиртовое брожение могут вызывать также некоторые бактерии (*Zymomonas mobilis*, *Z. anaerobica*, *Sarcina ventricula*, *Erwinia amylovora*). Однако получение спирта с помощью этих микроорганизмов существенного промышленного значения пока не имеет.

В процессе эволюции дрожжи хорошо приспособились к обитанию в различных местах, содержащих чаще всего углеводы. Из соединений углерода дрожжи, как правило, лучше всего используют гексозы. Некоторые виды хорошо растут на средах с пентозами. Из полисахаридов чаще всего утилизируют инулин и крахмал. В качестве источника азота дрожжи используют обычно соли аммония, аминокислоты, небольшие пептиды, реже нитраты и нитриты.

Большинство дрожжей растет в границах pH от 3,0 до 8,0 Оптимальная температура для роста большинства видов 28—30 °C. Многие дрожжи — факультативные анаэробы.

Дрожжи, используемые для получения спирта, относятся в основном к роду *Saccharomyces*. Наибольшее значение имеет *Sacch. cerevisiae*. К этому виду относятся расы дрожжей, используемые в хлебопечении, спиртовом производстве, пивоварении, виноделии, производстве кваса. В пищевой промышленности дрожжи, не принадлежащие к сахаромицетам, играют, как правило, отрицательную роль, нарушая ход технологического процесса и вызывая порчу сырья и готовой продукции.

Штаммы *Sacch. cerevisiae* подразделяются на расы низового и верхового брожения. К расам низового брожения относится большинство винных и пивных дрожжей, к расам верхового — спиртовые, хлебопекарные и некоторые пивные. Дрожжи низового брожения функционируют в производстве при температуре 6–100°C и ниже (до 0 °C), а верхового — обычно при 14—25°C. В конце брожения низовые дрожжи оседают на дно, формируя плотный осадок, верховые — всплывают на поверхность и образуют «шапку».

Спиртовое брожение у дрожжей до образования пировиноградной кислоты отличается от гликолиза у высших организмов лишь последними этапами, на которых вместо молочной кислоты образуется этиловый спирт. Обусловлено это наличием у дрожжей пируватдекарбоксилазы, катализирующей превращение пирувата в ацетальдегид, который затем восстанавливается в этанол.

Гликолитическим путем (или путем Эмбдена — Мейергофа — Парнаса) его также называют фруктозобисфосфатным (ФБФ-путь), осуществляется разложение глюкозы, галактозы, фруктозы и маннозы. Олигосахариды вначале гидролизуются соответствующими ферментами до гексоз. По-разному способны утилизировать дрожжи трисахарид раффинозу.

Существовало мнение, что дрожжи используют пентозы лишь в аэробных условиях. В последнее время установлено, что некоторые из них способны к росту в анаэробных условиях на средах, содержащих ксилозу или ксилулозу; последние подвергаются брожению с образованием этанола. Это имеет важное практическое значение для производств, перерабатывающих в спирт древесину и отходы сельскохозяйственных растений. Разложение пентоз и высших спиртов осуществляется дрожжами через пентозофосфатный и ФБФ-пути. Спирты вначале дегидрируются до соответствующих гексоз и пентоз.

Брожение предполагает строгое равновесие процессов окисления и восстановления. Поэтому НАД, восстановленный на одном из этапов брожения, должен окисляться на другом этапе. Окисление НАДН происходит одновременно с восстановлением ацетальдегида в этанол. Такой процесс Нейберг назвал первой формой брожения. Сходный вариант спиртового

брожения наблюдается при выращивании дрожжей в щелочной среде. В этих условиях ацетальдегид окисляется НАД-зависимой дегидрогеназой в уксусную кислоту. Образовавшийся на этой стадии НАДН используется для восстановления эквивалентного количества ацетальдегида в этанол. В начале спиртового брожения преобладает глицеринопировиноградное брожение, приводящее к образованию глицерина и пировиноградной кислоты.

В присутствии молекулярного кислорода дрожжи быстро переключаются с брожения на аэробное дыхание. Подавление брожения в аэробных условиях носит название эффекта Пастера. Он связан, видимо, с различием энергетического заряда клеток в аэробных и анаэробных условиях.

2. Характеристика дрожжей, применяемых в промышленности.

Получение этилового спирта. Сырьем для производства спирта служат разнообразные растительные материалы, содержащие в достаточном количестве сбраживаемые сахара или другие углеводы, которые можно осахарить. Наиболее широко используются крахмалсодержащие материалы — зерно (ржь, пшеница, кукуруза, ячмень, овес, просо) и картофель, сахаросодержащие материалы — меласса (отход сахарного и крахмально-паточного производства), дефектная сахарная свекла, а также древесина и отходы сельскохозяйственных растений.

На спиртовых заводах применяют периодический и непрерывно поточный способы брожения. Для этого используют естественно чистые культуры дрожжей; последние систематически ведут на производственных заторах в специальном дрожжевом отделении. Для подавления в них размножения бактерий пастеризованный и охлажденный до 30 °С затор подкисляют серной кислотой до pH 3,8—4,0. Такие значения pH менее благоприятны для развития дрожжей, чем pH 4,5—5,0, но медленное размножение дрожжей компенсируется возможностью получения практически чистой культуры в нестерильных условиях.

Спиртовые дрожжи, применяемые при переработке крахмалистого сырья, должны обладать высокой бродильной активностью; быстро и полностью сбраживать сахара, а также использовать другие компоненты питательной среды в анаэробных условиях, быть устойчивыми к продуктам своего обмена (особенно к спирту), хорошо противостоять развитию инфекции. Уже около 70 лет применяют *Sacch. cerevisiae*, раса XII. Проводится селекционная работа по получению рас дрожжей с более высокими производственно ценными свойствами, в частности, способных интенсивно использовать галактозу и декстрины. В последние годы большое внимание уделяется селекции термотolerантных рас, дающих в промышленном производстве ряд преимуществ (ускорение микробиологических процессов, уменьшение расхода хладоагента и др.). Разрабатываются методы получения этанола на различных субстратах с использованием иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Микробиологические процессы и стадии, используемые в хлебопекарной промышленности. Производство хлеба включает сложный цикл микробиологических и биохимических процессов, происходящих в тесте с момента смешивания муки с водой и заканчивающихся выпечкой. При приготовлении теста из пшеничной муки обычно применяют хлебопекарные прессованные дрожжи. Их производят на специализированных дрожжевых заводах; в качестве питательной среды используют мелассу с добавлением необходимых питательных компонентов. Дрожжи после выращивания при аэрации отделяют от питательной среды сепарированием, промывают и прессуют. Влажность их составляет 75 %, поэтому они не могут храниться длительное время.

Для получения хлебопекарных дрожжей используют быстрорастущие расы верхового брожения. Они должны иметь крупные клетки, хорошо сбраживать сахара при высокой концентрации сухих веществ в тесте, быть устойчивыми к вредным примесям мелассы, иметь высокую скорость генерации, обладать высокой подъемной силой и малтазной активностью. В хлебопечении применяют также сухие дрожжи, которые готовят высушиванием прессованных до влажности 7—10 %. В отечественной промышленности используют разные расы *Sacch. cerevisiae*. На многих хлебозаводах используют смесь различных рас.

Порчу хлебопекарных изделий могут вызывать неосмофильные и осмофильные виды дрожжей. Неосмофильные дрожжи обусловливают три вида порчи. Аспорогенные дрожжи при попадании в тесто могут понизить качество хлеба и придать ему нежелательный запах. *Sacch. cerevisiae* и другие бродящие дрожжи, заражая хлеб после выпечки, вызывают появление сильного запаха («фруктового», «ацетонового» и др.). Виды дрожжей, образующие гифы, могут давать на поверхности хлеба хорошо видимый рост. На темных сортах хлеба возможно появление белого налета «меловой плесени», порчу чаще всего вызывают *Hypopichia burtonii*.

Осмофильные дрожжи (*Zygosacch. rouhii*, *Zygosacch. bisporus*) опасны для кондитерских хлебопекарных изделий, при изготовлении которых компоненты с высоким содержанием сахара (джемы, мармелад, фруктовые, наливки и др.) могут портиться (забраживать).

Дрожжи в пивоварении. Пивные дрожжи, используемые в пивоваренной промышленности, обладают высокой флокуляционной способностью, медленно и полно оседают при осветлении молодого пива в конце главного брожения и готового — в конце дебраживания. Они активно сбраживают глюкозу и фруктозу, медленнее — мальтозу и еще медленнее — трисахарид мальтотриозу. Декстрины не сбраживаются и играют важную роль в создании полноты и вкуса пива. Пивные дрожжи в незначительном количестве накапливают высшие спирты, диацетил и сернистые соединения, а также обеспечивают насыщенность пива углекислотой. В настоящее время в пивоваренной промышленности применяют главным образом дрожжи *Sacch. cerevisiae* низового брожения.

При производстве пива могут развиваться посторонние виды дрожжей. Они ухудшают процесс брожения и осветления пива, вызывают его помутнение, придают посторонний вкус и запах. Описано около 30 видов «диких дрожжей», инфицирующих пиво. Однако детальное Изучение свойств многих из них показало, что многочисленные «виды» в большинстве случаев являются мутантами культурных дрожжей.

Виноделие. В настоящее время процесс брожения проводят на чистых культурах *Sacch. cerevisiae*. Раньше эти расы дрожжей называли *Sacch. vini*.

Винодельческая промышленность располагает большим количеством высококачественных рас дрожжей, позволяющих быстрее и полнее сбраживать и лучше осветлять сусло, улучшать вкус и аромат вина.

Посторонние виды дрожжей, развиваясь в вине, могут вызвать его болезни (помутнение, образование пленки, порчу вкуса).

В условиях шампанского производства жизнедеятельность дрожжей проходит «на пределе их физиологических возможностей». Шампанские расы *Sacch. cerevisiae* должны быть активны в жестких условиях производства и образовывать ценные продукты метаболизма, обуславливающие высокое качество напитка. Расы, используемые в бутылочной шампанизации, должны образовывать зернистый или уплотняющийся комками, легко спускающийся на пробку и не прилипающий к стеклу осадок; для шампанизации в непрерывном потоке применяют дрожжи с пылевидной структурой осадка.

Хлебный квас — национальный русский напиток — продукт незаконченного спиртового и молочнокислого брожения. Сырьем для производства кваса обычно служат ржаной и ячменный солод, ржаная мука, вода, сахар. Для сбраживания квасного сусла применяют смешанные культуры дрожжей *Sacch. cerevisiae* и молочнокислых бактерий. Закваску из дрожжей и молочнокислых бактерий предварительно раздельно размножают на стерильном квасном сусле и затем переводят в чан, заполненный пастеризованным суслом с сахарным сиропом. Вначале в чан задают только разводку молочнокислых бактерий, а позже разводку дрожжей. В процессе брожения в квасе накапливается 0,3—0,5 % спирта. Помутнение и прокисание кваса могут вызвать различные виды микроорганизмов. Дрожжи *Candida krusei* и *C. guillermondii* окисляют спирт, способствуют накапливанию органических кислот, образуют неприятный привкус. В порче кваса могут принимать участие также уксуснокислые бактерии.

Дрожжи — неизменные обитатели молока и молочных продуктов. Свежевыдоенное молоко не содержит дрожжей, но они появляются уже через несколько часов (до 13 % и более

от общего числа микроорганизмов). Дрожжи в молоке представлены видами *Candida* (до 90%), а также *Pichia*, *Rhodotorula*, в небольшом количестве сахаромицетами

Производство кормовых дрожжей

Большинство кормов, используемых в животноводстве, не содержат в достаточном количестве белков и витаминов. Даже такие ценные корма, как кукуруза и сахарная свекла, дающие максимальное количество кормовых единиц с гектара, богаты углеводами, но не содержат достаточного количества азотистых веществ. Этот дефицит покрывается увеличением производства растительного протеина, содержащегося в сельскохозяйственных кормовых культурах: зерне, люцерне, выпуском рыбной и мясной муки, сухих молочных продуктов. Со второй половины XX в. в качестве кормовой добавки в животноводстве стали широко применяться кормовые дрожжи. Они существенно повышают биологическую ценность кормов, прежде всего за счет содержащихся в них незаменимых аминокислот и витаминов.

В качестве сырья на нем использовали выделенные из нефти н-алканы, а в качестве продуцентов белка - дрожжи *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* и др..

В качестве других источников для получения кормового дрожжевого белка могут использоваться метанол, отходы молочной промышленности.

В настоящее время получение кормовых дрожжей ограничено мелкими местными производствами в различных хозяйствах.

Производство витаминов из дрожжей

В настоящее время чистые препараты витаминов получают главным образом синтетически, в некоторых случаях отдельные стадии их образования выполняются методами микробиологического синтеза. Распространенное ранее производство концентратов витаминов из продуктов растительного или животного происхождения сейчас полностью потеряло свое значение.

В то же время, некоторые витамины получают с помощью экстракции и очистки культуральной жидкости или биомассы микроорганизмов. Наряду с использованием непосредственно дрожжевой биомассы как источника витаминов в виде дрожжевых гидролизатов и пивных дрожжей, некоторые дрожжи используются для микробиологического производства чистых витаминов. Витамин D₂, кальциферол.

Использование дрожжей для производства чистых витаминов началось в 1930-х годах с получения витамина D. С использованием специальных рас *Saccharomyces cerevisiae* получают эргостерол, который после облучения ультрафиолетом одифицируется в витамин D₂ (кальциферол).

Существуют штаммы сахаромицетов, обладающие способностью к гиперсинтезу витамина B₂ (рибофлавина), которые могут быть использованы для получения этого витамина.

Из базидиомицетовых дрожжей, обладающих способностью к интенсивному синтезу каротиноидов, получают препараты β-каротина, являющегося предшественником витамина A, и астаксантин.

1.4 Лекция №4 (2 часа)

Тема: «Маслянокислое и ацетобутиловое брожение. Особенности брожения, возбудители».

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Маслянокислое брожение. Возбудители.
2. Ацетонобутиловое брожение. Возбудители.

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

1. Маслянокислое брожение. Возбудители.

Анаэробные бактерии рода *Clostridium* были открыты Л. Пастером в 1861 г. Он обнаружил, что некоторые представители этих бактерий сбраживают углеводы с образованием масляной кислоты.

В настоящее время в роде *Clostridium*, относящемся к семейству *Bacillaceae*, насчитывается более 60 видов бактерий. Бактерии рода *Clostridium* имеют палочковидные клетки. Они обычно подвижные, передвигаются с помощью перитрихиальных жгутиков. Образуют споры. Споры имеют овальную или сферическую форму; как правило, споры раздувают клетку (рис.29). Грамположительные. Облигатные анаэробы. Оптимальная температура их развития 30-40°C, но есть и термофильные, у которых оптимум 70°C. Особенностью этих бактерий является наличие в клетках запасного вещества — крахмалоподобного полисахарида гранулезы (в виде зернышек-гранул), окрашиваемого йодом в синеватый или коричневато-фиолетовый цвет. Они чувствительны к кислотности среды: оптимум pH 6,9-7,4, а при pH ниже 4,5-4,9 развитие прекращается. Хемоорганогетеротрофы. Сбраживают сахара, многоатомные спирты, аминокислоты, органические кислоты, пурины и пиrimидины, другие органические соединения. Ряд видов фиксирует молекулярный азот атмосферы. Маслянокислые бактерии участвуют в круговороте веществ в природе. Места обитания — почва, водоемы, а также пищеварительный тракт животных и человека.

Все виды рода *Clostridium* объединены в группу в зависимости от их способности сбраживать те или иные органические соединения.

Первая группа — сахаролитические виды *Clostridium*: сбраживают растворимые углеводы, крахмал или пектин с образованием масляной и уксусной кислот, CO₂ и H₂. Некоторые из них образуют из сахаров дополнительные нейтральные соединения (бутиловый спирт, ацетон, изопропиловый спирт и небольшие количества этилового спирта). В эту группу входят бактерии, вызывающие маслянокислое и ацетонобутиловое брожение: *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. turobyicum*, *Cl. acetobutlicum*, *Cl. butylicum* и др.

Возможно, к этой группе можно отнести и ряд видов *Clostridium* — высокоспециализированных агентов анаэробного разрушения целлюлозы, причем главные конечные продукты брожения — этиловый спирт, уксусная и янтарная кислоты, CO₂ и H₂. Особенности этих бактерий будут рассмотрены ниже.

Вторая группа — протеолитические виды *Clostridium*: сбраживают аминокислоты. Обладают сильными протеолитическими свойствами и способны к интенсивному гидролизу белков с последующим сбраживанием аминокислот. Рост в средах с белком сопровождается образованием аммиака, CO₂, H₂, жирных кислот и большого количества других летучих соединений, обладающих неприятным запахом. К этой группе относятся виды: *Cl. sporogenes*, *Cl. perfringens*, *Cl. histolyticum*, *Cl. botulinum* и др. Многие представители рода *Clostridium*, сбраживающие аминокислоты, могут сбраживать и углеводы.

Третья группа — виды *Clostridium*, сбраживающие азотсодержащие циклические соединения — пурины и пиrimидины. Пурины (гуанин, гипоксантин, ксантил и др.) под влиянием *Cl. acidiurici* и *Cl. cylindrosporum* превращаются в аммиак, уксусную кислоту и CO₂. Пирамидины сбраживаются *Cl. uracilicium* и *Cl. oroticum*; при этом уратил распадается до аланина, CO₂ и NH₃, а оротовая кислота — до уксусной кислоты, CO₂ и NH₃.

Четвертая группа. В эту группу входит вид *Cl. kluuyveri*, сбраживающий смесь этилового спирта и уксусной кислоты с образованием масляной и капроновой кислот, а также небольшого количества водорода.

Более подробно остановимся на двух типах брожения, осуществляемых сахаролитическими видами *Clostridium*, — маслянокислом и ацетонобутиловом.

Маслянокислое брожение.

Маслянокислое брожение начинается с трансформации сахаров в пировиноградную кислоту по пути Эмбдена — Мейергофа — Парнаса. Конечные продукты из пировиноградной кислоты образуются в результате цепи реакций, катализируемых несколькими ферментными системами. Процесс преобразования пировиноградной кислоты очень сложный, поэтому остановимся лишь на кратком его описании.

Пировиноградная кислота превращается в ацетил-КоА, СО₂ и Н₂ при участии ферментной системы — пируват ферредоксиноксидоредуктазы. Из ацетил-КоА через ацетилфосфат синтезируется уксусная кислота. Образование масляной кислоты начинается с конденсации двух молекул ацетил-КоА, в результате чего образуется ацетоацетил-КоА, который восстанавливается до бутирил-КоА. Масляная кислота получается из бутирил-КоА после его гидролиза и переноса КоА на уксусную кислоту.

Суммарное уравнение маслянокислого брожения имеет следующий вид:



Среди маслянокислых бактерий есть мезофильные и термофильные формы.

Практическое значение маслянокислого брожения. Маслянокислое брожение используется в промышленности для получения масляной кислоты (продуцент *Clostridium butyricum*). Хотя масляная кислота обладает резким, неприятным запахом прогорклого масла, ее эфиры отличаются приятным ароматом: метиловый эфир имеет яблочный запах, этиловый — грушевый, амиловый — ананасный. Эфиры масляной кислоты используют в кондитерской, безалкогольной, парфюмерной промышленности.

Эфиры масляной кислоты

- $\text{C}_3\text{H}_7\text{COOCH}_3$ — метилбутинат,

т_{кип} = 102,5 °C; по запаху напоминает ранет.

- $\text{C}_3\text{H}_7\text{COOC}_2\text{H}_5$ — этилбутинат,

т_{кип} = 121,5 °C; имеет характерный запах ананасов.

- $\text{C}_3\text{H}_7\text{COOC}_4\text{H}_9$ — бутилбутинат, абрикос

т_{кип} = 166,4 °C;

- $\text{C}_3\text{H}_7\text{COOC}_5\text{H}_{11}$ — н-амилбутинат банан

(н-пентилбутинат)

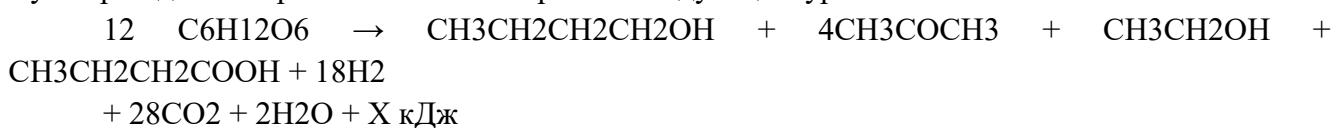
- $\text{C}_3\text{H}_7\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ — изоамилбутинат (изопентилбутинат)

имеют запах груш, а также служат растворителями в лаках для ногтей.

С другой стороны, маслянокислые бактерии могут вызывать массовую гибель картофеля и овощей, всучивание сыров, порчу консервов, прогоркание масла и маргарина, увлажненной муки и других продуктов, чем наносят большой урон народному хозяйству. Борьба с маслянокислыми бактериями затруднена из-за высокой устойчивости спор.

2. Ацетонобутиловое брожение. Возбудители.

Ацетонобутиловое брожение представляет собой превращения углеводов бактериями с образованием ацетона и бутилового спирта. При этом брожении, кроме ацетона и бутилового спирта, вырабатываются также масляная и уксусная кислоты, водород и углекислый газ. Суммарно данное брожение можно выразить следующим уравнением:



Механизм ацетонобутилового брожения

Химизм ацетонобутилового брожения еще недостаточно выяснен. В последнее время для изучения его используют метод меченых атомов. В бродящую среду вводят промежуточные продукты брожения (уксусную, ацетоуксусную и масляную кислоты), содержащие углерод С13,

а затем определяют наличие этого углерода в конечных продуктах. Этим способом установлено, что при добавлении уксусной кислоты с С13 около 50% всего меченого углерода содержится в бутиловом спирте, около 15% - в ацетоне, до 18% - углекислом газе. При добавлении масляной кислоты, содержащей С13, около 85% меченого углерода переходит в бутиловый спирт. Он найден также в этиловом спирте, в уксусной и масляной кислотах. Исходя из этих данных, считают, что образование бутилового спирта идет главным образом через масляную кислоту. Кроме того, полагают, что ацетон образуется через масляную кислоту.

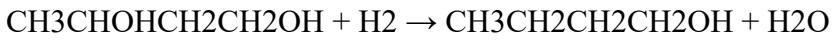
В химизме ацетонобутилового брожения имеется много общего с маслянокислым, а частности, первые стадии до образования ацетальдоля протекают подобно маслянокислому брожению. Далее между двумя молекулами ацетальдоля протекает окислительно – восстановительная: оксимасляная кислота и оксибутиловый спирт по следующему уравнению: реакция, в результате которой образуются два соединения: β - оксимасляная кислота и β - оксибутиловый спирт по следующему уравнению:



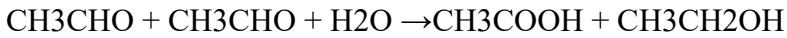
β - Оксимасляная кислота далее отщепляет водород и переходит в ацетоуксусную кислоту, которая затем распадается на ацетон и углекислый газ:



оксибутиловый спирт подвергается восстановлению до п - бутилового спирта согласно уравнению:



Часть уксусного альдегида, по-видимому, также вовлекается в окислительно-восстановительную реакцию с образованием уксусной кислоты и этилового спирта:



В ацетонобутиловом брожении наблюдаются две фазы: первая - кислотная, во время которой усиленно размножаются бактерии, а в среде накапливаются масляная и уксусная кислоты, и вторая - ацетонобутиловая, в ней уменьшается кислотность и происходит усиленное накопление ацетона, бутилового и этилового спиртов. В зависимости от условий брожения, т. е. подавляя какую – либо фазу брожения, можно получить усиленное накопление тех или иных продуктов. Следовательно, ацетонобутиловое брожение отличается от маслянокислого: при маслянокислом брожении накапливающиеся кислоты постепенно замедляют процесс кислотообразования и даже останавливают его, а при ацетонобутиловом – образовавшиеся кислоты потребляются бактериями и превращаются в другие вещества.

Возбудитель этого брожения *Clostridium acetobutylicum*. Клетки его по морфологическим признакам сходны с маслянокислыми бактериями. Это подвижные, грамположительные, палочки со спорами, развивающиеся в анаэробных условиях. Спорообразование - клостридиальное. В клетках накапливается гранулеза. По биохимическим свойствам данный вид сильно отличается от маслянокислых бактерий. Ацетонобутиловые бактерии значительно более требовательные к среде организмы, чем маслянокислые. Они нуждаются в готовых аминокислотах и витаминах. Характер конечного продукта этого брожения обуславливается как видовой принадлежностью используемого микроорганизма, так и внешними условиями: составом питательной среды, pH и температурой. Начиная с 1923 г. ацетонобутиловые бактерии широко используют в промышленном производстве ацетона и бутилового спирта из кукурузной муки или другого крахмалистого сырья. Ацетон применяют для производства искусственного шелка и кожи, фотографических пленок, искусственного цемента и др. продуктов. Бутиловый спирт используют в производстве лаков. Газы, образующиеся при ацетонобутиловом брожении, идут на синтез метилового спирта CH_3OH .

В качестве исходного сырья применяют крахмалистые продукты, не подвергшиеся осахариванию, поскольку бактерии обладают активной амилазой.

Оптимальными условиями брожения являются: концентрация затора около 6%, температура 36...37° С, рН среды 5...7. В течение многостадийного процесса брожения образуются промежуточные вещества – уксусный альдегид, муравьиная, масляная, уксусная кислоты, этанол, углекислый газ, водород и др.

1.5 Лекция №5 (2 часа).

Тема: «Пропионовокислое брожение».

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Пропионовокислое брожение: химизм и особенности
2. Использование пропионовокислых бактерий в промышленности

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

Пропионовокислые бактерии - неспороносные грамположительные неподвижные палочки размером 0,5—0,8 или 1,0—1,5 мкм. Образуют колонии жёлтого, оранжевого или красного цвета, растут как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Пропионовокислые бактерии родственны по ряду свойств гетероферментативным молочнокислым бактериям. Они не встречаются в почве или водоемах. Пропионовокислые бактерии — возбудители пропионовокислого брожения, сбраживают глюкозу, лактозу и др. углеводы, а также некоторые спирты с образованием пропионовой и уксусной кислот и CO₂.

Пропионовокислые бактерии применяют для микробиологического синтеза витамина B₁₂. Пропионовые бактерии могут синтезировать гемсодержащие белки. В их клетках обнаружены цитохромы. Пропионовые бактерии могут расти на простой синтетической среде с аммонийным азотом в качестве единственного источника азота при добавлении к среде пантотеновой кислоты и биотина, а для некоторых видов и тиамина. У ряда пропионовых бактерий обнаружена способность к азотфиксации. Местообитание пропионовых бактерий — кишечный тракт жвачных животных, молоко, твердые сыры, в приготовлении которых они принимают участие.

1. Пропионовокислое брожение: химизм и особенности

Основные продукты пропионовокислого брожения, вызываемого несколькими видами бактерий из рода *Propionibacterium*, — пропионовая (CH₃CH₂OH) и уксусная кислоты и CO₂. Химизм пропионовокислого брожения сильно изменяется в зависимости от условий. Это объясняется способностью пропионовых бактерий перестраивать обмен веществ в зависимости от аэрации. При доступе кислорода они ведут окислительный процесс, а в его отсутствии расщепляют гексозы путём брожения. Пропионовые бактерии способны фиксировать CO₂, при этом из пировиноградной кислоты и CO₂ образуется щавелевоуксусная кислота, превращающаяся в янтарную кислоту, из которой декарбоксилированием образуется пропионовая кислота.

Основное энергетическое значение для пропионовокислых бактерий имеют ключевые реакции пропионовокислого брожения. Под пропионовокислым брожением подразумевают биохимический процесс превращения бактериями сахара, молочную кислоту и ее солей в пропионовую кислоту. В этом брожении, кроме пропионовой кислоты, образуются уксусная кислота, углекислый газ, янтарная кислота, ацетоин, диацетил, другие летучие ароматические соединения - диметилсульфид, ацетальдегид, пропионовый альдегид, этанол и пропанол. Химизм данного брожения подобен типичному молочнокислому брожению с той разницей, что образовавшаяся молочная кислота в этом брожении не конечный продукт, а промежуточный.

От других типов брожения пропионовокислое отличается высоким выходом АТФ, участием некоторых уникальных ферментов и реакций.

Пропионовокислым бактериям свойственен бродильный тип метаболизма: они расщепляют сахара по пути Эмбдена–Мейергоффа до пропионата, ацетата, СО₂ и сукцинатов. В пропионовокислом брожении мы имеем дело с карбоксилированием пирувата, приводящим к возникновению нового акцептора водорода — ЩУК. Восстановление пировиноградной кислоты в пропионовую у пропионовокислых бактерий протекает следующим образом. Пировиноградная кислота карбоксилируется в реакции, катализируемой биотинзависимым ферментом, у которого биотин выполняет функцию переносчика СО₂. Донором СО₂-группы служит метилмалонил-КоА. В результате реакции транскарбоксилирования образуются ЩУК и пропионил-КоА.

Ключевую реакцию брожения - превращение а -метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА катализирует кофермент В₁₂ (Ado Cbl).

Пировиноградная кислота - обязательное промежуточное соединение в брожении.

Пирамидат может быть превращен в пропионат несколькими путями:

- 1). пирамидат → акрилат → пропионат;
- 2). пирамидат → лактат → пропионат;
- 3). пирамидат + С₁ → сукцинат → метилмалонат → пропионат.

Реакции, ведущие к образованию пропионовой кислоты у пропионовокислых бактерий, могут быть представлены следующей последовательностью: Пирамидат + метилмалонил-КоА (а) ↔ оксалоацетат + пропионил-КоА; Оксалоацетат + пропионил-КоА; Сукцинат + пропионил-КоА (+ КоА-трансфераза) ↔ сукцинил-КоА + пропионат; Сукцинил-КоА ↔ (+метилмалонилизомераза) ↔ метилмалонил-КоА; Метилмалонил-КоА ↔ (+метилмалонилрацимаза) ↔ метилмалонил-КоА (а)

Суммарно: **пирамидат + 4 Н⁺ → пропионат.**

Превращение оксалоацетата в сукцинат происходит в результате работы ферментов ЦТК: малатдегидрогеназы, фумаразы и сукцинатдегидрогеназы. Уксусная кислота образуется в результате окислительного декарбоксилирования пирамидата: Пирамидат + НАД⁺ + КоА (+пирамидатдегидрогеназа) ↔ ацетил-КоА + Н⁺ + НАДН + СО₂; Ацетил-КоА + Ф_н (+фосфотрансакетилаза) ↔ ацетил-Ф + КоА, ацетил-Ф + АДФ (+ацетилкиназа) ↔ ацетат + АТФ.

Кроме основных продуктов в разных количествах в культуральной жидкости пропионовых бактерий обнаружены молочная, муравьиная, изовалериановая кислоты, этиловый и пропиловый спирты, уксусный и пропионовый альдегиды, ацетоин, диацетил.

Соотношение продуктов брожения может быть разное и в значительной степени зависит от степени окисленности источника углерода. Соотношение пропионовой и уксусной кислот зависит от состава и свойств среды и внешних условий существования микроорганизмов. В сырах в период максимального развития культуры пропионовых бактерий в основном образуются относительно окисленные соединения, в период спада развития – преимущественно более восстановленные. Но при замедлении развития культуры *P. shermanii* уксусная кислота превалирует перед пропионовой, однако и в этом случае отношение пропионовой кислоты к уксусной возрастает.

Между количеством микроорганизмов и количеством образующихся кислот нет прямой связи. Изменение состава карбоновых кислот в питательной среде значительно влияет на производство пропионовой и уксусной кислот культурами *P. shermanii*. В присутствии лактозы производство пропионовой кислоты происходит более энергично, чем в присутствии глюкозы. При сбраживании культурами *P. jensenii* пировиноградной кислоты более окисленной, чем молочная, также наблюдается, что соотношение пропионовой и уксусной кислот смещается в сторону более окисленной уксусной. Соотношение кислот зависит от состава закваски. Так, при использовании закваски с двумя культурами – *L. helveticum* и *Str. thermophilus* это соотношение ниже, чем при использовании одной *L. helveticum*.

Таким образом, уникальность пропионовокислого брожения обусловлена:

1) участием ФЕП – карбоксилтрансфосфорилазы фермента, не обнаруженного у других организмов, синтезирующих пропионат; благодаря наличию этого фермента, брожение, осуществляющееся пропионово-кислыми бактериями, работает как циклический процесс.

2) особым способом образования пропионата, которое сопряжено с восстановлением фумарата до сукцината и окислением пирувата до ацетата и CO_2 ; транспорт электронов, сопровождающий эти реакции, сопряжен с окислительным фосфорилированием и синтезом АТФ;

3) высокий выход АТФ, превышающий выход АТФ в других известных брожениях. 1,5 М глюкозы могут дать пропионовокислым бактериям около 6 М АТФ.

2. Использование пропионовокислых бактерий в промышленности

Сыроделие – наиболее древняя биотехнология, использующая биохимическую активность пропионовых бактерий. Первые исследования пропионовокислых бактерий были связаны с изучением их роли в созревании сыров. Наиболее высокими органолептическими свойствами и длительными сроками хранения обладают твердые сырьи с высокой температурой второго нагревания, при изготовлении которых принимают участие пропионовокислые бактерии.

Основная роль пропионовокислых бактерий в созревании сыров состоит в использовании лактатов, образованных молочнокислыми бактериями при сбраживании лактозы молока, при этом лактаты превращаются в пропионовую, уксусную кислоты и CO_2 .

Созревание сыра – сложный биохимический процесс, протекающий при участии сычужного фермента, ферментов молока, молочнокислых и пропионовых бактерий. Происходят энзиматические изменения в белках, жире, аминокислотах; формируется аромат, внешний вид, консистенция сыра. Пропионовокислые бактерии размножаются в сыре в значительном количестве в период выдерживания его в бродильном подвале, рост их продолжается в течение всего периода созревания. В результате пропионовокислого брожения образуются специфический вкус и запах, а также характерный рисунок «Швейцарского» сыра.

Пропионовокислые бактерии также применяют в хлебопечении. Их наряду с молочнокислыми бактериями и дрожжами вводят в некоторые закваски для теста с целью образования в процессе ферментации пропионовой кислоты. При внесении в тесто такой закваски хлеб содержит 0,1% уксусной, 0,2% молочной, 0,1% пропионовой кислоты.

Использование пропионовокислых бактерий нашло себя в кисломолочном производстве. С целью обогащения витамином B_{12} в кефир и другие молочнокислые продукты вносили пропионовокислые бактерии, повышая, таким образом, питательные свойства и лечебную ценность этих продуктов.

Разбавление молока творожной сывороткой приводит к экономии молока, но вместе с тем и к разбавлению его, вследствие чего содержание в продукте сухих веществ, витаминов, белка снижается. Эти неизбежные потери компенсируются использованием в составе закваски пропионовокислых бактерий, синтезирующих белки, витамины, внеклеточные полисахариды, увеличивающие вязкость продукта.

При изготовлении сметаны применение закваски, содержащей продукты витаминов группы В, позволяет вести процесс ее производства в одинаковых условиях независимо от жирности сырья, при этом сквашивание ведут при 30–32°C, что ускоряет процесс и позволяет получить продукт с высокими питательными свойствами.

Пропионовокислые бактерии также применяют для микробиологического синтеза витамина B_{12} . У пропионовокислых бактерий обнаружена способность к активному синтезу витамина B_{12} , который накапливается внутри клеток. Эта особенность используется для промышленного получения витамина B_{12} на отходах производства (молочной сыворотке и др.) с добавлением кукурузного экстракта в качестве источника витаминов.

1.6 Лекция №6 (2 часа).

Тема: «Получение белка».

1.6.1 Вопросы лекции:

1. Производство кормовых белковых продуктов
2. Описание технологической схемы производства кормовых дрожжей

1.6.2 Краткое содержание вопросов:

1. Производство кормовых белковых продуктов. Как промышленный процесс, микробиологическое производство белка не требует посевных площадей, не зависит от климатических и погодных условий, поддается точному планированию и высокому уровню автоматизации, позволяет получать продукцию стандартного качества. Продукты микробиологического синтеза можно назвать своеобразными видами кормов и пищи, но неверно считать их синтетическими или искусственными. Разнообразие микроорганизмов и типов их питания позволяют микробиологический промышленности легко маневрировать в использовании различных видов сырья для биосинтеза. Получение белковых веществ – крупнейшее по тоннажу и важнейшее по значению производство микробиологической промышленности.

Идею использования микроорганизмов как белковых компонентов в питании в 1980-х годах начал пропагандировать Дельбрюк, рекомендовавший применять для этой цели пивные дрожжи. Первое производство пищевых дрожжей на мелasse возникло в Германии в первую мировую войну.

Нехватка белка в питании отрицательно сказывается на здоровье взрослого человека, понижает физическую и умственную работоспособность, а у детей замедляет физическое, а иногда и умственное развитие.

При выращивании животных и птиц недостаток белка приводит к перерасходу корма, ухудшению здоровья животных. Главной характеристикой питательной ценности белка является сбалансированность его аминокислотного состава.

На микробную биомассу, предназначенную для использования в качестве компонента корма или пищи, полностью распространяются ограничения, налагаемые на другие кормовые и пищевые добавки. Это относится к допустимым нормам содержания патогенных микроорганизмов, канцерогенов, токсинов, тяжелых металлов и т.д.

Вместе с тем к микробной биомассе предъявляются специфические требования, связанные как с особенностями микроорганизмов вообще, так и с особенностями конкретной биомассы, обусловленными спецификой штамма и условий его выращивания.

Нуклеиновые кислоты являются непременным компонентом клетки. В быстро растущих микроорганизмах их содержится больше, чем в клетках животных и растений. Входящие в состав нуклеиновых кислот пуриновые основания в организме животного превращаются в мочевую кислоту. У беспозвоночных, рыб, амфибий и многих млекопитающих, включая сельскохозяйственных животных превращение мочевой кислоты в более растворимый аллантоин катализуется ферментом уриказой. Поэтому даже довольно высокое содержание пуринов в корме практически не опасно для сельскохозяйственных животных. В организме человека уриказы мало, основной продукт катаболизма пуринов у человека – плохо растворимая мочевая кислота. Она выводится из организма в основном с мочой.

Поэтому ВОЗ ввела рекомендации по ограничению употребления нуклеиновых кислот: не более 2 г в сутки. При более высоком потреблении этих кислот в плазме крови и в моче может повыситься содержание мочевой кислоты, а это увеличивает риск заболеть подагрой и привести к образованию камней в мочевыводящих путях у предрасположенных к этому людей.

На содержание нуклеиновых кислот у микроорганизмов, особенно бактерий, значительное влияние оказывает скорость их роста: чем выше удельная скорость роста, тем больше в полученной биомассе нуклеиновых кислот и тем ниже отношение белок/нуклеиновые кислоты. Обычно 2 г нуклеиновых кислот содержится в 20-30 г высушеннной биомассы дрожжей или 10-20 г бактерий.

Клетки могут быть освобождены от подавляющей части нуклеиновых кислот по методу так называемого теплового шока, вызывающего активизацию внутриклеточных РНКаз. По этому методу дрожжи в течение нескольких секунд подвергают действию высокой температуры, а затем выдерживают несколько часов при 50-55°C.

Другие способы снижения содержания нуклеиновых кислот в клетках основаны на применении экзогенных рибонуклеаз либо на обработке клеток растворами некоторых кислот, щелочей и метанолом.

В липидах микроорганизмов встречаются компоненты, физиологическое действие которых на организм животного недостаточно изучено. У ряда бактерий широко распространен полимер β -оксимаслянной кислоты, безвредность которого исследована лишь частично. Содержание полимера может колебаться в очень широких пределах в зависимости от условий культивирования микроорганизмов.

В липидах бактерий имеются циклопропановые кислоты, способные угнетать окисление жирных кислот в организме животного. Неблагоприятное воздействие биомассы водородных бактерий на организм человека частично связывается с наличием в их клетках C17-циклической кислоты.

В клетках у некоторых бактерий обнаружены разветвленные жирные кислоты, которые могут нарушать обменные процессы микроорганизма.

Все эти компоненты липидов отсутствуют в дрожжах. В этом отношении дрожжи не вызывают опасений.

В стандартах на кормовые дрожжи, получаемые на углеводородах, содержатся ограничения и так называемые остаточные углеводороды. Эти разнообразные вещества одно время рассматривали как не свойственные биологическим объектам, попадающие в организм человека из нефти через посредство кормовых дрожжей и сельскохозяйственных животных.

Для снижения содержания углеводородов в дрожжах разработаны специальные технологические приемы. Дрожжи, выращенные на дизельном топливе или нефтяных дистиллятах, должны быть подвергнуты глубокой экстракционной очистке органическими растворителями, а полученные на алканах, выдерживают в режиме голодания по органическому субстрату, а затем подвергают промывке.

Некоторое количество углеводородов удаляется из дрожжей в процессе сушки.

Для производства белка используют микроорганизмы, не вызывающие аллергических реакций у производственного персонала и не обладающие патогенными свойствами. При оценке штаммов дрожжей по этим показателям в качестве стандарта непатогенности используются пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Оценка показателей безвредности конкретной микробной биомассы дается на основании химических, санитарно-гигиенических, ветеринарно-зоотехнических и медико-биологических исследований. Анализу подвергаются как собственно кормовая добавка, так и пищевые продукты животноводства, полученные при ее использовании. Белоксодержащие продукты, предназначенные непосредственно для питания человека, подвергаются более тщательному исследованию. Все это позволяет разработать технологии производства и способы применения белоксодержащих продуктов микробного происхождения, гарантирующие их полную безопасность для человека.

Рациональный процесс выращивания осуществляют при лимитировании роста микроорганизмов кислородом или близко к такому лимитированию. Поэтому при рациональном проведении процесса выращивания, когда массообменная характеристика ферментера используется наиболее полно, скорость физиологической теплопродукции в ферментере постоянна, она не зависит от используемого органического субстрата и применяемого штамма микроорганизма.

2. Описание технологической схемы производства кормовых дрожжей

Выращенные клетки дрожжей отделяют от водной среды сепарированием, или фильтрованием, если используют мицелиальные грибы. Разработаны и другие методы отделения биомассы, например флотация, для концентрирования мелких бактериальных клеток.

Их обычно промывают, концентрируют, после чего подвергают термической обработке при 80-900С, приводящей к отмианию клеток. Полученную в результате такой обработки сметанообразную массу высушивают, используя, как правило, распылительные сушилки. После высушивания получают порошкообразный или хлопьевидный продукт, который можно подвергнуть гранулированию. Продукт упаковывают и направляют на комбикормовые заводы и другим потребителям. Такие белоксодержащие добавки микробного происхождения имеют то или иное коммерческое название в зависимости от применяемого органического сырья, штамма микроорганизма и особенностей технологии, используемой на различных предприятиях.

Для микробиологического производства белковых веществ используются штаммы и процессы, не приводящие к образованию и накоплению в среде значительного количества органических продуктов метаболизма.

Важнейшими обобщающими физиологическими характеристиками роста микроорганизмов являются его скорость и эффективность. Эффективность роста является технологическим показателем первостепенной важности и выражается через энергетический выход. Нет условий оптимальных для роста вообще, а есть условия оптимальные для скорости роста, и условия, оптимальные для эффективности роста. Локализация оптимума для этих двух характеристик может быть различной.

При микробиологическом получении белка на любом конкретном субстрате важно, чтобы ферментер работал с наибольшей производительностью, т.е. его массообменная характеристика использовалась бы в максимальной мере. Вместе с тем избыток органического субстрата подавать в ферментер не целесообразно, так как он не будет использован, затруднит очистку сточных вод, а при выращивании микроорганизмов на углеводородах в избыточном количестве попадает в продукт.

Процесс наращивания белковой биомассы лимитируется различными факторами, такими как

Соотношение СО₂ к О₂,
Органический субстрат,
Количество и соотношение азота, серы и других важных элементов.

И описываются уравнениями материально-технического баланса. Эти уравнения сейчас разработаны в виде специальных компьютерных программ, которые помогают контролировать процесс производства на предприятии.

1.7 Лекция №7 (2 часа).

Тема: «Производство вакцин, бактериофагов и препаратов, нормализующих микрофлору человека».

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов

1.7.2 Краткое содержание вопросов:

Под общим названием вакцины объединяют препараты, способствующие созданию активного иммунитета у людей и животных. Вакцины получают как из самих патогенных микроорганизмов, так и используя продукты их жизнедеятельности.

Лечебно-профилактические препараты бактериофагов

Для лечения и профилактики ряда инфекций наряду с другими препаратами применяют вирусы бактерий — бактериофаги, обладающие высокой специфичностью к патогенным и условно-патогенным бактериям. Избирательность их действия значительно выше, чем антибиотиков и других химиотерапевтических средств. Бактериофаги не оказывают влияния на нормальную микрофлору. Они сами фактически относятся к нормальной микрофлоре. Естественной средой обитания многих фагов служат фекалии, речные и сточные воды, куда они попадают вместе с фекалиями и где играют роль одного из факторов самоочищения внешней среды.

Большую группу среди них составляют бактериофаги против кишечных инфекций: дизентерийный, брюшнотифозный, сальмонеллезный групп АВСДЕ, коли-протейный. Широкое распространение антибиотикорезистентных форм бактерии и осложнения, связанные с применением химиотерапевтических средств, привели к потребности в так называемых раневых бактериофагах — стафилококковом, протейном, синегнойной палочки.

Возможность приготовления бактериофагов, высокоспецифичных по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам (в том числе к антибиотико- и сульфаниламидо-устойчивым формам), представляет большой интерес для лечения и предупреждения заболеваний, отягощенных дисбактериозом — нарушениями в нормальной аутофлоре.

Получение препаратов бактериофагов высокого качества достигается только благодаря хорошо организованной совместной работой производственников, сотрудников лабораторий и больниц. Широкая валентность и сила литического действия бактериофагов определяется систематическим подбором штаммов от больных и бактерионосителей, постоянным обновлением производственных штаммов за счет свежевыделенных. Одновременно производится непрерывная работа по выделению изначально сильных штаммов вирулентных фагов из сточных и речных вод (реже из фекалий или гноя). Для повышения активности фагов используются пассажи *in vitro*, а также на животных. Одним из эффективных методов пассивирования *in vivo* является использование изолированной петли тонкого кишечника морских свинок или белых мышей.

Из большой коллекции монофагов комплектуют комплексный маточный бактериофаг, поступающий для получения серии в производственный реактор. В качестве субстрата для размножения серийного препарата используют набор штаммов. Лечебная и профилактическая эффективность бактериофага определяется тем, в какой мере его структура соответствует этиологической структуре заболеваний на определенной территории. При применении бактериофагов очень важно не только проверять чувствительность возбудителя к препарату, но и направлять все нелинизирующиеся штаммы бактерий в институт, из которого получен бактериофаг. Нецелесообразно использовать для лечения (или профилактики) бактериофаг, к которому не чувствителен штамм бактерий, выделенный от больного (или большая часть штаммов бактерий, циркулирующих в данной местности). Возможен подбор и специальное приготовление для конкретных больных аутофагов к штаммам, которые не лизируются серийным препаратом.

Технологический процесс производства жидких бактериофагов состоит из следующих этапов: подбор штаммов для производства данного вида фага, получение маточных бактериофагов, приготовление серий жидкого бактериофага, контроль готового препарата на стерильность, безвредность и литическую активность, этикетировка и упаковка препарата.

Отобранные для производства штаммы должны находиться в S- и O-формах, обладать типичными морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами. Для лучшего сохранения целесообразно после проверки свойств культур высушивать их под вакуумом до замороженного состояния (лиофилизировать) и хранить в темном месте при температуре +4, +6°C. Производственная коллекция непрерывно пополняется свежевыделенными штаммами.

Для получения маточных бактериофагов к пробам речных и сточных вод подсевают соответствующую культуру бактерии и после инкубации при 37 °C фильтруют через стерилизующие фильтры. Литическая активность фильтратов проверяется титрованием в жидкой питательной среде (по Аппельману) с набором штаммов данного вида. Наиболее активные используют для приготовления маточных фагов.

Серийный бактериофаг готовят в реакторах емкостью от 250 до 500 л. Реакторы имеют паровую рубашку с разрешающим давлением 3- 105 Па (3 атм), пропеллерную мешалку, спусковой вентиль и систему труб для аэрации среды. Реактор и все его части изготавливают из нержавеющей стали.

В состав питательных сред для получения кишечных и раневых бактериофагов входят белковые основы в виде кислотных или ферментативных гидролизатов казеина, мяса (гидролизат Хоттингера, пептон Мартена). В качестве источника ростовых факторов используют мясные экстракти, чаще с добавлением глюкозы, значение pH среды устанавливают в пределах 7,2—7,6 в зависимости от вида бактерий, для которых специфичен бактериофаг.

В реактор с питательной средой (37°C) засевают нативную взвесь бактерий из расчета 50—150 млн. клеток на 1 мл среды. Маточный фаг добавляют в количестве 0,01—0,1% объема питательной среды. Содержимое тщательно перемешивают воздухом. Воздух, подаваемый в реактор под давлением, поступает через стерильный ватно-угольный фильтр с активированным углем. Лизис проходит при температуре 37°C в течение 4—10 ч (в зависимости от вида бактериофага). Полноту лизиса определяют визуально (по полноте прозрачности). По завершении процесса добавляют консервант хинозол (0,01%). Через 1,5—2 ч после добавления консерванта фаголизат фильтруют через стерилизующие пластины и разливают в стерильных условиях во флаконы по 100, 50 и 25 мл.

Для получения сухого бактериофага первые три стадии аналогичны. Затем проводится концентрация фага, его высушивание, таблетирование, нанесение кислотоустойчивого покрытия. Контроль сухого препарата проводится на специфическую стерильность, на наличие постоянных микроорганизмов, безвредность, литическую активность, остаточную влажность, растворимость в искусственном желудочном соке. Бактериофаг фасуется подобно другим таблетированным препаратам, этикетируется и упаковывается. Кроме таблетированной формы (по аналогии с другими фармакопейными формами) бактериофаг может готовиться на мазевой основе или в виде ректальных свечей.

Концентрация жидкого бактериофага может проводиться путем высаливания сульфатом аммония, который добавляют в количестве 69% от объема фага. Высаливание продолжается 18 ч без последующего диализа при температуре +2 - +4°C, pH 6,9—7,0. К образовавшейся пастообразной массе добавляют в качестве стабилизатора глюконат кальция (9%). Если защитным покрытием служит пектин, его добавляют одновременно с глюконатом кальция (3% к массе). Массу наносят на кассеты (толщина слоя 1 см) и высушивают из замороженного состояния под вакуумом в аппаратах для лиофилизации до достижения остаточной влажности 2—4%. Высшенную массу размельчают в грануляторе, контролируют на специфическую стерильность, обсемененность посторонними микроорганизмами и литическую активность. С учетом литической активности различных компонентов составляется смесь для таблетирования поливалентного бактериофага и определяется масса одной таблетки (в пределах 0,11—0,25 г). Таблетирование производится на специальных прессах с использованием пуансонов, обеспечивающих получение таблеток чечевицеобразной формы, без резких граней. Таблетки, полученные из массы, к которой для защиты корпускул фага не добавлялся пектин, покрывают во вращающемся дражировочном котелке ацидорезистентной оболочкой из 5%-ного раствора ацетофталата целлюлозы. Растворителем служит смесь ацетона с этиловым спиртом в соотношении 7:3. Наносится покрытие с помощью специального распылителя (рисунок 5.2).

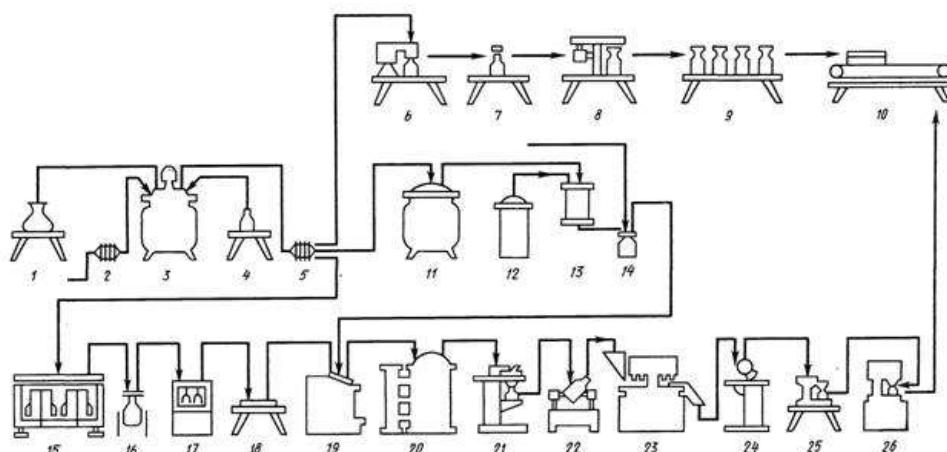


Схема технологического процесса производства жидкого и сухого бактериофага:

1 — засев культуры (составление нативной взвеси), 2 — многорамный фильтр, фильтрующий питательную среду, 3 — реактор, 4 — бутыль емкостью 1 л со смесью маточных фагов, 5 — многорамный фильтр (стерилизующий), 6 — разлив препарата во флаконы, 7 — укупорка флаконов резиновой пробкой, 8 — закатка алюминиевым колпачком, 9 — хранение продукции на период контроля, 10 — этикетировка и фасовка на конвейере, 11 — реактор разведения 1 : 2, 12 — элюирующий раствор, 13 — колонки с ДЭАЭ-целлюлозой, 14 — емкость (сбор концентрата и добавление обрата молока 1 : 2), 15 — ванна осаждения, 16 — бачок для освобождения от жидкости, 17 — смеситель сырой массы, 18 — расфасовка массы в кассеты, 19 — емкость для предварительного замораживания, 20 — вакуум-сушильный аппарат, 21 — гранулятор, 22 — смеситель сухой массы, 23 — таблеточная машина, 24 — установка для покрытия таблеток, 25 — счетно-фасовочная машина, 26 — закаточная машина

Концентрацию жидкого бактериофага можно проводить методом ионообменной хроматографии с использованием волокнистой ДЭАЭ-целлюлозы. При этом профильтрованный бактериофаг разводят пополам стерильной дистиллированной водой и пропускают через хроматографические колонки с ДЭАЭ-целлюлозой. Затем проводят элюцию (освобождение бактериофага, прикрепившегося к поверхности клетки или какой-либо частицы, осуществляющее, например, путем изменения температуры или повышения молярности раствора) бактериофага 0,7—1,0 М раствором NaCl на 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0—7,4) с добавлением 1 % сернокислого аммония. Концентрат стерильно собирают в емкости, добавляя в качестве стабилизатора 50 % обрата молока и 2 % глюкозы, а затем подвергают лиофилизации. В настоящее время бактериофаги выпускаются в широком ассортименте.

Бактериофаг дизентерийный — препарат, активный в отношении дизентерийных бактерий. Применяют для лечения и профилактики дизентерии.

Бактериофаг брюшнотифозный — смесь бактериофагов, активных в отношении возбудителей брюшного тифа различных фаготипов. Препарат применяют для предупреждения заболеваний брюшным тифом контактировавших с больным.

Бактериофаг сальмонеллезный групп АВСДЕ — смесь фаголизатов разных сальмонелл. Сальмонеллезный бактериофаг применяют для лечения и санации больных и носителей, а также с профилактической целью по эпидпоказаниям на предприятиях мясоперерабатывающей промышленности. Препарат может быть использован и в ветеринарной практике.

Коли-бактериофаг — смесь бактериофагов, активных в отношении наиболее распространенных серологических групп кишечной палочки. Применяется для лечения и профилактики колиэнтеритов.

Бактериофаг протейный представляет большой интерес в связи с проблемой дисбактериоза, так как активен по отношению к бактериям рода *Proteus* (*P. vulgaris* и *Y. mirabilis*), одному из высокоустойчивых к антибиотикам микроорганизмов, агрессивность которого выявляется при нарушениях нормального состава микроорганизмов. Может выпускаться в ассоциации с колифагом под названием коли-протейный бактериофаг. Колифаги — бактериофаги (вирусы бактерии), которые заражают бактериальную клетку, размножаются в ней и убивают её.

Бактериофаг стафилококковый — фильтрат фаголизата стафилококков. Его применяют местно для лечения гнойных заболеваний — фурункулеза, гнойно-осложненных ран, абсцессов и др. При кишечных заболеваниях, связанных со стафилококком, бактериофаг вводится через рот или в клизмах подобно кишечным фагам.

Бактериофаг пиоцианеус (синегнойный) — фильтрат фаголизата *Pseudomonas aeruginosa*, специфически лизирующий соответствующую бактерию. Применение подобно стафилококковому.

1.8 Лекция №8 (2 часа).

Тема: «Биогеотехнология».

1.8.1 Вопросы лекции:

1. Биогидрометаллургия
2. Микробиологический способ извлечения золота
3. Биосорбция металлов из растворов
4. Обогащение руд
5. Извлечение нефти

1.8.2 Краткое содержание вопросов:

Биогеотехнология занимается вопросами добычи, обогащения и переработки руд, отделения и концентрирования металлов из сточных вод как вторичного сырья, экстракции остаточных порций нефти из иссякающих месторождений. Большую роль в этих процессах играют микроорганизмы, способные жить в недрах Земли и осуществлять там химические превращения. Биотехнология играет все возрастающую роль при добыче нефти из сложных в эксплуатации залежей с помощью микроорганизмов. Во-первых, в нефтяной промышленности используются поверхностно-активные вещества микробного происхождения. Бактерии - деэмульгаторы, например *Nokardia sp*, *Rhodococceos rhodochrous*, разделяют водную и нефтяную фазы, что может быть использовано как для концентрирования нефти, так и для очистки сточных вод от нефтяных примесей, создающих угрозу для окружающей среды. Во-вторых, некоторые образуемые микроорганизмами полимеры, особенно производные ксантанана можно использовать в качестве компонентов закачиваемых в пласт растворов, обладающих нужными реологическими характеристиками, для добычи остаточной нефти. Ксантан, внеклеточный полисахарид бактерии *Xanthomonas campestris*. Остаточные порции нефти обычно адсорбируются на различных породах, содержащихся в нефтеносных пластах, и не вымываются из них водой. Раствор ксантана в воде обладает высокой вязкостью и при закачке в пласты под повышенным давлением высвобождает капли нефти из всех трещин нефтеносных пород. Как микробиологи, так и геологи давно осознали тот факт, что микроорганизмы играют важную роль в концентрировании и распределении химических элементов в литосфере. Это особенно справедливо для многих металлов, которые, являясь существенными компонентами сложных биологических реакций, необходимы для поддержания метаболизма у большинства микроорганизмов. Металлы непосредственно включаются во внутриклеточные биохимические реакции, вследствие этого микроорганизмы могут их накапливать или выделять в концентрированном виде. Способностью переводить металлы в растворимые соединения (выщелачивать металлы из руд) обладают различные бактерии. Например: *Chromobakterium violaceum* растворяет золото по схеме Au - Au(CN)2; *Thiobacillus ferrooxydans* выщелачивает железо, медь, цинк, уран и другие металлы, окисляя их серной кислотой, которая образуется этой бактерией из сульфидов. Технологии подобных процессов подкупают своей простотой: для извлечения остатков меди, урана, никеля из "пустых" пород горнорудного производства их обливают водой и собирают вытекающие продукты жизнедеятельности микроорганизмов - растворимые соединения (CuSO4, UO2 и т.д.). Метод бактериального выщелачивания позволяет рассматривать разработку бедных месторождений как экономически выгодное предприятие. В США бедные никелевые руды, содержащие всего около 1 кг никеля на 1 т породы, предполагают разрабатывать с применением бактериального выщелачивания. При извлечении металлов из сточных вод большое значение придается таким микроорганизмам, как *Citrobacter sp.*, *Zoogloea ramigera*, клетки и внеклеточные полисахарида которой извлекают U, Cu, Cd. Высокая хелирующая способность грибной биомассы, учитывая сравнительную дешевизну ее наработки в больших количествах, открывает перспективы не только для концентрирования металлов (Pb, Hg, Zn, Cu, Ni, Co, Mn, Cr, Ag, Au, Pt, Pd) из растворов, где

они присутствуют в следовых количествах, но и для освобождения растворов от радиоактивных примесей (дезактивации). Способность микроорганизмов принимать участие в круговороте металлов положена в основу нового направления биогеотехнологии металлов. Биогеотехнология металлов – это процессы извлечения металлов из руд, концентратов, горных пород, растворов под действием микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности при нормальном давлении и физиологической температуре (от 50С до 900С). Составными частями биогеотехнологии являются:

- биогидрометаллургия или бактериальное выщелачивание;
- биосорбция металлов из растворов;
- обогащение руд.

1.Биогидрометаллургия

Еще древние римляне, финикийцы и люди иных ранних цивилизаций извлекали медь из рудничных вод. В средние века в Испании и Англии применяли метод выщелачивания для получения меди из медьсодержащих минералов. Естественно, древние горняки не догадывались, что в процессе принимают участие микроорганизмы. В настоящее время метод бактериального выщелачивания руд хорошо изучен и применяется достаточно широко. Главным производителем меди добытой таким способом является США. В 1947 г. в США Коллири и Хинкли выделили из шахтных дренажных вод микроорганизмы, окисляющие железо и восстанавливающие серу. Микроорганизмы были идентифицированы как *Thiobacillus ferrooxidans*. Было доказано, что эти железоокисляющие бактерии в процессе окисления переводят медь из рудных минералов в раствор. Затем были выделены и описаны многие другие микроорганизмы, участвующие в окислении сульфидных минералов. А спустя несколько лет, в 1958 г. В США зарегистрирован первый патент на получение металлов из концентратов с помощью железобактерий. Позже было доказано, что в сульфидных рудах распространены и другие бактерии, окисляющие Fe²⁺, S0 и сульфидные минералы, - *Leptospirillum ferrooxidans*, *Thiobacillus organoparatus*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* и др. *Leptospirillum ferrooxidans* окисляет Fe²⁺, а при совместном присутствии с *Thiobacillus thiooxidans* или *Thiobacillus organoparatus* – сульфидные минералы при pH 1,54,5 и температуре около 28 0C. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* окисляет Fe²⁺, S0 и сульфидные минералы при pH 1,9-3,5 и температуре 500C. Ряд других термофильных бактерий окисляет Fe²⁺, S0 и сульфидные минералы при pH 1,4-3,0 и температуре от 500C до 800C. Процессы окисления неорганических субстратов служат для этих бактерий единственным источником энергии. Углерод для синтеза органического вещества клеток они получают из CO₂, а другие элементы – из руд и растворов. При бактериальном выщелачивании руд цветных металлов широко используются тионовые бактерии *Thiobacillus oxidans*, которые непосредственно окисляют сульфидные минералы, серу и железо и образуют химический окислитель Fe³⁺ и растворитель – серную кислоту. Поэтому расход H₂SO₄ при бактериальном выщелачивании снижается. Скорость окисления сульфидных минералов в присутствии бактерий возрастает в сотни и тысячи раз по сравнению с химическим процессом. Селективность процесса бактериального выщелачивания цветных металлов определяется как кристаллохимическими особенностями, так и электрохимическим взаимодействием. Редкие элементы входят в кристаллические решетки сульфидных минералов или вмещающих пород и при их разрушении переходят в раствор и выщелачиваются. Следовательно, в выщелачивании редких элементов бактерии играют косвенную роль. В процессе выщелачивания марганца из карбонатных руд участвуют нитрифицирующие бактерии из родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrobakteria*, *Nitrococcus*. Сульфатвосстановливающие бактерии в анаэробных условиях восстанавливают сульфаты, сульфиты, тиосульфаты, иногда серу. В процессе разрушения горных пород участвуют также некоторые гетеротрофные микроорганизмы, использующие в качестве источника энергии органические вещества и выделяющие в качестве метаболитов органические кислоты. Так, силикатные породы разрушаются представителями рода *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium* и др. Процесс выщелачивания осуществляется, как правило, с участием бактериальной ассоциации микроорганизмов, выделенной из того же месторождения, что и минералы, которые должны быть переработаны. Часто употребляют

термины “прямые” и “непрямые” методы бактериального окисления металлов. Эти понятия относятся к растворению сульфидных пород непосредственно бактериями и с помощью железа Fe³⁺, образовавшегося при бактериальном окислении железа. В ходе непрямого окисления образуется сера, которая вновь окисляется бактериями до серной кислоты. Бактериальное окисление является сложным процессом, включающим:

- адсорбцию микроорганизмов на поверхности минерала или горной породы;
- деструкцию кристаллической решетки;
- транспорт в клетку минеральных элементов;
- внутриклеточное окисление.

Процесс реализуется по законам электрохимической коррозии. Бактериальное выщелачивание, называемое также биогидрометаллургией или биоэкстрактивной металлургией в промышленности. Бактериальное выщелачивание может быть осуществлено следующими способами:

- извлечение металлов из бедных руд в кучах, отвалах;
- выщелачивание руды *in situ* (подземное выщелачивание);
- полное выщелачивание концентратов фильтрацией через неподвижный слой или в реакторе с перемешиванием;
- частичное выщелачивание концентратов для удаления или для предварительной подготовки к переработке другими технологиями.

2.Микробиологический способ извлечения золота

Во всем мире золото добывается экологически опасным цианидным способом. С помощью микробов можно обезвредить цианидсодержащие стоки действующих золотоизвлекающих предприятий. Суть цианидного способа извлечения золота в следующем: руду измельчают до определенного размера частиц и подвергают гравитационному обогащению, полученный концентрат отправляют на промывку. Так называемые хвосты после гравитационного обогащения доизмельчают до 74 микронов частиц, потом подвергают цианированию, т.е. растворяют мелкие частицы золота в цианидном растворе, после чего оно улавливается различными сорбентами. Этот метод отталкивается от того, что в составе золотой руды есть живые клетки-бактерии, и некоторые из них обладают способностью активно функционировать в среде с высоким содержанием металлов. С помощью бактерий можно также разрушать кристаллы минералов, в которых, как в клетку, заключено золото. Метод биогеотехнологического извлечения золота особенно перспективен в тех случаях, когда золото находится в ультрадисперсной форме, то есть в кристаллических решетках, и не извлекается обычными способами. Внедрение этой технологии позволяет дополнительно получать от 10% до 12% мелкодисперсного золота, остающегося сегодня в хвостах. И самое главное – микробиологический способ извлечения золота экологически безопасен. Промышленное применение нашел биотехнологический метод удаления серы из угля. Предварительная обработка угля бактериями *T. ferrooxidans* приводит к окислению значительной доли серы (в виде пирита) до серной кислоты (60%-98%) за 7-10 суток. Обработку угля проводят открытым способом, но ведется поиск методов введения микроорганизмов в пластины угля.

3.Биосорбция металлов из растворов

Биологические методы находят все более широкое применение для извлечения металлов из природных, промышленных и бытовых сточных вод. Эти методы в отличие от дорогостоящих физико-химических характеризуются достаточной простотой и эффективностью. Обычно для этих целей загрязненные металлами воды собирают в отстойниках и прудах со слабым течением, в которых происходит развитие микроорганизмов и водорослей. Эти организмы накапливают растворенные металлы внутриклеточно или, выделяя специфические продукты обмена, переводят их в нерастворимую форму и вызывают осаждение. Многие микроорганизмы способны накапливать металлы в больших количествах, особенно высокой концентрирующей способностью отличаются микроводоросли. Процесс извлечения металлов из водных растворов микроводорослями осуществляется следующими путями:

- адсорбцией металлов на поверхности клеток, сопровождаемой пассивным, диффузно контролируемым переносом металлов в цитоплазму со скоростями, пропорциональными концентрации поверхности связанного металла;
- связыванием поступающих из внешней среды металлов в комплексы с металлотионеином и другими веществами непосредственно внутри клетки;
- связывание металлов метаболитами, экскретируемыми водорослями.

Основными процессами извлечения металлов из растворов с участием микроорганизмов являются: биосорбция, осаждение металлов в виде сульфидов, восстановление шестивалентного хрома. Биосорбцией можно из разбавленных растворов извлечь 100% свинца, ртути, меди, никеля, хрома, урана и 90% - золота, серебра, платины, селена.

4.Обогащение руд

К перспективным направлениям биогеотехнологии металлов относится направление, ориентированное на обогащение руд и концентратов. Весьма эффективным представляется применение для этих целей сульфатредуцирующих бактерий, на основе чего можно разработать принципиально новые процессы и существенно улучшить их. При проведении процессов флотации окисленных минералов свинца и сурьмы применение сульфатредуцирующих бактерий повышает на 6%-8% извлечение минералов в результате сульфидизации окислов; в процессах флотации церуссита ($PbCO_3$) извлечение свинца возрастает на 20-25%. Применение сульфатредуцирующих бактерий для десорбции ксантогената позволяет селективно разделить некоторые минералы ($CuFeS_2$ и MoS_2 , PbS и ZnS). Таким образом, биотехнологические методы активно дополняют, а в некоторых случаях являются единственными традиционными методами горнодобывающей промышленности. Методами кучного и подземного выщелачивания сегодня добывают медь, уран, кобальт, марганец. С помощью чанового выщелачивания добывают драгметаллы – золото, серебро. Применение биотехнологических методов позволяет увеличить сырьевые ресурсы, обеспечить комплексность извлечения металлов, при этом не требуется сложная горная техника, процессы поддаются регулированию и автоматизации, позволяют решать многие природоохранные задачи. Важным направлением биотехнологических исследований является разработка новых технологий защиты окружающей среды от загрязнения отходами различных промышленных производств и очистка уже загрязненных территорий.

5.Извлечение нефти

Биотехнологии, основанные на использовании различных групп микроорганизмов, находят все большее применение при добыче нефти и при очистке объектов окружающей среды от нефтяного загрязнения. Острота проблемы разработки новых методов повышения нефтеотдачи объясняется тем, что при современном уровне технологии нефтедобычи средняя величина нефтеотдачи составляет всего от 40% до 45% от разведанных нефтяных запасов. А на месторождениях с карбонатными коллекторами нефтеотдача составляет часто лишь от 8% до 10% от запасов нефти. Микробиологические методы повышения нефтеотдачи основаны на способности микроорганизмов продуцировать такие нефтеутесняющие вещества как газы, растворители и т.д. Кроме того, многие микроорганизмы окисляют нефтяные углеводороды с образованием углекислоты и низкомолекулярных органических кислот, которые растворяют карбонатные минералы нефтяного пласта коллектора, увеличивая его пористость, что также благоприятно влияет на повышение нефтеотдачи. Закрепленные на поверхностях раздела (жидкость – твердое тело и жидкость - жидкость) микроорганизмы применяют для увеличения добычи нефти. Интенсификация добычи нефти осуществляется микроорганизмами и продуктами их жизнедеятельности. Для этого используют стимуляцию деятельности природной микрофлоры путем введения в скважины питательных растворов (мелассы, молочной сыворотки), микроорганизмов, продуцирующих нужные метаболиты, а также введением определенных биопродуктов, выработанных вне месторождений. Ксантан, внеклеточный полисахарид бактерии *Xanthomonas campestris*, может применяться для извлечения нефти из иссякающих месторождений. Ксантан был первым микробным полисахаридом, который начали производить в промышленном масштабе (1967 г.). Остаточные порции нефти обычно адсорбируются на различных породах, содержащихся в нефтеносных пластах, и не вымываются из них водой. Раствор ксантана в воде обладает высокой вязкостью и при закачке в пласты под повышенным давлением высвобождает капли нефти из всех трещин и углублений нефтеносных пород. Бактерии - деэмульгаторы, например *Nocardia* sp, разделяют водную и нефтяную фазы,

что может быть использовано как для концентрирования нефти, так и для очистки сточных вод от нефтяных примесей, создающих угрозу для окружающей среды.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Техника безопасности и структура лаборатории. Способы и особенности технологии промышленного культивирования микроорганизмов».

2.1.1 Цель работы: Ознакомиться с техникой безопасности, а также структурой микробиологической лаборатории.

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить устройство микробиологической лаборатории
2. Изучить технику безопасности в микробиологической лаборатории.
3. Изучить основные способы промышленного культивирования микроорганизмов

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Бактериологические боксы, термостат, холодильник, бактериологическая петля, микологические крючки, колбы, чашки Петри, пипетки Пастера, автоклавы, микроскопы.

2.1.4 Описание (ход) работы:

1. Принципы организации и оборудования микробиологической лаборатории, правила работы в ней.

Микробиологическая лаборатория в зависимости от ее профиля выполняет бактериологические, вирусологические и иммунологические исследования. Микробиологическая лаборатория общего назначения должна иметь следующие комнаты: Лабораторные, Автоклавную, Средоварочную, Бактериологическую с боксами, Моечную, Виварий, Подсобные помещения (душ, склад, гардероб, туалет)

Правила работы и поведения в бактериологической лаборатории общего назначения

1. В помещение лаборатории нельзя входить без специальной одежды – халата, шапочки, сменной обуви.

2. Запрещается в помещении прием и хранение пищи. Курение.

3. Нельзя использовать лабораторную спец. одежду за пределами лаборатории.

4. Зараженный материал подлежит уничтожению, инструменты и поверхность рабочего стола, дезинфицируют после окончания работ.

5. После работы с культурой, животными, перед уходом из лаборатории необходимо вымыть руки.

6. Штаммы микроорганизмов, заразный материал должны хранится в сейфе или холодильнике закрытыми и опечатанными.

7. Необходимо проводить обеззараживания предметов, одежды, стола, комнаты, в случае если разбился сосуд с инфицированным материалом или произошел неосторожный разлив заразного материала.

8. Сотрудники лаборатории подлежат обязательной вакцинации против тех инфекционных заболеваний, с возбудителями которых возможна работа в лаборатории.

9. В лаборатории должна быть инструкция по технике безопасности, которую персонал должен знать и строго выполнять. Необходимо обязательно немедленно сообщить

руководителю лаборатории обо всех аварийных ситуациях, создающих угрозу биологической безопасности и проводить все мероприятия для предотвращения последствий.

10. Каждая бактериологическая лаборатория должна иметь лицензию на право работы с возбудителями.

Способы промышленного культивирования микроорганизмов.

Технологический процесс глубинного выращивания микроорганизмов в реакторах (ферментерах) так же как и при использовании плотных питательных сред, складывается из следующих этапов: 1. Отбор штаммов микроорганизмов и работа с ними; Приготовление посевной микробной культуры; Приготовление и стерилизация питательных сред; Подготовка биореактора к посеву; Выращивание микроорганизмов в реакторе и контроль над процессом культивирования.

Кроме того, он включает ряд вспомогательных операций: стерилизацию оборудования и коммуникаций; приготовление и стерилизацию пеногасителей, растворов и др.

Удовлетворение питательных потребностей микроорганизмов. Основополагающим принципом конструирования ПС является полноценность, т.е. состав среды должен удовлетворять питательным потребностям культивируемых микроорганизмов.

В зависимости от формы, в которой микроорганизмы используют необходимые им питательные вещества, их подразделяют на две большие группы:

1. *Автотрофы* —микроорганизмы, которые могут синтезировать вещества своей протоплазмы из простых неорганических соединений.

2. *Гетеротрофы*- микроорганизмы, для которых источником углерода и азота служат органические вещества.

В зависимости от типов используемых азотистых соединений микроорганизмы разделяют на две группы:

1. *Протеолитические*, расщепляющие высокомолекулярные белковые вещества и пептиды;

2. *Дезаминирующие*, требующие присутствия в среде готовых аминокислот, расщепление которых сопровождается выделением аммиака.

Выбор сырьевых источников для конструирования питательных сред

Качество ПС во многом определяется полноценностью состава питательных субстратов и исходного сырья, используемого для их приготовления. Для получения ПС с особо ценными свойствами применяют прежде всего традиционные источники белка животного происхождения, а именно мясо крупного рогатого скота (КРС), казеин, рыбу и продукты ее переработки.

Основой большинства известных ПС являются гидролизаты казеина, мяса КРС и рыбы (до 80%). Удельный же вес непищевого сырья в технологии конструирования ПС составляет всего 15% и в дальнейшем требует увеличения.

Используемое для получения питательной основы (ПС) непищевое сырье должно удовлетворять определенным требованиям, а именно быть: полноценным; доступным; технологичным; экономичным; стандартным.

Дифференциация питательных сред по целевому назначению

Прежде чем приступить к разработке ПС, необходимо решить вопрос о предназначении будущей среды. Следовательно, дифференциация ПС по целевому назначению также является одним из основных принципов их конструирования.

В соответствии с этим принципом среды подразделяют: • на микробиологические; • среды для культур клеток, часть из которых относят также к вирусологическим средам.

По физическому состоянию ПС классифицируются на: жидкие; жидкые концентрированные; полужидкие; твердые (плотные); сухие.

Дифференциация ПС проводится также по сложности. По этому признаку среда подразделяются на: простые, или обычные (универсальные); сложные, политропные, или специальные.

По происхождению и природе составных элементов среды подразделяются на: естественные (натуральные, комплексные); полусинтетические; синтетические.

Контрольные вопросы: 1. Устройство микробиологической лаборатории. 2. Техника безопасности в микробиологической лаборатории. 3. Основные способы промышленного культивирования микроорганизмов.

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Типовая технологическая схема микробиологического производства»

2.2.1 Цель работы: Ознакомиться со схемой микробиологического производства.

2.2.2 Задачи работы:

1. Изучить стадии микробиологического производства.
2. Изучить типы ферментационных аппаратов.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ноутбук, мультимедиа.

2.2.4 Описание (ход) работы:

Продукты биотехнологии получают по индивидуальным технологиям со своими биологическими агентами, сырьем, числом стадий производства и их технологическими режимами. Тем не менее, можно представить обобщенную типовую схему биотехнологических производств.

Схема состоит из стадий, в каждой из которых сырье претерпевает определенные технологические воздействия и последовательно превращается во все более сложные полуфабрикаты и, наконец, в конечный продукт. Общий вид такой типовой схемы представлен на рисунке.

Основная стадия биотехнологического производства. Основной стадией является собственно биотехнологическая, на которой с использованием того или иного биологического агента (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов или клеточных органелл) происходит преобразование сырья в тот или иной целевой продукт. Обычно главной задачей биотехнологической стадии является получение определенного органического вещества. Однако биотехнологическая стадия, как правило, включает в себя не только синтез новых органических соединений, но и ряд других биотехнологических процессов, перечисленных далее.

Ферmentation — процесс, осуществляемый с помощью культивирования микроорганизмов.

Биотрансформация — процесс изменения химической структуры вещества под действием ферментативной активности клеток микроорганизмов или готовых ферментов. В этом процессе обычно не происходит накопления клеток микроорганизмов, а химическая структура вещества меняется незначительно. Вещество как бы уже в основном готово, биотрансформация осуществляет его химическую модификацию: добавляет или отнимает радикалы, гидроксильные ионы, дегидрирует и т.п.

Биокатализ — химические превращения вещества, протекающие с использованием биокатализаторов-ферментов.

Биоокисление — потребление загрязняющих веществ с помощью микроорганизмов или ассоциации микроорганизмов в аэробных условиях.

Метановое брожение — переработка органических отходов с помощью ассоциации метаногенных микроорганизмов в анаэробных условиях.

Биокомпостирование — снижение содержания вредных органических веществ ассоциацией микроорганизмов в твердых отходах, которым придана специальная взрыхленная структура для обеспечения доступа воздуха и равномерного увлажнения.

Биосорбция — сорбция вредных примесей из газов или жидкостей микроорганизмами, обычно закрепленными на специальных твердых носителях.

Бактериальное выщелачивание — процесс перевода нерастворимых в воде соединений металлов в растворенное состояние под действием специальных микроорганизмов.

Биодеградация — деструкция вредных соединений под воздействием микроорганизмов — биодеструкторов.

Обычно биотехнологическая стадия имеет в качестве выходных потоков один жидкостной поток и один газовый, иногда только один — жидкостной. В случае если процесс протекает в твердой фазе (например, созревание сыра или биокомпостирование отходов) выходом является поток переработанного твердого продукта.

Подготовительные стадии - служат для приготовления и подготовки необходимых видов сырья биотехнологической стадии. На стадии подготовки могут быть использованы следующие процессы: Приготовление среды, обычно жидкой, включающей необходимые компоненты питания для биотехнологической стадии.

Сыре и состав питательных сред для биотехнологического производства

Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост, развитие биообъекта, эффективный синтез целевого продукта. Неотъемлемой частью питательной среды является вода, питательные вещества, которые образуют истинные растворы и коллоидные растворы. Отдельные компоненты могут находиться в твердом агрегатном состоянии, могут всплывать, равномерно распределяться по всему объему в виде взвеси или образовывать придонный слой.

Сыре для питательных сред в биотехнологическом производстве. Сыре, используемое для получения целевого продукта, должно быть недефицитным, недорогим, по возможности легко доступным.

Свекловичная меласса — отход производства сахара из свеклы, богата органическими и минеральными веществами, необходимыми для развития микроорганизмов. Она содержит 45-60 % сахарозы, 0,25-2,0 % инвертного сахара, 0,2-3,0 % рафинозы.

Мелассная барда — отход мелассно-спиртового производства. По своему химическому составу мелассная барда является полноценным сырьем для производства кормовых дрожжей, не требующим добавок ростовых веществ, так как содержит достаточное количество витаминов. Содержание сухих веществ в натуральной барде — 8-12 %, в упаренной барде — 53 %.

Зерно-картофельная барда — отход спиртового производства. Содержание растворимых сухих веществ обычно составляет 2,5-3,0%, в том числе 0,2-0,5% редуцирующих веществ, имеются источники азота и микроэлементы. Применяется для получения микробного белка.

Отходы пивоварения, а также отходы подработки несоложеного ячменя являются подходящим, однако небольшим источником усвояемых углеводов для получения микробного белка.

Пшеничные отруби – отход мукомольного производства, используется для приготовления питательных сред при твердофазном способе культивирования. Имеют богатый химический состав и могут использоваться в качестве единственного компонента питательной среды.

Молочная сыворотка - отход производства сыров, творога и казеина. Молочная сыворотка очень богата различными биологически активными соединениями, ее сухой остаток содержит в среднем 70-80 % лактозы, 7-15 % белковых веществ, 2-8 % жира, 8-10 % минеральных солей.

Состав питательных сред. Питательные среды могут иметь неопределенный состав, то есть включать биогенные добавки - мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т.д. Применяют также среды, приготовленные из чистых химических соединений в заранее определенных соотношениях - синтетические среды.

В состав практически любой питательной среды входят такие компоненты, как вода, соединения углерода, азота, фосфора и других минеральных веществ, витамины.

Вода. Вода должна отвечать требованиям ГОСТ.

Источники углерода. Легкодоступными считаются сахара: глюкоза, сахароза, лактоза, за ними следуют многоатомные спирты: глицерин, маннит и др. Далее следуют полисахариды: целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал, которые могут быть источниками углерода либо после превращения их в усвояемые микроорганизмами моно- и низкомолекулярные олигосахариды, либо микроорганизмы должны иметь набор ферментов, гидролизующих эти вещества. Такими микроорганизмами являются плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, бактерии рода *Bacillus* и другие.

Низкомолекулярные спирты: метанол и этанол - относятся к числу перспективных видов сырья. Многие дрожжи родов *Candida*, *Hansenula* и др. способны ассимилировать этанол. Дрожжи родов *Pichia*, *Candida* и другие, бактерии рода *Flavobacterium* используют в качестве единственного источника углерода метанол.

Источники азота. Азот может содержаться в форме неорганических солей или кислот. Большинство дрожжей хорошо усваивает амиачные соли, а также аммиак из водного раствора, потребность в нитратах испытывают только некоторые виды дрожжей. Источником азота могут служить и органические соединения: аминокислоты, мочевина и т.д., которые легко усваиваются микроорганизмами. Известно, что бактерии более требовательны к источникам азота, чем другие микроорганизмы (грибы, актиномицеты и дрожжи).

Источники фосфора. Фосфор является важнейшим компонентом клетки. Он входит в состав АТФ, АДФ, АМФ и тем самым обеспечивает нормальное течение энергетического обмена в клетке, а также синтез белков, нуклеиновых кислот и другие процессы биосинтеза.

Источники витаминов и микроэлементов. Потребность микроорганизмов в этих соединениях различна, тем не менее, практически все микроорганизмы лучше растут в присутствии витаминов. Эффективной добавкой к питательным средам оказался кукурузный экстракт благодаря наличию в нем витаминов, аминокислот и минеральных элементов в легко ассимилируемых формах. При составлении питательной среды для конкретного вида микроорганизма подбираются наиболее подходящие источники углерода, азота, фосфора и других веществ.

Стерилизация среды — для асептических биотехнологических процессов, где нежелательно попадание посторонней микрофлоры. Подготовка и стерилизация газов (обычно воздуха), необходимых для протекания биотехнологического процесса. Чаще всего подготовка воздуха заключается в очистке его от пыли и влаги, обеспечении требуемой температуры и очистке от присутствующих в воздухе микроорганизмов, включая споры.

Подготовка посевного материала. Очевидно, что для проведения микробиологического процесса или процесса культивирования изолированных клеток растений или животных необходимо подготовить и посевной материал — предварительно выращенное малое по сравнению с основной стадией количество биологического агента.

Подготовка биокатализатора. Для процессов биотрансформации или биокатализа необходимо предварительно подготовить биокатализатор - либо фермент в свободном или закрепленном на носителе виде, либо биомассу микроорганизмов, выращенную предварительно до состояния, в котором проявляется ее ферментативная активность. Предварительная обработка сырья. Если сырье поступает в производство в виде, непригодном для непосредственного использования в биотехнологическом процессе, то проводят операцию по предварительной подготовке сырья.

РАЗДЕЛЕНИЕ ЖИДКОСТИ И БИОМАССЫ

Чаще всего целевой продукт находится либо в самой биомассе, либо в жидкости. В обоих случаях необходимо сначала разделить эти две фазы. В зависимости от свойств биомассы и жидкости для этих целей могут быть использованы различные процессы. Отстаивание — разделение под действием гравитационных сил (обычно при очистке сточных вод).

Фильтрация — пропускание суспензии через фильтрующий материал, на котором задерживаются частицы твердой фазы — биомасса. Такой способ применяют в производстве антибиотиков, особенно в тех случаях, когда микроорганизм-продуцент имеет мицелиальный характер.

Сепарация, центрифугирование — разделение под действием центробежных сил. Наиболее часто используется для отделения дрожжей или бактерий в производстве кормовой биомассы.

Микрофильтрация, ультрафильтрация — пропускание суспензии через мембранные с весьма малым размером пор, обеспечивающее удержание клеток микроорганизмов на мембране и получение раствора, свободного от взвешенных клеток. Ультрафильтрация задерживает уже не только клетки, но и крупные молекулы растворенных веществ. Коагуляция — добавление в суспензию реагентов, способствующих образованию и осаждению более крупных клеточных агломератов и отделению их от жидкости путем отстаивания.

Флотация — захват биомассы микроорганизмов пузырьками пены и выделение ее из пенной фракции.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ БИОСИНТЕЗА

Эта стадия имеет определенные отличия, связанные с тем, являются продукты внеклеточными или внутриклеточными. Так, для внутриклеточных продуктов сначала необходимо разрушить клеточную оболочку одним из методов, среди которых можно назвать следующие:

Дезинтеграция клеток. Этот процесс разрушения клеточной оболочки может осуществляться физическими методами с помощью мелющих тел, путем замораживания, воздействием ультразвука, методом декомпрессии — резкого сброса давления) или химическими и биотехнологическим и методами.

Гидролиз — разрушение клеточных оболочек под действием химических реагентов и температуры.

Ферментолиз — разрушение клеточных оболочек под действием ферментов при повышенной температуре.

Автолиз — разновидность ферментолиза, когда используют собственные ферменты клетки.

После проведения предварительной операции разрушения клеток выделение целевого продукта осуществляется из раствора методами, которые являются общими для внеклеточных и внутриклеточных продуктов.

Экстракция — переход целевого продукта из водной фазы в несмешивающуюся с водой органическую жидкость (экстрагент). Наиболее известно выделение жироподобных веществ жидкими углеводородами (типа бензина), но применяются и многие другие виды экстрагентов (хлороформ, эфир, бутилацетат). Экстракция прямо из твердой фазы (в том числе и биомассы микроорганизмов) называется экстрагированием.

Осаждение — выделение целевого продукта путем добавления к жидкости реагента, взаимодействующего с растворенным продуктом и переводящего его в твердую фазу. Адсорбция — перевод растворенного в жидкости продукта в твердую фазу путем его сорбции на специальных твердых носителях (сорбентах).

Ионный обмен — то же, что адсорбция, но в этом случае в твердую фазу переходят ионы (катионы или анионы), а не целиком молекула целевого продукта или примеси. Отгонка, ректификация — эти методы используют для выделения растворенных в культуральной жидкости легкокипящих продуктов. Пример этиловый спирт. Ультрафильтрация, нанофильтрация и обратный осмос применяются для выделения высокомолекулярных соединений (белков, полилепитидов, полинуклеотидов). Обратный осмос и нанофильтрация позволяют отделять даже небольшие по размеру молекулы.

ОЧИСТКА ПРОДУКТА

На стадии выделения продукта главная задача — отделить основную часть продукта. Поэтому необходимо получать биопродукты высокой кондиции, добавляют еще стадию очистки продукта. Задача этой стадии убрать примеси, сделать продукт максимально чистым.

Это - экстракция и экстрагирование, адсорбция, ионный обмен, ультрафильтрация и обратный осмос, ректификация и ферментолиз. Кроме этих процессов используют и следующие.

Хроматография — процесс, напоминающий адсорбцию. На твердом сорбенте собираются растворенные вещества, но не одно, а несколько, часто близких по структуре. Например, смеси белков, нуклеотидов, сахаров, антибиотиков. При адсорбции они и десорбируются вместе. А вот при хроматографии они выходят из сорбента как бы по очереди, что и позволяет их разделять и, значит, очищать друг от друга. Диализ — процесс, в котором через полупроницаемую перегородку могут проходить низкомолекулярные вещества, а высокомолекулярные остаются. Путем диализа осуществляют очистку вакцин и ферментов от солей и низкомолекулярных растворимых примесей.

Кристаллизация. Этот процесс базируется на различной растворимости веществ при разных температурах. Медленное охлаждение позволяет формировать кристаллы из растворов целевых продуктов, причем чистота их обычно очень высока. Вся «грязь» остается в маточном растворе. Таким образом, например, получают кристаллы пенициллина.

Можно даже получить еще чистый продукт, если кристаллы растворить в воде или растворителе, а потом снова кристаллизовать (т. е. провести процесс перекристаллизации).

КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ПРОДУКТА

После очистки продукта он часто находится все-таки в растворе с небольшими концентрациями примесей. Дальнейшая задача — обеспечить его концентрирование. Необходимо рассмотреть, как обычно меняется концентрация целевого продукта от биотехнологической стадии до готовой формы продукта. На выходе из биотехнологической стадии суспензия обычно содержит целевого продукта примерно 0,1—1%, после стадии отделения биомассы — 0,1—2%, после стадии выделения — 1—10%, после очистки — 50—80%. и, наконец, после концентрирования — 90—100%. На стадии концентрирования применяют такие процессы, как выпаривание, сушка, осаждение, кристаллизация с фильтрацией получившихся кристаллов, ультрафильтрация и гиперфильтрация или нанофильтрация, обеспечивающие «отжим» растворителя из раствора.

ПОЛУЧЕНИЕ ГОТОВОЙ ФОРМЫ ПРОДУКТА

На завершающей стадии производства продукт приобретает товарную форму за счет проведения процессов гранулирования (формирование гранул из порошка или прямо из

раствора), дражирования, таблетирования (формирование драже, таблеток), розлива или фасовки, ампулирования (затаривания в ампулы).

Вопросами технического обеспечения биотехнологических процессов занимается биоинженерия. Для различных процессов существует огромное разнообразие аппаратуры: собственно для процесса ферментации, а также для выделения и получения готового продукта.

Наиболее сложна и специфична аппаратура для ферментационной стадии. Технически наиболее сложным процессом ферментации является аэробный глубинный стерильный и непрерывный (или с подпиткой субстратом). Аппараты для поверхностной и анаэробной ферментации менее сложны и энергоемки. В современной литературе описаны сотни биореакторов, отличающихся по конструкции, принципу работы и размерам (от нескольких литров до нескольких тысяч кубометров). Многочисленность методов культивирования, чрезвычайное многообразие используемых биологических агентов привели к огромному разнообразию конструктивных решений, которые зависят от ряда факторов: типа продуцента и среды, технологии и масштабов производства, а также целевого продукта и пр. Техническое оснащение биотехнологии базируется на общих положениях технической биохимии и пищевой технологии, однако имеет свою специфику. Принципиальное отличие биотехнологических процессов от чисто химических заключается в следующем:

- чувствительность биологических агентов к физико-механическим воздействиям;
- наличие межфазового переноса веществ (по типу «жидкость – клетки», «газ – жидкость – клетки»);
- требования условий асептики;
- низкие скорости протекания многих процессов в целом;
- нестабильность целевых продуктов;
- пенообразование;
- сложность механизмов регуляции роста и биосинтеза.

Типы ферментационных аппаратов.

Аппараты для анаэробных процессов достаточно просты и применяются в процессах конверсии растительного сырья, в том числе растительных отходов, а также различных промышленных отходов. При метановом брожении для получения биогаза, а также в ряде других процессов (получение ацетона, шампанских вин) используют ферментационные аппараты (метантенки). Эти аппараты имеют различную конструкцию (от простой выгребной ямы до сложных металлических конструкций или железобетонных сооружений) и объемы (от нескольких до сотен кубометров). Метановые установки оборудованы системой подачи сырья, системой теплообмена труб для стабилизации температуры, несложным перемешивающим устройством для гомогенного распределения сырья и биомассы продуцента, газовым колпаком и устройством переменного объема (газгольдер) для сбора образуемого биогаза.

Конструкция аппаратов для аэробной ферментации определяется типом ферментации и сырья. Аппараты для аэробной поверхностной ферментации, широко применяемые для производства органических кислот и ферментов, достаточно просты по конструкции и, соответственно, подразделяются на жидкофазные и твердофазные. Поверхностная жидкофазная ферментация протекает в так называемых бродильных вентилируемых камерах, в которых на стеллажах размещены плоские металлические кюветы. В кюветы наливают жидкую питательную среду, высота слоя составляет 80–150 мм, затем с потоком подаваемого воздуха в среду инокулируют спорами продуцента. В камере стабилизируется влажность, температура и скорость подачи воздуха. После завершения процесса культуральная жидкость сливаются из кювет через вмонтированные в днища штуцера и поступает на обработку. При твердофазной ферментации процесс также протекает в вентилируемых камерах, но вместо кювет на стеллажах размещают лотки, в которые

насыпают сыпучую твердую среду слоем 10–15 мм. Для лучшей аэрации среды подаваемый в камеру воздух проходит через перфорированное днище лотков.

Аппараты для аэробной глубинной ферментации наиболее сложны как конструкционно, так и с точки зрения их эксплуатации. Главная задача, возникающая при их конструировании, – обеспечение высокой интенсивности массо- и энергообмена клеток со средой. Массообмен определяется транспортом (переносом) кислорода и других биогенных элементов из среды в микробную клетку и отводом из нее продуктов обмена.

К настоящему времени разработано и применяется огромное количество разнообразнейших перемешивающих и аэрирующих устройств, и классифицировать их практически невозможно. Наиболее удачная попытка классификации ферментационных аппаратов для аэробной глубинной ферментации по подводу энергии. Согласно этой классификации, аппараты такого типа делятся на три группы по подводу энергии: 1) – к газовой фазе, 2) – к жидкой фазе, 3) – комбинированный подвод.

Ферментеры с подводом энергии к газовой фазе (группа ФГ). Их общий признак – подвод энергии в аппарат через газовую фазу, которая является ее носителем. Ферментеры характеризуются достаточно простой конструкцией (отсутствуют трущиеся, движущиеся узлы), высокой эксплуатационной надежностью, но имеют не очень высокие массообменные характеристики (коэффициент массопередачи кислорода менее 4 кг/м³). Данные аппараты представляют собой вертикальную емкость, снабженную газораспределительным устройством одного из известных типов.

Ферментеры с вводом энергии жидкой фазой (группа ФЖ) наиболее сложны по конструкции и энергоемки, но обеспечивают наиболее высокие по сравнению с группой ферментеров ФГ значения коэффициента массопередачи кислорода, свыше 6 кг/м³ ч. В данных аппаратах ввод энергии осуществляется жидкой фазой, обычно самовсасывающими мешалками или насосами; в последнем варианте жидкость вводится в аппарат через специальное устройство (сопло, эжектор, диспергатор).

Третья группа аппаратов – с подводом энергии газовой и жидкой фазами (группа ФЖГ). Основными их конструкционными элементами являются перемешивающие устройства всех известных типов, а также наличие в совокупности насосов и перемешивающих устройств. Это могут быть аппараты с группой самовсасывающих мешалок и насосом для перекачивания культуральной жидкости и другие сочетания перемешивающих и аэрирующих устройств. Коэффициент массопереноса кислорода в таких ферментерах может в принципе иметь любые из известных значений.

Перечисленные типы аппаратов возникли в основном в течение «эры» антибиотиков и белка одноклеточных и применяются, главным образом, в технической микробиологии. Прогресс в области получения клеточных и рекомбинантных культур выдвигает специальные требования к биореакторам. При этом на первый план выдвигаются такие показатели, как стабильность биологических агентов, повышенные требования к асептике, лимитация срезовых условий при перемешивании и др. Однако, многие из таких конструкций пока еще носят экспериментальный характер.

Контрольные вопросы: 1. Подготовительная стадия микробиологического производства. 2. Биотехнологическая стадия. 3. Типы ферментационных аппаратов.

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: «Изучение микрофлоры кисломолочных продуктов»

2.3.1 Цель работы: Овладеть микроскопическими методами исследования продуктов молочнокислого брожения.

2.3.2 Задачи работы:

1. Приготовить препараты из перечисленных продуктов, окрасить метиленовой синью, провести микроскопию под иммерсией.
2. Изучить микрофлору различных кисломолочных продуктов.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Кефир, йогурт, ацидофилин, предметное стекло, капельницы с метиленовым синим и со смесью спирта с эфиром, микроскоп, фильтровальная бумага, бактериологическая петля.

2.3.4 Описание (ход) работы:

Для микроскопического исследования молочнокислых бактерий готовят препарат из скисшего молока. Бактериологическую петлю вносят в сгусток и, повернув ее вокруг оси, извлекают, прикоснувшись ею и к пленке. Сгусток размазывают на предметном стекле очень тонким слоем без воды. Сушат на воздухе. Фиксируют смесью спирта с эфиром (1:1), несколько раз нанося на мазок смесь и сливая ее. При такой фиксации погибают и прикрепляются к стеклу бактерии, и параллельно эфиром удаляется жир. Последнее необходимо, т.к. капли жира на препарате мешают окраске и микроскопированию.

Фиксированный препарат окрашивают, заливая метиленовым синим на 2-3 минуты, промывают водой, высушивают и микроскопируют при большом увеличении.

Общим признаком всех кисломолочных продуктов является молочнокислое брожение, вызванное молочнокислыми бактериями. Микроорганизмы выделяют фермент лактазу, расщепляющую дисахарид лактозу на 2 молекулы моносахаридов: глюкозу и галактозу.



Лактоза глюкоза галактоза молочная кислота Общим признаком всех кисломолочных продуктов является молочнокислое брожение, вызванное молочнокислыми бактериями.

Таким образом, из одной молекулы сахара лактозы образуются четыре молекулы молочной кислоты. В молоке повышается кислотность, содержащийся в нем казеин свертывается и образует сгусток.

В некоторых кисломолочных продуктах наряду с молочнокислым брожением протекает и спиртовое брожение. Поэтому различают:

1. Продукты молочнокислого брожения: сметана, простокваша, ацидофильное молоко.
2. Продукты смешанного (молочнокислого и спиртового) брожения: кумыс, кефир, катык и др.

Под микроскопом на препаратах видно преобладание мелких округлых клеток - *Streptococcus lactis*, соединенных в короткие цепочки. Этот микроорганизм - возбудитель естественного скисания молока в наших широтах. Оптимальная температура для его развития - 30°C. В результате жизнедеятельности молочнокислого стрептококка накапливается до 1% молочной кислоты.

Нередко на препарате видны тонкие палочки рода *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (болгарская палочка) разных размеров. Чаще всего встречаются так называемая - возбудитель естественного скисания молока в южных широтах. Оптимальная температура для нее - 40°C. Этот микроорганизм кислотоустойчив, накапливает до 3,5% молочной кислоты.

Если на поверхности скисшего молока появилась пленка, то в мазке обнаруживается также и молочная плесень. Четырехугольные или овальные клетки ее отличаются от клеток молочнокислых бактерий большими размерами.

Задание

Зарисовать и описать обнаруженные в мазке формы микроорганизмов. Постарайтесь определить род, к которому они относятся. Обнаружили ли вы наличие плесени? Дрожжей?

Контрольные вопросы: 1. Методика приготовления микропрепаратов из кисломолочных продуктов. 2. Химизм молочнокислого брожения. 3. Микроорганизмы – возбудители молочнокислого брожения.

2.4 Лабораторная работа № 4 (2 часа).

Тема: «Микроорганизмы, участвующие в порче кисломолочных продуктов»

2.4.1 Цель работы:

1. Ознакомиться с таксономическими группами микроорганизмов, вызывающих порчу молока и молочных продуктов

2.4.2 Задачи работы:

1. Изучить микроорганизмы сырого молока
2. изучить микроорганизмы, вызывающие порчу молочных продуктов

2.4.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ноутбук, мультимедиа.

2.4.4 Описание (ход) работы:

Так как молоко — источник питательных веществ для многих групп и видов микроорганизмов порчи, в качестве примера будут рассмотрены характерные для молока и молочных продуктов источники контаминации, а также ее последствия для качества продуктов из сырого и обработанного молока.

Разнообразие микроорганизмов порчи сырого молока. Мерой риска порчи молока, индикатором здоровья молочного стада, санитарно-гигиенических условий при дойке и хранении молока является численность бактерий в сыром продукте. Микробиологическая безопасность молока непосредственно влияет на выход и качество молочных продуктов. Количество микроорганизмов в сыром молоке может изменяться в очень широких пределах: от > 10 КОЕ/см³ в молоке, полученном асептическим способом от здоровых коров, до $> 1 \cdot 10^6$ КОЕ/см³. Источниками контаминации молока микроорганизмами являются вымя, сосковый канал и оборудование. Стандарты разных стран по сырому молоку отличаются друг от друга. Они обычно устанавливают численность микроорганизмов, максимально допустимую для обеспечения безопасности и качества молочных продуктов.

Количество начальной микрофлоры в сыром молоке зависит от технологии получения, сбора молока и обращения с ним.

Микрофлора сырого молока представлена чаще всего молочнокислыми бактериями *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.* и дрожжами. К порче готового продукта приводят микроорганизмы сырого молока. На скорость порчи существенно влияют температура и продолжительность хранения сырого молока. Все присутствующие в сыром молоке микроорганизмы делят по оптимальным для их размножения интервалам температур на мезофильные, психротрофные и термотolerантные.

При увеличении числа молочнокислых микроорганизмов и сбраживании ими лактозы молоко приобретает кислый вкус и происходит створаживание казеинатов при нагревании. Использование эффективных систем охлаждения сырого молока предотвращает его порчу из-за воздействия молочнокислых бактерий. Хранение сырого молока при температуре 4°C в течение 24 ч приводит к изменению популяции бактерий от мезофильных (типа молочнокислых

бактерий) к психротрофным (например, *Pseudomonas spp.*). Когда сырое молоко быстро охлаждают и хранят при соответствующих температурных режимах (охлаждение до 7°C и ниже в течение 2 ч после получения), основной задачей поддержания его качества становится контроль наличия психротрофных организмов.

Психротрофы молока. *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aeromonas* и *Alcaligenes* относятся к грамотрицательным бактериям сырого молока. К грамположительным психротрофным бактериям относятся *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* и спорообразующие *Bacillus* и *Clostridium*. В сыром молоке преобладают *Pseudomonas spp.* Часто встречаются в сыром молоке виды *Pseudomonas*: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fragi* и *Pseudomonas aeruginosa*. Некоторые из названных видов продуцируют термоустойчивые липолитические и протеолитические ферменты, выдерживающие пастеризацию, что объясняет причины ухудшения качества молока в течение срока годности готового продукта даже при уничтожении исходных бактерий при пастеризации. Причинами загрязнения сырого молока психротрофами являются плохие санитарно-гигиенические условия на фермах и ненадлежащим образом вымытое технологическое оборудование.

Термотолерантные микроорганизмы молока. Термотолерантные виды микроорганизмов выделяют как из сырого, так и из обработанного молока. Термотолерантные спорообразующие микроорганизмы, выдерживающие пастеризацию и способные к размножению в термообработанных продуктах в условиях холодильного хранения, ухудшают качество продукта и сокращают срок его годности. Эти микроорганизмы могут выживать при пастеризации или других способах высокотемпературной обработки молока. Они проникают в сырое молоко из окружающей среды (например, из подстилки для скота) или с производственного оборудования. К термоустойчивым микроорганизмам сырого молока относятся *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium* и *Clostridium*. Порчу молока чаще всего вызывают *Bacillus spp.* и *Paenibacillus spp.* — они способны к размножению в условиях холодильного хранения и снижению качества готового продукта.

Нередко в молоко попадают микроорганизмы от коров, больных маститом, которые увеличивают общую численность бактерий молока. К ним относятся *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* и *Staphylococcus aureus*. Наличие в молоке сборных танков таких микроорганизмов, как *Streptococcus uberis*, связано не только с маститной инфекцией, но и плохо вымытым оборудованием. Микроорганизмы, вызывающие инфицирование вымени, могут присутствовать в сыром молоке в больших количествах. От больных маститом коров в молоко попадают также соматические клетки, способные ухудшать качество молока. Показатель числа соматических клеток используют в качестве индикатора качества молока. Высокое значение числа соматических клеток свидетельствует о наличии в стаде маститной инфекции. Из пороков вкуса и запаха в этих продуктах отмечаются прогоркость и горечь.

Контроль степени контаминации сырого молока при его сборе, транспортировке и хранении является определяющим фактором обеспечения безопасности готового молочного продукта и его качества.

Микробиота порчи молочных продуктов.

Гнилостные бактерии. По морфологическим и физиологическим признакам гнилостные бактерии принято делить на четыре группы:

- 1) спорообразующие и неспорообразующие аэробы;
- 2) спорообразующие анаэробы;
- 3) неспорообразующие анаэробы;
- 4) факультативные анаэробы.

Споры бактерий рода *Bacillus* обладают высокой термоустойчивостью и выдерживают пастеризацию, а в некоторых случаях стерилизацию молока. Вследствие высокой активности протеолитических и липолитических ферментов эти бактерии вызывают гидролиз белков и

жиров с появлением в продукте горького и прогорклого вкуса. Развитие *B. cereus* и *B. mycoides* приводит к «сладкому» свертыванию (при низкой кислотности) сливок, сгущенного стерилизованного молока.

Аэробные спорообразующие бактерии. К типичным гнилостным аэробным палочкам, образующим эндоспоры, относятся *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus mycoides*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, обладающие высокой протеолитической активностью (разжижают желатин, свертывают и пептонизируют молоко, выделяют аммиак). *Bacillus subtilis* (сенная палочка) — прямые палочки с закругленными концами, иногда они располагаются короткими цепочками, окраска по Граму положительная, в молодых культурах подвижны (перитрихи). Размеры клеток — (0,6—0,7) x (3—5) мкм. Сенная палочка образует эндоспоры, располагающиеся центрально, диаметр спор не превышает диаметр клетки. Колонии на мясопептонном агаре (МПА) имеют серебристый цвет, они сухие и бугристые. При росте в мясопептонном бульоне (МПБ) на поверхности образуется сухая морщинистая пленка, бульон сначала мутнеет, а затем становится прозрачным. Оптимальная температура роста составляет 37°C, температурный диапазон — от 5 до 55°C. *Bacillus megatherium* — крупная палочка размером (1,5—2,0) x (3,5—7,0) мкм; она грамположительна, подвижна, располагается чаще всего цепочками, образует споры, располагающиеся в центре клетки, капсул не формирует.

Аэробные неспорообразующие бактерии. К этой группе относятся бактерии родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*. Бактерии рода *Pseudomonas* — прямые или слегка изогнутые палочки размером (0,5—1,0) x (1,5—5,0) мкм, грамотрицательные, подвижные за счет одного или нескольких полярных жгутиков, спор и капсул не образуют, аэрофобы, оксидазо- и каталазоположительные. Оптимальная температура их роста составляет 18—22°C, температурный диапазон роста — 4—44°C. Колонии на плотной среде блестящие, с ровными краями, часто окрашенные благодаря наличию пигментов: желто-зеленого у *P. fluorescens*, синевато-зеленого — у *Pseudomonas aeruginosa*, желто-оранжевого — у *P. alkaligenes*. Имеются и нефлюoresцирующие виды, например *P. fragi*. Типовой вид — *Pseudomonas aeruginosa*.

Псевдомонады являются доминирующими представителями психротрофных бактерий сырого молока. Чаще всего встречаются *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, *P. aeruginosa*. Многие виды псевдомонад продуцируют термоустойчивые липазы и протеазы, которые выдерживают пастеризацию молока и, несмотря на гибель вегетативных клеток, вызывают порчу молочных продуктов в процессе их хранения.

Факультативно-анаэробные неспорообразующие бактерии. К этой группе бактерий относятся некоторые представители семейства Enterobacteriaceae (роды *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*) и рода *Aeromonas*.

Escherichia coli (кишечная палочка) — мелкие палочки размером (1,0—1,5) x (2—3) мкм, одиночные или парные, грамотрицательные, подвижные (перитрихи), спор и капсул не образуют, каталазоположительные, оксидазоотрицательные. Оптимальная температура роста составляет 37—39°C. На МПА палочка образует бесцветные, блестящие, слегка слизистые колонии с гладкой поверхностью и ровными краями. Кишечная палочка обладает слабой протеолитической активностью. Она не гидролизует молекулы казеина и свою ферментативную активность проявляет лишь на стадии расщепления пептонов.

Proteus vulgaris (палочка протея) — прямые палочки размером (0,4—0,8) x (1,2—3,0) мкм, грамотрицательные, подвижные (перитрихи). Клетки имеют многочисленные фимбрии. Спор, капсул и пигментов не образуют. Представители рода *Proteus* легко идентифицируются благодаря своей способности к роению. Через несколько часов после посева в конденсационную воду свежеприготовленного мясопептонного агара наблюдается роение микробы, его ползучий рост. Поверхность МПА покрывается тонкой вуалеобразной полупрозрачной пленкой. Оптимальная температура роста микробы составляет 37°C,

благоприятное значение рН — нейтральное. Палочка протея при расщеплении белков образует сероводород, индол.

Serratia marcescens — прямые палочки размером (0,5—0,8) х (0,9—2,0) мкм, подвижные, грамотрицательные, при определенных условиях способные образовывать капсулу. Выделяет пигмент ярко-красного цвета — продигиозин, за счет чего на МПА вырастают мелкие круглые блестящие колонии ярко-красного цвета, похожие на капли крови, отсюда названные «чудесной палочкой». Оптимальные: температура роста — 22—25°C, рН — 6,5. Расщепляет белки с образованием сероводорода, аммиака, индола.

Род *Aeromonas* — мелкие палочки с закругленными концами размером (0,3—1,0) х (1,0—3,5) мкм. Располагаются одинично, парами или короткими цепочками. По Граму окрашиваются отрицательно, подвижные за счет одного полярного жгутика. Оптимальный диапазон температуры роста составляет 22—28°C. Оксидазо- и каталазоположительные. Типовой вид — *Aeromonas hydrophila*.

Анаэробные спорообразующие палочки. *Clostridium putrifificus* — длинные палочки размером (0,4—0,7) х (7—9) мкм, располагаются одинично или цепочками, грамположительные, подвижные (перитрихи). Образуют эндоспоры, которые смешены от центра, их диаметр превышает диаметр клетки. Каталазоотрицательные. Штаммы этого вида обладают сильно выраженной протеолитической активностью: разжижают желатин и кровяную сыворотку, свертывают и пептонизируют молоко. При расщеплении белка палочки образуют сероводород, аммиак, индол. На кровяном агаре вокруг колоний наблюдаются зоны гемолиза. Этот вид является одним из наиболее распространенных возбудителей анаэробного разложения белков.

Clostridium sporogenes — палочки размером (0,6—0,9) х (3—7) мкм с закругленными концами, грамположительные, подвижные; быстро образуют эндоспоры, обладающие высокой термоустойчивостью (сохраняют жизнеспособность после выдержки в автоклаве при 120°C в течение 20 мин). Оптимальная температура роста составляет 37°C, но могут расти и при 50°C. Наиболее распространенный вид порчи — образование большего количества газа при расщеплении белков, что может привести к раздуванию упаковки, бомбажу консервов.

Clostridium perfringens — крупная грамположительная палочка размером (5—8) х (1—2) мкм, неподвижная, образующая эндоспоры. Расположение спор субтерминальное или центральное. В организме человека или животного данная палочка способна образовывать капсулу. *C. perfringens* — анаэроб, быстро растет на питательных средах, особенно с добавлением глюкозы. В глубине МПА колонии имеют вид дисков или плотных комочековаты. На поверхности кровяного агара образует влажные серовато-зеленые колонии с четкой зоной гемолиза. На среде Вильсона—Блера, содержащей хлорид железа, колонии дискообразные, интенсивно черного цвета с потемнением среды вокруг колонии. Рост микроорганизма в молоке сопровождается образованием губчатого сгустка, «подбрасываемого» к ватной пробке пробирки за счет газообразования. Оптимальная температура роста — 37—39°C. Вегетативные формы *C. perfringens* погибают при температуре 80°C через 30 мин, споры выдерживают кипячение в течение 1—2 ч.

Энтерококки. Это молочнокислые стрептококки кишечного происхождения, лишь недавно перенесенные из рода *Streptococcus* в новый род — *Enterococcus*, включающий 16 видов. Типовой вид — *Enterococcus faecalis*. В настоящее время энтерококки наряду с бактериями группы кишечной палочки считаются санитарно-показательными микроорганизмами.

Enterococcus faecalis — клетки сферической или овальной формы размером (0,6—2,0) х (0,6—2,5) мкм, располагающиеся парами или короткими цепочками. Грамположительны, эндоспор и капсул не образуют и, как правило, неподвижны. Факультативные анаэробы ферментируют углеводы с образованием Д+)-молочной кислоты. Оптимальная температура роста составляет 37—39°C, температурный диапазон роста — 10—45°C. На МПА энтерококки образуют мелкие, круглые, выпуклые блестящие колонии с ровными краями серовато-

голубоватого оттенка. Энтерококки довольно устойчивы к неблагоприятным факторам внешней среды. Они выдерживают кратковременное нагревание при температуре 75—80°C, поэтому занимают большой объем в остаточной микрофлоре пастеризованного молока. Энтерококки обладают протеолитическими ферментами и вызывают появление горького вкуса в молочных продуктах и сырах. За счет выделяемого ими сычужного фермента происходит преждевременное свертывание молока.

Маслянокислые бактерии. Маслянокислые бактерии (*Clostridium butyricum* и *Clostridium tyrobutyricum*) относятся к группе сахаролитических клостридий, которые сбраживают сахара с образованием преимущественно масляной и уксусной кислот и газов (CO₂ и H₂O). Благодаря своей газообразующей способности маслянокислые бактерии вызывают такие виды порчи молочных продуктов, как «позднее вслучивание» сыров, бомбаж консервов. Присутствие масляной кислоты придает продукту прогорклый вкус.

Clostridium butyricum — палочки размером (0,3—2,0) x (1,5—2,0) мкм с закругленными концами, часто располагающиеся парами или короткими цепочками; капсул не образуют. Клетки со спорами могут иметь форму булавы или теннисной ракетки. В молодых культурах грамположительные и подвижные (перитрихи). В старых культурах подвижность утрачивается и окраска по Граму варьируется. Споры овальные или сферические, их диаметр больше диаметра клетки. Облигатные анаэробы, оксидазо- и каталазоотрицательные. Оптимальная температура роста составляет 30—37°C, температурный диапазон — 10—65°C. Оптимальное значение pH — 7,0—7,4.

Термоустойчивые лактобациллы. В молочных продуктах часто размножаются термоустойчивые молочнокислые палочки, способные выдерживать кратковременную пастеризацию при температуре 85—90°C. Размножаясь в молоке и молочных продуктах, эти бактерии накапливают значительное количество молочной кислоты и вызывают порок «излишне кислый вкус», при котором титруемая кислотность может возрасти до 200—220°Т. Иногда развитие термоустойчивых молочнокислых палочек приводит к появлению в продукте тягучести и «нечистого» вкуса.

Одним из представителей этой группы является *Lactobacillus delbrueckii*. Данный вид включает три подвида: *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*. Палочки с закругленными концами размером (0,5—0,6) x (2—9) мкм, грамположительные, неподвижные; эндоспор и капсул не образуют. В клетках часто наблюдается зернистость. Факультативные анаэробы, ферментируют углеводы с образованием D(—)-молочной кислоты. Оптимальная температура роста — 45—55°C, температурный диапазон — 20—65°C. Каталазо- и цитохромотрицательные.

Мицелиальные грибы. Они способны размножаться на молочных продуктах как при низких температурах, так и при пониженных значениях активности воды aw — от 0,94 до 0,60 (например, *Xeromyces bisporus*). Присутствие плесени на пищевом продукте делает его непривлекательным для потребителя. Наличие у мицелиальных грибов активных протеолитических и липолитических ферментов приводит к возникновению таких видов порчи, как неприятный запах, прогорклые вкус и запах, изменение структуры продукта. Среди мицелиальных грибов встречаются виды, образующие микотоксины, что представляет опасность для здоровья человека. Чаще всего на молочных продуктах размножается молочная плесень — *Geotrichum candidum* (синоним *Endomyces lactis*), образующая белый бархатистый мицелий, гифы которого распадаются на отдельные клетки — оидии, называемые также артроспорами. *Geotrichum candidum* относится к высшим несовершенным гриbam — дейтеромицетам.

B. cereus и *B. mycoides* обусловливают «сладкое» свертывание (при низкой кислотности) и появление такого дефекта, как комочки сливок. Штаммы *Pseudomonas* spp. производят термостабильные внеклеточные липазы и протеазы, которые расщепляют компоненты молока и вызывают его порчу даже после уничтожения в ходе термообработки самих микроорганизмов. Липазы *Pseudomonas* spp. вызывают появление у молока привкуса прогорклости или горечи.

Расщепление протеазами казеина, помимо появления горького вкуса, вызывает свертывание и желирование молока.

Сыры. Присутствие и размножение в молоке дрожжей и плесеней обусловливают появление у него специфического привкуса. В твердых сырах могут размножаться колиформы, *Clostridium* spp. и плесени. Примером порчи сыра под действием бактерий служит дефект вспучивания при позднем газообразовании, вызванный действием *Clostridium tyrobutyricum*. Бактерии *C. tyrobutyricum* попадают в сыр в основном из сырого молока, контаминированного ими вследствие контакта с навозом или ферментированным силосом. В 1 г такого силоса может содержаться более 1 млн спор *Clostridium*. Порчу мягких сыров могут вызывать психротрофные грамотрицательные палочки (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter* и *Flavobacterium*), ответственные за неприятный запах и вкус продукта вследствие продуцирования ими липополитических и протеолитических ферментов.

Вероятным источником контаминации сырого молока спорами являются экскременты животных. Количество бактерий в навозе дойных коров и кормление их силосом плохого качества находятся в прямой зависимости. Качество кормов и санитарно-гигиенические условия при дойке сильнее всего влияют на степень контаминации сырого молока, в связи с чем их можно считать потенциальными контрольными точками улучшения качества сырого молока и исключения спор клостридий.

- Контрольные вопросы:**
1. Характеристика микроорганизмов сырого молока.
 2. Микроорганизмы, вызывающие порчу молочных продуктов.

2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за первый модуль»

2.5.1 Цель работы: Проверить знания студентов по пройденному материалу

2.5.2 Задачи работы: Оценить знания студентов по пройденному материалу

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, мультимедиа

Контрольные вопросы.

1. Устройство микробиологической лаборатории.
2. Техника безопасности в микробиологической лаборатории.
3. Основные способы промышленного культивирования микроорганизмов
4. Методика приготовления микропрепаратов из кисломолочных продуктов.
5. Химизм молочнокислого брожения.
6. Микроорганизмы – возбудители молочнокислого брожения.
7. Характеристика микроорганизмов сырого молока.
8. Микроорганизмы, вызывающие порчу молочных продуктов.

2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).

Тема: «Дрожжи. Спиртовое брожение»

2.6.1 Цель работы: знакомство с компонентами биотехнологического процесса (продуцентами, морфологией дрожжей, режимом и химизмом спиртового брожения).

2.6.2 Задачи работы:

1. Ознакомиться с видами дрожжей и строением дрожжевой клетки.
2. Рассмотреть химизм спиртового брожения.
3. Изучить продукты спиртового брожения.

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ноутбук, мультимедиа.

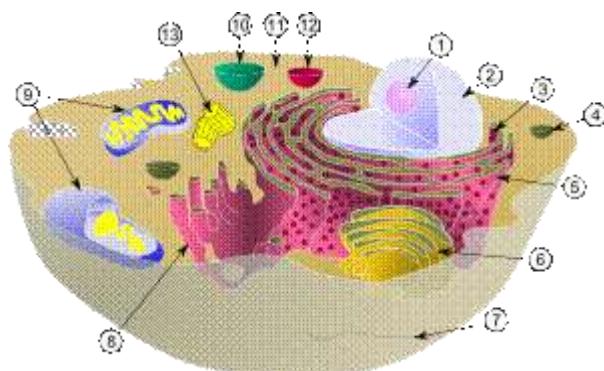
2.6.4 Описание (ход) работы:

Явление спиртового брожения давно известно человечеству, однако природа его была раскрыта французским ученым Луи Пастером только в 1858 г., который доказал, что спиртовое брожение сахаристых веществ зависит от жизнедеятельности дрожжевых клеток. Он назвал это явление «жизнь без кислорода» потому, что оно осуществляется в анаэробных условиях. В 1897 г. немецкий ученый Бухнер выделил из дрожжевых клеток ферменты, которые назвал «зимаза», проделал ряд опытов и доказал, что они могут работать вне клеток дрожжей. Микроорганизмы, участвующие в процессе спиртового брожения, представлены на схеме.

Помимо дрожжей, возбудителями спиртового брожения могут служить и мукоровые плесени (*Mucor iavanicum* и др.), гидролизующие крахмал. Существуют и бактерии, вызывающие спиртовое брожение; к ним относятся *Thermobacterium mobile* (сбраживает до 90 % глюкозы) и кислоустойчивый микроб.

Клетки *S. cerevisiae* имеют округлую, яйцевидную или эллипсоидную форму; размер их колеблется от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4,5 до 21 мкм в длину. Размер и форма клеток одного и того же штамма определяется генетически и может варьироваться в определенных пределах в зависимости от условий культивирования и последующих операций получения коммерческих дрожжей (обезвоживание).

Клетки состоят из микроскопических (видимых в обычном микроскопе при увеличении 600-900 раз) и субмикроскопических, видимых только в электронном микроскопе (увеличение 15-20 тыс.раз), структуры. Эти структуры можно подразделить на постоянно присутствующие и периодически обнаруживаемые в клетке. К первым относятся различные **органеллы** - клеточные структуры, выполняющие определенные функции. Это ядро с ядрашком, митохондрии, рибосомы, клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, эндоплазматический ретикулум (сеть), аппарат Гольджи, лизосомы, хитосомы, гликосомы и целый ряд других мембранных структур (рис.3.2). Все клеточные органеллы окружены мембранами. В состав мембран входит большое количество фосфолипидов, причем их содержание, как в количественном, так и в качественном составе, определяется природой органеллы.



- (1) Ядрышко
- (2) Ядро
- (3) Рибосома (маленькие точки)
- (4) Везикула
- (5) Шероховатый эндоплазматический ретикулум (ER)
- (6) Аппарат Гольджи
- (7) Цитоскелет
- (8) Гладкий эндоплазматический ретикулум
- (9) Митохондрия
- (10) Вакуоль
- (11) Цитоплазма
- (12) Лизосома
- (13) Центриоль и Центросома

Рисунок 1 – Органеллы дрожжевой клетки

Мембранные органеллы имеют трехслойную структуру. Они состоят из липидов, белков и небольшого количества углеводов. Липиды представлены в основном моно-, ди- и триглицеридами, глициерофосфатидами и стеролами — эргостеролом и зимостеролом. Каждая молекула фосфолипида состоит из гидрофобной («головки»), т. е. отталкивающей воду, и гидрофильной (хвоста), притягивающей воду, частей. Гидрофильные части молекул находятся на внешней стороне мембраны, а гидрофобные — на внутренней. Молекулы белка, размещаются на поверхности мембраны или проникают в нее внутрь ее (рис. 2).

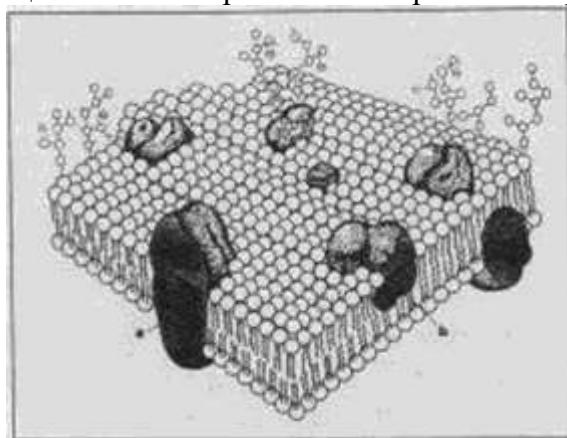
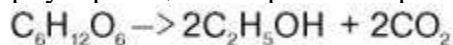


Рисунок 2 – Модель клеточной мембраны (фосфолипиды и транспортные протеины)

Непостоянные структуры — **включения** — в отличие от органелл, то возникают, то исчезают в процессе жизнедеятельности клеток. Будучи продуктами метаболизма клетки, включения отражают различные стороны и этапы ее физиологической активности. Этими непостоянными структурами являются внутриклеточные запасные соединения: жиры, гликоген и полифосфаты.

Включения могут быть представлены в виде более или менее плотных частиц — гранул, кристаллов или капель. Они обычно представляют собой скопления, видимые под микроскопом либо без специальной обработки, либо после обработки различными красителями. Так, низкомолекулярные полифосфаты обнаруживаются в виде гранул, в вакуолях (волютин), жиры — в виде капель, гликоген выявляется при окрашивании клеток раствором Люголя.

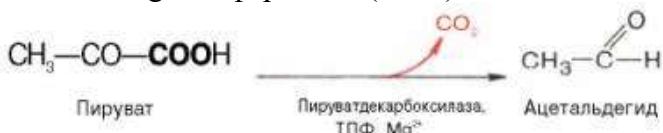
Спиртовое брожение осуществляется так называемыми дрожжеподобными организмами, а также некоторыми плесневыми грибками. Суммарную реакцию спиртового брожения можно изобразить следующим образом:



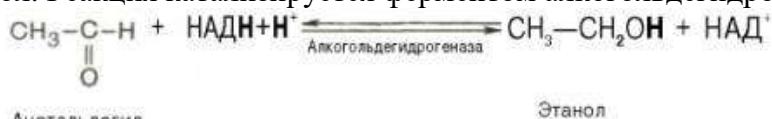
Глюкоза Этанол

Механизм реакции спиртового брожения чрезвычайно близок к гликолизу. Расхождение начинается лишь после этапа образования пирувата. При гликолизе пируват при участии фермента ЛДГ и кофермента НАДН восстанавливается в лактат. При спиртовом брожении этот конечный этап заменен двумя другими ферментативными реакциями – пируватдекарбоксилазной и алкогольдегидрогеназной.

В дрожжевых клетках (спиртовое брожение) пируват вначале подвергается декарбоксилированию, в результате чего образуется ацетальдегид. Данная реакция катализируется ферментом пируватдекарбоксилазой, который требует наличия ионов Mg и кофермента (ТПФ):



Образовавшийся ацетальдегид присоединяет к себе водород, отщепляемый от НАДН, восстанавливаясь при этом в этанол. Реакция катализируется ферментом алкогольдегидрогеназой:



Таким образом, конечными продуктами спиртового брожения являются этанол и CO_2 , а не молочная кислота, как при гликолизе.

Контрольные вопросы: 1. Виды дрожжей и строение дрожжевой клетки. 2. Химизм спиртового брожения. 3. Продукты спиртового брожения.

2.7 Лабораторная работа №7 (2 часа).

Тема: «Маслянокислые и уксуснокислые бактерии»

2.7.1 Цель работы: познакомиться с качественными реакциями на масляную кислоту, с морфологией маслянокислых бактерий, изучить морфологию уксуснокислых бактерий

2.7.2 Задачи работы:

1. Выделить культуру маслянокислых бактерий.
 2. Познакомиться с химизмом маслянокислых бактерий. Сделать качественные реакции на масляную кислоту, записать уравнения реакций.
 3. Изучить морфологию маслянокислых бактерий.
 4. Познакомиться с морфологией уксуснокислых бактерий.

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Посуда: пробирки на 20 см³, пипетки на 10 см³, фильтровальная бумага, вата, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, промывалки. Растворы: раствор 5 % FeCl₃, 96 % этиловый спирт, конц. H₂SO₄, раствор Люголя, раствор карболового фуксина, дистиллированная вода.

2.7.4 Описание (ход) работы:

Маслянокислое брожение – сложный процесс превращения углеводов в маслянную кислоту и другие продукты, совершающийся группой анаэробных спороносных бактерий рода

Clostridium. Распаду подвергаются не только сахара, но и более сложные углеводы под действием сложных различных активных ферментов маслянокислых бактерий.

Образующаяся масляная кислота в невысоких концентрациях является стимулятором роста растений.

1. Выделение маслянокислых бактерий. Для получения культуры маслянокислых бактерий рода *Clostridium* за 5 дней до начала занятий закладывают опыт. Неочищенный промытый картофель нарезают ломтиками и помещают в 5 пробирок. Пробирку заполняют на 1/3 объема. В пробирки добавляют щепотку мела, и заполняют дистиллированной водой на 2/3 объема. Пробирки аккуратно помещают в водяную баню при температуре 80 °C на 10–15 мин. После этого закрывают ватно-марлевыми пробками и ставят в термостат с температурой 35 °C на 5 дней. В этих условиях уже через два-три дня в жидкости обнаруживают бактерии маслянокислого брожения. Культура маслянокислых бактерий является при этом элевтичной. Для их преимущественного развития созданы анаэробные условия, бесспоровые формы других видов, убиты предварительным нагреванием, добавка мела нейтрализует образующиеся кислоты и способствует развитию бактерий.

2. Качественные реакции на масляную кислоту

2.1. К 3–4 см³ исследуемой жидкости в пробирку добавляют 0,5 см³ 96 % этилового спирта и 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки хорошо взбалтывают и нагревают над пламенем горелки. В присутствии масляной кислоты появляется запах масляно-этанового эфира, напоминающий запах ананаса:

2.2. К 5 см³ исследуемой жидкости добавить 2 см³ 5%-го раствора FeCl₃. Содержимое пробирки хорошо взбалтывают и нагревают над пламенем горелки. При нагревании образуется маслянокислое железо коричневого цвета.

3. Микроскопическое исследование маслянокислых бактерий.

В исследовании жидкости при микроскопировании обнаруживают главным образом *Clostridium pasteurianum*, подвижные палочки с закругленными концами, одиночные и парные. В клетках этих бактерий содержится гранулеза. В старых культурах у одного из концов клетки обнаруживают споры.

Для определения гранулез в клетке бактерий готовят препарат «Раздавленная капля».

1. На центр чистого обезжиренного предметного стекла пипеткой наносят каплю исследуемой жидкости. Каплю суспензии берут со дна пробирки трубочкой.

2. Этой же пипеткой равномерно, очень тонким слоем распределяют суспензию на 1/5 центральной части поверхности предметного стекла.

3. На предметное стекло наносят каплю концентрированного раствора Люголя и выдерживают в течение 30 с. Промывают водой и накрывают покровным стеклом.

4. Микроскопируют при увеличении 100x с масляной иммерсией. Гранулеза окрашивается раствором Люголя в синий цвет.

Задание. 1. Провести качественные реакции на масляную кислоту. Наблюдения записать. 2. Приготовить препарат «раздавленная капля». 2. Приготовить препарат и окрасить по Граму. Микрокартину зарисовать.

Контрольные вопросы: 1. Описать качественные реакции на масляную кислоту. 2. Методика выделения маслянокислых бактерий. Химизм маслянокислого брожения.

2.8 Лабораторная работа №8 (2 часа).

Тема: «Получение азотфикссирующих бактериальных препаратов. Свойства клубеньковых бактерий».

2.8.1 Цель работы: Ознакомиться с основами производства сывороток и иммуноглобулинов.

2.8.2 Задачи работы: Изучить основные этапы приготовления гипериммунных сывороток и иммуноглобулинов.

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, мультимедиа аппаратура.

2.8.4 Описание (ход) работы:

Микроорганизмы, усваивающие молекулярный азот атмосферы, — диазотрофы, имеют сходный биохимический механизм фиксации азота. Существуют две основные группы фиксирующих атмосферный азот микроорганизмов — вступающие в симбиоз с высшими растениями (роды бактерий *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mezorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*) и свободноживущие. Ко второй группе относятся ассоциативные азотфиксаторы (роды бактерий *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter* и др.) и микроорганизмы, более приспособленные к свободному существованию в почве (роды бактерий *Clostridium*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* и др.; азотфикссирующие фототрофные бактерии, цианобактерии). Разделение азотфиксаторов на ассоциативные и свободноживущие условно, поскольку способность к свободному обитанию в почве характерна для всех азотфикссирующих бактерий, при этом только симбиотические азотфиксаторы способны ассимилировать молекулярный азот исключительно в тесном взаимодействии с растениями. Связи цианобактерий с другими организмами достаточно разнообразны: они являются фикобионтами в лишайниках, живут в воздушных камерах мхов, в листьях водных папоротников и т. д. Следует отметить, что потенциальные возможности симбиотических азотфиксаторов значительно выше, чем свободноживущих. Симбиотические и ассоциативные системы растений и диазотрофов могут служить примером эволюционно сложившегося специфического взаимодействия живых организмов, изучение которых приобретает особую актуальность в связи с внедрением высокопродуктивного и экологически чистого земледелия. Фиксация молекулярного азота воздуха биологическим путем — процесс связывания и усваивания азота микроорганизмами. Он имеет большое практическое значение, поскольку промышленное производство химических азотных удобрений требует значительных затрат энергоресурсов, а сами по себе они могут быть вредны с точки зрения экологии. Всестороннее изучение этой проблемы обусловлено также необходимостью разработки новых эффективных биологических препаратов. Создание и применение биопрепаратов на основе азотфикссирующих микроорганизмов — наиболее эффективный прием повышения продуктивности растений и качества их урожая, позволяющий сохранять естественное плодородие почв и экологическое равновесие окружающей среды. Их использование дает возможность регулировать численность и активность полезной микрофлоры в ризосфере возделываемых культур, а также обеспечивать растения азотом, фиксированным из атмосферы. Например, в решении проблемы дефицита полноценного протеина ключевая роль принадлежит сое, однако в почвах, на которых эта культура выращивается впервые, обычно отсутствуют специфические для нее клубеньковые бактерии или же их количество незначительно (до 20 ед / г почвы). Микроорганизмы, составляющие основу биопрепаратов, должны соответствовать ряду требований, а также обладать определенными свойствами, в числе которых —

вирулентность, активность и эффективность, специфичность, конкурентоспособность, технологичность (способность накапливать титр в стандартной и производственной среде).

Среди общих требований к созданию биопрепаратов важны следующие:

- высокий титр активных клеток, необходимый срок хранения, транспортабельность, технологичность (растворимость, способность удерживаться на семенах и т. д.), а также экономичность их производства. Эффективность симбиотических систем «растение — микроорганизм» определяется вирулентностью и активностью микросимбионта. Вирулентность клубеньковых бактерий, в частности, — это способность проникать в корень бобового растения через корневые волоски и посредством сложных морфофизиологических изменений приводить к образованию клубеньков. Первая стадия проявления вирулентности — туморогенная активность, т. е. способность образовывать опухоли на корнях. Истинно вирулентным штаммам свойственна нодулирующая активность (клубенькообразование), заключающаяся в способности формировать полноценные клубеньки. Клубенек — это сложно устроенный орган растения, основными структурами которого являются: инфицированная бактериями ткань, в которой происходит фиксация молекулярного азота; проводящая ткань, по которой поступают растительные фотосинтаты и выносятся продукты азотфиксации; меристема, за счет которой происходит рост клубенька. На определенных этапах формирования ассоциативного взаимодействия в ризоценозе или становления бобоворизобиального симбиоза проявляются другие важные свойства бактерий, такие как азотфикссирующая активность — скорость восстановления N_2 в NH_3 и симбиотическая эффективность — способность растений интенсивно развиваться, используя симбиотрофное питание азотом. Симбиотическая эффективность в значительной степени определяется азотфикссирующей активностью клубеньков, особенно в условиях дефицита связанного азота, однако зависит также и от ряда факторов, не связанных непосредственно с азотфиксацией. Важную роль в определении продуктивности растительно-бактериальных взаимодействий может играть совместимость метаболических систем партнеров (в частности, путей транспортировки азота и углерода), а также отсутствие активных защитных реакций у растений в ответ на присутствие или проникновение микроорганизмов. Находящиеся в ризосфере или клубеньках бактерии могут синтезировать вещества, стимулирующие (фитогормоны, витамины) или угнетающие (ризобиотоксины) развитие растения-хозяина. Установлено, что эффективные и неэффективные штаммы азотфикссирующих бактерий отличаются по ряду биохимических показателей. Эффективные штаммы, вероятно, имеют более богатый метаболический фонд и у них активнее протекают окислительно-восстановительные процессы. Специфичность — способность бактерий избирательно вступать во взаимодействие с определенным видом или группой растений — является одной из важных систематических характеристик клубеньковых бактерий и тесно связана с их активностью. Ризобии, например, разделяют на активные, малоактивные и неактивные. Следует отметить, что вирулентность и активность бактерий могут зависеть от особенностей штамма, вида и сортовой специфичности растений, почвенно-климатических условий и ряда других факторов. Различные расы азотфикссирующих бактерий конкурируют между собой. Более вирулентные штаммы активнее других колонизируют или инокулируют корневую систему специфичных для них растений. Исследователи по-разному трактуют понятие конкурентоспособности бактерий. С одной стороны — это способность конкурировать со спонтанно инокулирующими растения штаммами, а с другой — противостоять местной сапропифитной микрофлоре и вытеснить местные штаммы. Для практического применения микроорганизмов создают их различные препаративные формы, такие как жидкая культура, препараты на гельных субстратах (бактериальные экзополисахариды, силикагель, высокодисперсные материалы) и твердых носителях (вермикулит, лигнин, перлит, торф).

Получение производственных штаммов азотфикссирующих бактерий и создание биопрепаратов на их основе — длительный научно-производственный процесс (рис. 1), в котором можно выделить следующие этапы.

1. Научно-исследовательская работа: – реизоляция микроорганизма-азотфиксатора из естественной среды обитания; – введение в культуру и аналитическая селекция перспективных штаммов; – получение новых высокоэффективных штаммов генно-инженерными методами; – изучение физиолого-биохимических характеристик, симбиотических свойств, конкурентоспособности, эффективности и технологичности азотфикссирующих бактерий; – проведение научно-исследовательских испытаний, депонирование и патентование штаммов; – хранение чистой культуры микроорганизмов в условиях музея.

2. Подготовительный этап производства: – приготовление питательных сред (рис. 2) и добавок; – восстановление физиологической активности азотфикссирующих бактерий после условий хранения (пересев, реактивация на качалке-шайкере при постоянной температуре и аэрации); – налаживание системы очистки воздуха (рис. 3) и прочие мероприятия, предусмотренные особенностями конкретного производства (при необходимости).

3. Производственный процесс: – культивирование бактерий на производственных качалках (шайкерах) в колбах или в ферментерах (биореакторы в виде специально устроенных камер (рис. 4), в которых происходит процесс выращивания микроорганизмов или ферментация; – выделение конечного продукта (получение жидкой культуры микроорганизма); – подготовка носителя (фасовка и стерилизация субстрата, внесение добавок) или тары для жидкой препартивной формы (стерилизация емкостей); – инокуляция используемого носителя. 4. Хранение или инкубирование биопрепарата при определенном температурном режиме. 5. Контроль качества продукции (титр бактериальных клеток / 1 г препартивной формы, наличие посторонней микрофлоры). 6. Очистка сточных вод и газовых выбросов, утилизация отходов.

Общая схема производства включает вышеперечисленные этапы, однако в каждом конкретном случае имеет свои особенности. Это обусловлено степенью сложности отдельно организованного биотехнологического процесса (лабораторные условия, использование шайкеров, производственных качалок, различных ферментеров), а также технологическими требованиями культивируемых микроорганизмов и выбором препартивной формы конечного продукта (жидкая культура, различные носители). Например, комплект оборудования для ферментации микроорганизмов на жидких средах может состоять из инокуляционного и производственного ферментеров, системы очистки воздуха для ферментации, набора соединительных трубок, а также компрессора и газового счетчика. После того как было установлено положительное влияние почвенной микрофлоры на жизнедеятельность и продуктивность растений, возник вопрос о практическом применении микроорганизмов, в частности фиксирующих азот атмосферы. Создание биопрепаратов на основе азотфикссирующих бактерий было продиктовано необходимостью сохранения их жизнедеятельности и функциональной активности в определенной препартивной форме (питательная среда или субстрат) с целью широкого практического применения. Первый биопрепарат на основе азотфикссирующих клубеньковых бактерий — **нитрагин** — был произведен в Германии в 1896 г. В Советском Союзе создан и получил широкое распространение препарат **ризоторфин** — торфяной субстрат с питательными добавками, содержащий высокоактивный, конкурентоспособный штамм ризобий для конкретного вида бобовых растений. Бактериальные удобрения для бобовых растений на основе симбиотрофных азотфиксаторов являются наиболее распространенными биопрепаратами диазотрофов. Например, в США производили и использовали на сотнях тысяч гектаров посевов нитрагин и **даблиоктин**, в Аргентине и Уругвае — нитросоил и нитрум, в Новой Зеландии — ризокоут, в

Австралии — тропикалинокулянте, нодулейт и нитроджерм, в Индии — арисс агро, в Египте — окадин. Для инокуляции семян чаще всего используют препараты клубеньковых бактерий из родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* под бобовые растения на основе вермикулита или перлита с общим названием **ризобофит**. При этом симбиотрофные клубеньковые бактерии обеспечивают фиксацию азота до 350 кг/га у люцерны на втором году вегетации, а также до 280 кг/га у сои и 70 кг/га у гороха. В результате проведенных многолетних исследований установлено, что инокуляция растений высокоеффективными штаммами ризобий (нитрагинизация) повышает продуктивность бобовых в среднем на 10–25%. На основе ассоциативных азотфикссирующих бактерий разработана технология производства биопрепаратов — **диазофита** (ризоагрина) для пшеницы и риса и **ризоэнтерина** под ячмень. Биоагент диазофита — *Agrobacterium radiobacter* 204, а ризоэнтерина — *Enterobacter aerogenes* 30а. Для инокуляции семян пшеницы, ячменя, озимой ржи, проса и риса применяется также отечественный препарат диазобактерин на основе *Azospirillum brasilense*. Для повышения продуктивности овощных культур: томатов, капусты, сахарной свеклы, моркови и картофеля рекомендован препарат **азотобактерин**, состоящий из консорциума *A. chroococcum* 21 и *A. vinelandii* 22. Показана также эффективность инокуляции семян различных культур препаратом флавобактерин на основе *Flavobacterium sp.* L30 и препаратом **мизорин** — штамм *Arthrobacter misorens* 7. На основе диазотрофов из рода *Klebsiella* разработаны препараты биоплант К и клепс, повышающие продуктивность овощных культур за счет оптимизации азотного питания и фунгистатического действия. Перечень биотехнологических продуктов — микробных препаратов для растениеводства за последние десятилетия значительно расширился и включает препараты, созданные на основе свободноживущих, ассоциативных, симбиотрофных азотфикссирующих и фосфатмобилизирующих бактерий, а также препаратов бинарного действия, получаемых в результате сочетания различных микроорганизмов (табл. 1). Одним из перспективных объектов биотехнологии являются синезеленые водоросли благодаря их способности к фотосинтезу, азотфиксации, синтезу комплекса биологически активных и ростактивирующих веществ, положительно влияющих на плодородие почв и активность почвенной биоты. Цианобактерии тесно связаны с бактериями, обитающими в их слизи (*Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*), и способны образовывать новые устойчивые ассоциации, что открывает перспективу для конструирования эффективных микробных консорциумов и препаратов на их основе. Положительные результаты были получены при использовании в агробиотехнологии искусственных альгоризбиональных ассоциаций для инокуляции семян лядвенца, гороха и клевера. На сегодняшний день доказано усиление эффекта нитрагинизации бобовых растений под влиянием искусственных консорциумов на основе *Nostoc* и различных видов *Rhizobium*. Совместная обработка семян люцерны азотфикссирующими бактериями и синезелеными водорослями *Nostoc punctiforme*, а также их бинарными композициями стимулирует рост и развитие растений. При этом установлено, что наиболее эффективна совместная инокуляция цианобактериями с отдельными Tn5-мутантами ризобий в сравнении с инокуляцией их монокультурами. Нами изучена также реакция растений сои *Glycine max* (L.) Merr. на инокуляцию альгоризбиональными композициями на основе клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* и синезеленой водоросли *Nostoc punctiforme*. Показано, что инокуляция семян сои альгоризбиональными композициями способствует повышению всхожести и положительно влияет на формирование проростков. Включение синезеленых водорослей в инокуляционную суспензию ризобий и их Tn5-мутантов в определенных сочетаниях может стимулировать рост и развитие сои, накопление фотосинтетических пигментов в листьях и содержание протеина в семенах, однако при этом не оказывает существенного влияния на азотфикссирующую активность клубеньков, а также

продуктивность растений. Полученные данные указывают на необходимость поиска эффективных комплексных альгоризобиальных композиций для инокуляции растений сои путем оптимального подбора штаммов бактерий и соотношения инокуляционных агентов. Дальнейшего изучения, на наш взгляд, требуют также альгоризобиальные композиции, созданные на основе микроорганизмов с генетически измененными свойствами. Создание и подбор совместимых альгоризобиальных ассоциаций, включающих аксенические культуры синезеленых водорослей и клубеньковых бактерий, а также их Tn5-мутантов может стать одним из способов биологической стимуляции бобово-ризобиального симбиоза, повышающего значимость взаимодействия ризобий с растениями и эффективность бактериальных препаратов на их основе. При формировании бобово-ризобиального симбиоза важным компонентом взаимодействия симбиопартнеров являются полисахариды, синтезируемые азотфиксирующими бактериями. Возможно, под действием именно этих веществ, выступающих индикаторами ранних этапов морфогенеза клубеньков, происходит активация ряда растительных генов, которые «молчат» в корнях неинокулированных ризобиями растений. Существует предположение, что полисахариды неризобиального происхождения, так же как и гликополимеры ризобий, способны имитировать действие фитогормонов и усиливать процессы нодуляции и морфогенеза в бобово-ризобиальном симбиозе. Показано, что клетки клубеньковых бактерий при действии экзогенных полисахаридов (бактозоль) усиливали рост, продуцировали в большом объеме биомассу и изменяли активность некоторых энзимов азотного обмена. Позднее было выявлено стимулирующее действие синтетического полисахарида (ПС МОД19) на рост ризобий, накопление биомассы и изменение их метаболизма при выращивании бактерий на твердой и жидкой средах в присутствии этого биополимера. При обработке семян гороха (*Pisum sativum*L.) перед посевом ПС МОД19 у растений обнаружено усиление ризогенеза, активности пероксидазы растительных клеток, а также повышение эффективности симбиоза в целом за счет вторичного образования клубеньков на боковых корнях и пролонгирования периода их активной азотфиксации. В этой связи синтетические полисахариды могут представлять интерес как биологически активные вещества для практического применения, в частности для расширения номенклатуры веществ, способных стимулировать ростовую активность ризобий и, в большей степени, усиливающих и пролонгирующих азотфиксирующую активность клубеньков, образуемых на корнях бобовых растений. Последнее обстоятельство имеет особое значение для бобовых с коротким вегетационным периодом, характерным представителем которых является горох.

Контрольные вопросы: 1. Микроорганизмы, усваивающие молекулярный азот атмосферы. 2. Этапы получение производственных штаммов азотфиксирующих бактерий. 3. Характеристика биопрепаратов на основе азотфиксирующих бактерий.

2.9 Лабораторная работа №9 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за 2 модуль»

2.9.1 Цель работы: Проверка знаний студентов по пройденному материалу

2.9.2 Задачи работы: Оценить знания студентов по пройденному материалу

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, мультимедиа аппаратура.

Контрольные вопросы:

1. Виды дрожжей и строение дрожжевой клетки.
2. Химизм спиртового брожения.
3. Продукты спиртового брожения.
4. Описать качественные реакции на масляную кислоту.
5. Методика выделения маслянокислых бактерий. Химизм маслянокислого брожения. Микроорганизмы, усваивающие молекулярный азот атмосферы.
6. Этапы получение производственных штаммов азотфикссирующих бактерий.
7. Характеристика биопрепаратов на основе азотфикссирующих бактерий.

2.10 Лабораторная работа №10 (2 часа).

Тема: «Получение газообразного и жидкого топлива. Получение биогаза. Получение спиртов. Получение тепловой энергии при бактериологическом окислении».

2.10.1 Цель работы: Ознакомиться с основами получения газообразного и жидкого топлива

2.10.2 Задачи работы:

1. Технология получения биогаза
2. Применение биогаза

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ноутбук, мультимедиа аппаратура

2.10.4 Описание (ход) работы:

Биогаз – новый источник получения энергии

Альтернативным источником получения энергии успешно становится биогаз. Это газ, который получают вследствие метанового или водородного брожения биологических масс. Метановое разложение происходит при участии трех видов бактерий: гидролизных, кислотообразующих и метанообразующих. Каждые последующие бактерии питаются предыдущими - это типичная цепочка питания.

Биогаз - это продукт обмена веществ метановых бактерий, который образуется в результате разложения органической массы.

Биогаз является высококачественным и полноценным носителем энергии и может многосторонне использоваться как топливо в домашнем хозяйстве и в предпринимательстве для приготовления пищи, производства электроэнергии, отопления помещений, кипячения, сушки и охлаждения.

1. Технология получения биогаза

Для получения биогаза требуются анаэробные условия, которые изначально предвидены в системе и стадиях производства. Важно соблюдать уровень рН, влажность и температуру для создания благоприятной среды жизни и размножения бактерий. Особое значение приобретает равномерная подача субстрата и регулярная подача питательных веществ. Нужно помнить про период брожения: его увеличение увеличивает количество произведенного газа. Перемешивание позволит предотвратить образование осадка и корочки, а также оно помогает выводить появившийся газ. Другими словами: необходимо тщательно соблюдать стабильность всех стадий процесса получения биогаза.

Технология получения биогаза включает в себя 4 этапа:

1. Гидролиз. Здесь участвуют аэробные гидролизные бактерии, а конечным продуктом считается аминокислоты, моносахариды и жирные кислоты.

2. Повышение кислотности. Тут задействованы кислотообразующие бактерии. На выходе появляются двуокись углекислого газа и органические кислоты.

3. Образование уксусной кислоты с помощью бактерий, образующих эту уксусную кислоту. Получаемые продукты: двуокись углерода, водород и уксусная кислота.

4. Образование метана при участии бактерий, которые его вырабатывают. На заключительном этапе мы получаем метан, воду и двуокись углерода.

Технология биогаза предполагает еще и другие процессы: одностадийный и двухстадийный. В одностадийном процессе нет раздела по месту протекания разложения. А двухстадийный процесс применяют для быстро разлагаемого сырья.

1.2.1 Сырье, используемое в ходе получения “экологического топлива”

В перечень органических отходов, пригодных для производства биогаза можно включить: навоз, птичий помёт, пивная дробина, свекольный жом, фекальные осадки, трава, бытовые отходы, отходы молокозаводов, отходы производства биодизеля, отходы от производства соков, отходы производства крахмала и патоки, отходы переработки картофеля, при производстве чипсов.

Кроме отходов биогаз можно производить из специально выращенных энергетических культур, например, из силосной кукурузы или сильфия, а также водорослей. Выход газа может достигать до 300 м³ из 1 тонны.

Свалочный газ — одна из разновидностей биогаза. Получается на свалках из муниципальных бытовых отходов.

2. Оптимизация процесса получения биогаза

Кислотообразующие и метанобразующие бактерии встречаются в природе повсеместно, в частности в экскрементах животных. В пищеварительной системе крупного рогатого скота содержится полный набор микроорганизмов, необходимых для сбраживания навоза. Поэтому навоз КРС часто применяют в качестве сырья, загружаемого в новый реактор. Для начала процесса сбраживания достаточно обеспечить следующие условия:

1) Поддержка анаэробных условий в реакторе – жизнедеятельность метанообразующих бактерий возможна только при отсутствии кислорода в реакторе биогазовой установки, поэтому нужно следить за герметичностью реактора и отсутствием доступа в реактор кислорода;

2) Соблюдение температурного режима – поддержка оптимальной температуры является одним из важнейших факторов процесса сбраживания. В природных условиях образование биогаза происходит при температурах от 0°C до 97°C, но с учетом оптимизации процесса переработки органических отходов для получения биогаза и биоудобрений выделяют три температурных режима:

Психофильный температурный режим определяется температурами до 20 - 25°C;
мезофильный температурный режим определяется температурами от 25°C до 40°C;
термофильный температурный режим определяется температурами выше 40°C.

Степень бактериологического производства метана увеличивается с увеличением температуры. Но, так как количество свободного амиака тоже увеличивается с ростом температуры, процесс сбраживания может замедлиться. Биогазовые установки без подогрева реактора демонстрируют удовлетворительную производительность только при среднегодовой температуре около 20°C или выше или когда средняя дневная температура достигает по меньшей мере 18°C. При средних температурах в 20-28°C производство газа непропорционально увеличивается. Если же температура биомассы менее 15°C, выход газа будет так низок, что биогазовая установка без теплоизоляции и подогрева перестает быть экономически выгодной.

Сведения относительно оптимального температурного режима различны для разных видов сырья. Для биогазовых установок работающих на смешанном навозе КРС, свиней и птиц, оптимальной температурой для мезофильного температурного режима является 34 - 37°C, а для термофильного 52 - 54°C. Психофильный температурный режим соблюдается в установках без подогрева, в которых отсутствует контроль за температурой. Интенсивное выделение биогаза в психофильном режиме происходит при 23°C.

В дополнение к углероду и водороду создание биоудобрений требует достаточного количества азота, серы, фосфора, калия, кальция и магния и некоторого количества микроэлементов - железа, марганца, молибдена, цинка, кобальта, селена, вольфрама, никеля и других. Обычное органическое сырье - навоз животных - содержит достаточное количество вышеупомянутых элементов.

3) Время сбраживания – оптимальное время сбраживания зависит от дозы загрузки реактора и температуры процесса сбраживания. Если время сбраживания выбрано слишком коротким, то при выгрузке сброшенной биомассы бактерии из реактора вымываются быстрее, чем могут размножаться, и процесс ферментации практически останавливается. Слишком продолжительное выдерживание сырья в реакторе не отвечает задачам получения наибольшего количества биогаза и биоудобрений за определенный промежуток времени.

При определении оптимальной продолжительности сбраживания пользуются термином "время оборота реактора". Время оборота реактора - это то время, в течение которого свежее сырье, загруженное в реактор, перерабатывается, и его выгружают из реактора. Для систем с непрерывной загрузкой среднее время сбраживания определяется отношением объема реактора к ежедневному объему загружаемого сырья. На практике время оборота реактора выбирают в зависимости от температуры сбраживания и состава сырья в следующих интервалах:

- 1) психофильный температурный режим: от 30 до 40 и более суток;
- 2) мезофильный температурный режим: от 10 до 20 суток;
- 3) термофильный температурный режим: от 5 до 10 суток.

Суточная доза загрузки сырья определяется временем оборота реактора и увеличивается (как и выход биогаза) с увеличением температуры в реакторе [1]. Если время оборота реактора составляет 10 суток: то суточная доля загрузки будет составлять 1/10 от общего объема загружаемого сырья. Если время оборота реактора составляет 20 суток, то суточная доля загрузки будет составлять 1/20 от общего объема загружаемого сырья. Для установок, работающих в термофильном режиме, доля загрузки может составить до 1/5 от общего объема загрузки реактора.

Выбор времени сбраживания зависит также и от типа перерабатываемого сырья. Для следующих видов сырья, перерабатываемого в условиях мезофильного температурного режима, время, за которое выделяется наибольшая часть биогаза, равно примерно:

- 1) жидкий навоз КРС: 10 -15 дней;
- 2) жидкий свиной навоз: 9 -12 дней;
- 3) жидкий куриный помет: 10-15 дней;
- 4) навоз, смешанный с растительными отходами: 40-80 дней.

5) Кислотно-щелочной баланс – метанопродуцирующие бактерии лучше всего приспособлены для существования в нейтральных или слегка щелочных условиях. В процессе метанового брожения второй этап производства биогаза является фазой активного действия кислотных бактерий. В это время уровень pH снижается, то есть среда становится более кислой.

Однако при нормальном ходе процесса жизнедеятельность разных групп бактерий в реакторе проходит одинаково эффективно и кислоты перерабатываются метановыми бактериями. Оптимальное значение pH колеблется в зависимости от сырья от 6,5 да 8,5. Измерить уровень кислотно-щелочного баланса можно с помощью лакмусовой бумаги. Значения кислотно-щелочного баланса будут соответствовать цвету: приобретаемому бумагой при её погружении в сбраживаемое сырье.

6) Содержание углерода и азота – одним из наиболее важных факторов, влияющих на метановое брожение (выделение биогаза), является соотношение углерода и азота в перерабатываемом сырье. Если соотношение С/Н чрезмерно велико, то недостаток азота будет служить фактором, ограничивающим процесс метанового брожения. Если же это соотношение слишком мало, то образуется такое большое количество аммиака, что он становится токсичным для бактерий. Микроорганизмы нуждаются как в азоте, так и в углероде для ассимиляции в их клеточную структуру. Различные эксперименты показали: выход биогаза наибольший при уровне соотношения углерода и азота от 10 до 20, где оптимум колеблется в зависимости от типа сырья. Для достижения высокой продукции биогаза практикуется смешивание сырья для достижения оптимального соотношения С/Н.

3. Применение биогаза

Биогаз используют в качестве топлива для производства: электроэнергии, тепла или пара, или в качестве автомобильного топлива.

Биогазовые установки могут устанавливаться как очистные сооружения на фермах, птицефабриках, спиртовых заводах, сахарных заводах, мясокомбинатах. Биогазовая установка может заменить ветеринарно-санитарный завод, т. е. падаль может утилизироваться в биогаз вместо производства мясо-костной муки.

Среди промышленно развитых стран ведущее место в производстве и использовании биогаза по относительным показателям принадлежит Дании — биогаз занимает до 18 % в её общем энергобалансе. По абсолютным показателям по количеству средних и крупных установок ведущее место занимает Германия — 8000 тыс. шт. В Западной Европе не менее половины всех птицеферм отапливаются биогазом.

2. Последовательность стадий технологической схемы производства

Установка для анаэробной переработки органических отходов, включающая анаэробный биореактор с основным нагревателем биомассы, выполненный в виде герметично закрытой емкости, разделенной с помощью вертикальных перегородок на секции, снабженный патрубками загрузки сырья и выгрузки жидкого органического удобрения, систему подачи исходного сырья, систему отвода биогаза с компрессором, систему удаления жидкого органического удобрения, систему управления технологическим процессом, выполненную в виде программируемого компьютера, отличающаяся тем, что анаэробный биореактор разделен переливной и двумя перегородками-теплообменниками, расположенными друг к другу под углом 120°, на три сообщающиеся между собой секции: гидролизную, соединенную с системой подачи исходного сырья, кислотоацидогенную и метаногенную, соединенную с системой удаления жидкого органического удобрения, при этом переливная перегородка установлена между гидролизной и кислотоацидогенной секциями по высоте с зазором между нижней гранью и дном корпуса биореактора с превышением над зеркалом жидкости в биореакторе и с зазором между крышкой корпуса биореактора и верхней гранью переливной перегородки; одна из полых перегородок-теплообменников установлена между кислотоацидогенной и метаногенной секциями по высоте от дна корпуса биореактора с превышением над зеркалом жидкости; другая полая перегородка-теплообменник установлена между метаногенной и гидролизной секциями по высоте от дна корпуса биореактора с превышением над зеркалом жидкости и с зазором между верхней ее гранью и крышкой биореактора; один из патрубков для слива жидких органических отходов расположен в верхней части корпуса биореактора на высоте, соответствующей 90% объема, занимаемого жидкой биомассой, второй патрубок для слива жидких органических отходов расположен в нижней части корпуса биореактора; устройство для перемешивания биомассы выполнено в виде вертикального шнека, установленного в метаногенной секции биореактора, который приводится во вращательное движение от электропривода; корпус биореактора дополнительно снабжен системой наружного обогрева, выполненной в виде вертикально закрепленных на корпусе труб с прямоугольным сечением, соединенных между собой гибкими вставками; кроме этого, установка снабжена газгольдером, предназначенным для сбора и хранения биогаза и соединенным с системой

удаления биогаза с одной стороны и с источником теплоснабжения с другой стороны, а система подготовки исходного сырья снабжена трубопроводом, соединенным с системой удаления жидкого органического удобрения.

Исходное сырье в виде влажной органической биомассы подают в систему подготовки исходного сырья 3, где измельчают и перемешивают. Сюда же по трубопроводу 7 подают жидкость, полученную из влажного органического удобрения после слива из анаэробного биореактора 1. Жидкость имеет температуру, близкую к температуре биомассы в анаэробном биореакторе, и содержит штаммы метанобразующих бактерий, при участии которых образуются метан и диоксид углерода - основные компоненты биогаза. Подаваемая жидкость повышает влажность исходного сырья до 90-92%, осуществляет предварительный подогрев исходного сырья и способствует интенсификации процесса брожения за счет предварительного осеменения.

Подготовленную таким образом биомассу посредством системы подачи исходного сырья подают в гидролизную секцию, а через нее и в другие сообщающиеся с ней секции: кислотоацидогенную и метаногенную анаэробного биореактора.

Включают, подключенный к внутренним перегородкам-теплообменникам, а также к системе наружного обогрева 19 биореактора. Обогрев анаэробного биореактора снаружи и изнутри позволяет создать равномерное температурное поле всего объема биомассы, повышая тем самым эффективность процесса газообразования. Шнек 18 для перемешивания биомассы включается в работу с помощью системы управления технологическим процессом 6 с периодичностью несколько раз в сутки, что также способствует интенсификации процесса газообразования и предотвращает коркообразование на поверхности жидкости, тем самым создавая условия для беспрепятственного перемещения биогаза в верхнюю часть анаэробного биореактора.

В начале технологического процесса в анаэробном биореакторе наблюдается атмосферное давление. В процессе образования биогаза давление в верхней части анаэробного биореактора растет. При достижении давлением определенного значения система управления технологическим процессом 6 включает компрессор, и биогаз с помощью системы удаления биогаза 4 направляется в газгольдер 8.

Удаление перебродившей биомассы осуществляется через патрубки, через патрубок 10 для удаления 10% перебродившей биомассы один раз в сутки (экспериментально установлено, что примерно 10% биомассы полностью сбраживается в течение суток), а через патрубок в случае ремонта или очистки биореактора для удаления всей биомассы.

Таким образом, предлагаемая установка для анаэробной переработки органических отходов позволяет обеспечить оптимальный гидравлический режим движения биомассы в биореакторе; разделить процесс сбраживания биомассы по отдельным секциям в соответствии с химизмом процесса; создать оптимальный температурный режим для процесса сбраживания; обеспечить интенсивное перемешивание биомассы, при этом исключая коркообразование; интенсифицировать процесс сбраживания на этапе подготовки биомассы за счет добавления жидкости, содержащей штаммы метанобразующих бактерий; обеспечить сбор и хранение образующегося биогаза в газгольдере; обеспечить поступление и удаление 10% перебродившей биомассы в процессе загрузки-выгрузки. Все это делает ее более эффективной и экономичной в сравнении с прототипом.

Контрольные вопросы: 1. Что такое биогаз? 2. Описать технологические стадии получения биогаза. 3. Перечислить области применения биогаза.

2.11 Лабораторная работа №11 (2 часа).

Тема: «Препараты микроорганизмов против животных – вредителей растений»

2.11.1 Цель работы: Ознакомиться с наиболее распространёнными биопрепаратами на основе бактерий, грибков против вредителей растений

2.11.2 Задачи работы:

1. Биопрепараты на основе грибков
2. Биопрепараты на основе бактерий

2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ноутбук, мультимедиа аппаратура

2.11.4 Описание (ход) работы:

Микробиопрепараты являются важнейшими средствами защиты растений от вредителей и болезней в органическом (биологическом, экологическом) земледелии. Главной особенностью этих средств защиты является их безвредность для человека, окружающей среды, домашних и диких животных, насекомых (опылителей, энтомофагов) и других представителей биоценоза.

Спектр микробиологических средств за последнее десятилетие пополнился новейшими разработками ученых России, некоторые из них производятся и поступают в продажу через торговую сеть магазинов

В большинстве случаев в состав препаратов входят живые микроорганизмы: бактерии, грибы, вирусы. Некоторые из полезных микроорганизмов могут продуцировать природные токсины, антибиотические вещества, стимуляторы роста, содержащиеся в биопрепаратах. Другие – лучистые грибы, или актиномицеты при помощи биотехнологий при культивировании на питательных средах в процессе биосинтеза выделяют химические вещества, которые имеют высокую инсектицидную активность, например, препараты фитоверм, акарин, вертимек. Они поэтому и получили название биохимических средств защиты. Учитывая их низкую токсическую нагрузку на биоценозы, щадящее действие на полезных насекомых, пауков и клещей, быструю впитываемость листовой поверхностью растений, короткий срок ожидания (время последней обработки до сбора урожая двое суток) они также могут быть рекомендованы для защиты растений в органическом земледелии.

Все разрабатываемые препараты проходят стадию регистрационных испытаний и затем включаются в Государственный каталог средств защиты растений, разрешенных для применения в сельском хозяйстве, в том числе в личном подсобном хозяйстве. Характеристика описываемых в данной статье препаратов основана на многолетнем опыте практического применения микробиологических средств защиты растений в хозяйствах Ленинградской области и личного их использования на собственном садовом участке.

Биопрепараты для борьбы с вредителями растений

Биопрепараты на основе бактерии БТ (*Bacillus thuringiensis*).

Лепидоцид – препарат используется для борьбы с гусеницами чешуекрылых насекомых (бабочек), ложногусеницами пилильщиков на овощных, плодово-ягодных, цветочно-декоративных, лекарственных культурах, а также на лесных лиственных и хвойных породах.

Битоксивациллин (БТБ-202) – кроме перечисленных выше видов вредителей действует на личинок колорадского жука, может применяться для борьбы с паутинным клещом в теплицах. Наиболее эффективны рабочие концентрации – 0,5-1,0% (5-10 г/л воды). Обработки проводят из опрыскивателей. В теплицах на огурцах, дынях, арбузах, розах и других культурах наиболее эффективными концентрациями в борьбе с паутинным клещом являются 1,0-2,0% (10-20 г/л воды), при этом расход жидкости составляет от 0,1 до 0,3 л на 1 м² в зависимости от вида и облиственности растений.

Использование опрыскивателей позволяет равномерно нанести препарат на поверхность листа и вредителей. При растянутой яйцекладке вредителя обычно проводят две обработки с интервалом 7-10 дней против каждого поколения, в утренние или вечерние часы, при

среднесуточной температуре не ниже 16...17°C. Проливные дожди, прошедшие спустя одни сутки после обработки, могут сильно снижать эффективность опрыскивания биопрепаратами. Поэтому надо следить за прогнозом погоды, а при неблагоприятных условиях обработки следует переносить.

При использовании биопрепаратов, которые чаще всего поступают в торговую сеть в виде порошков, паст важно правильно приготовить рабочую Аналогом лепидоцида, битоксибациллина является препарат **бикол**. Кроме овощных культур, картофеля, огурца препарат можно применять на яблоне при опрыскивании им против листогрызущих вредителей в фенофазе «розовый бутон», вторая обработка – сразу после цветения. Рабочая концентрация из расчета 60-160 г/10 л воды.

Разработчики гарантируют срок хранения биопрепаратов обычно в течение 1,5 лет. После истечения указанного срока титр жизнеспособных спор (количество их в 1 г, мл) и биологическая активность (вирулентность) начинает снижаться. После истечения указанного срока хранения норму расхода препараторов надо увеличить в 1,2-1,5 раз. Если препарат выпущен в зимний период текущего года (дата обычно ставится на упаковке) его можно употребить в течение двух сезонов.

ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии разработал препарат, имеющий более широкий спектр применения, который действует также на крестоцветных блошек, землянично-малинного долгоносика и других насекомых. Таким препаратом является **бацикол**. Он готовится к государственной регистрации, после чего будет включен в каталог средств защиты растений, начнется широкое производство.

Тем же институтом разработан препарат на основе актиномицетов под названием **актинин**. Кроме колорадского жука, паутинного клеща он действует на морковную листоблошку, вызывающую сильное скручивание растений моркови, особенно в местах близкого расположения хвойных лесов, из которых она летит на зонтичные культуры. Препарат проходит государственную регистрацию.

Бактоулицид (бактицид) – также, как лепидоцид и битоксибациллин, выпускается Бердским заводом биопрепаратов в Новосибирской области. Применяется для обработки водоемов, подвальных помещений, мест выплода кровососущих комаров и мошек. Может использоваться и на рисе в борьбе против рисового комарика, а также при выращивании шампиньонов и вешенки для защиты от грибных комариков-сциариid. В магазины уже начинают поставлять этот препарат и в мелкой фасовке.

Немабакт, Энтонем-Ф – препараты, разработанные в ВИЗРе доктором сельскохозяйственных наук Л.Г. Даниловым на основе энтомопатогенных нематод и симбиотической бактерии. Зарегистрированы они для борьбы с колорадским жуком, личинками жуков щелкунов – проволочниками, капустной и облепиховой мухой, западным цветочным (калифорнийским) трипсом. На картофеле препарат применяется для внесения в почву при посадке клубней и при опрыскивании растений в период бутонизации. В 2008 году нами установлено, что крайний срок внесения немабакта для борьбы с проволочниками после цветения должен быть не позднее 1 августа.

Норма расхода – одна упаковка на 100 м². Чаще выпускается на носителе – поролоновой губке размером 3-7 мм. Перед применением нужно провести 3-5-кратный отжим нематод из губки в резиновых перчатках в небольшую емкость с водой. После этого суспензию препарата надо процедить через капроновое сито или марлю, прежде чем заливать в опрыскиватель. Обработки растений следует проводить при температуре воздуха не ниже 12°C. Препарат выпускается в институте защиты растений (г. Пушкин, ООО «Биодан»).

Вот почти и весь перечень микробиопрепаратов, которые можно применять для борьбы с вредителями. Поэтому в арсенале садоводов должны быть и биохимические препараты (**фитоверм, акарин (агравертин)**, а на Украине также **актофит** (аналог фитоверма) и **гаупсин**). Последний из них содержит в себе два штамма бактерий, он эффективен против ряда вредителей, одновременно против некоторых болезней. В соседней с нами Республике

Белаорусь также имеются новые интересные биопрепараты, прошедшие государственную регистрацию и включенные в каталог средств защиты растений. В России также имеются инсектицидные биопрепараты с полифункциональными свойствами, обладающими фунгистатическим действием. Однако на практике можно иногда делать смесь препаратов. Например, мы проводили смешивание биопрепаратов, имеющих ростостимулирующее, фунгицидное (экстрасол, биосил, фитоспорин) и инсектицидное действие, непосредственно перед обработкой растений. На биологическую эффективность битоксибациллина и лепидоцида в борьбе с гусеницами белянок это не повлияло.

При этом важная роль отводится мониторингу вредителей и болезней. На основании обследования насаждений определяется необходимость проведения борьбы, обычно это бывает при численности вредителя, приближающейся к экономическому порогу вредоносности, а также с учетом численности энтомофагов и энтомопатогенов на основе специального критерия – уровня естественных врагов. Однако о них мы расскажем в следующих публикациях.

Биопрепараты для борьбы с болезнями

Планриз – создан на основе бактерии *Pseudomonas fluorescens*. Несложная технология производства позволила получать препарат малотоннажным способом на станциях защиты растений (филиалы ФГУ «Россельхозцентр»). Широко применяется на капусте для борьбы с бактериозами, где химические фунгициды не разрешены. Используется для предпосевной обработки семян зерновых (0,5 л/га) при невысокой зараженности их фитопатогенами, для обработки клубней картофеля и опрыскивания в период вегетации. Препарат обладает ростостимулирующим действием. Может применяться в интегрированной защите растений, в системе чередования химических и биологических средств.

Фитоспорин. Препарат широкого спектра действия на основе *Bacillus subtilis*. Применяется на зерновых, овощных культурах и картофеле, для обработки плодовых и ягодных растений, в защищенном грунте. Действие препарата усиливается при совместном применении с гуминосодержащим препаратом (гуми). При обработке растений, плодов они покрываются черной сеточкой из препарата, длительное время препятствующей проникновению фитопатогенов. Например, помидоры, обработанные однократно в середине июля 2009 года от фитофторы, собранные в конце августа дозревали в домашних условиях практически без отходов. Приготовление рабочей жидкости нужно проводить по методике, рекомендуемой для БТБ-202, лепидоцида.

Бинорам. Препарат содержит два вида бактерий, проявляющих активность в отношении болезней растений, обладает сильным ростостимулирующим действием. Находит все большее применение на зерновых, овощных культурах и картофеле для обработки семян и опрыскивания в период вегетации. В личных подсобных хозяйствах и садоводствах рекомендуется для обработки картофеля в борьбе с ризоктониозом. Норма расхода 7,5 мл на 10 л воды.

Бактофит. Применяется в открытом и закрытом грунте для борьбы с корневыми гнилями, мучнистой росой, фитофторозом, ризоктониозом, черной ножкой, фузариозом, бактериозами на овощных культурах, розах, гвоздике. Проводят полив под корень 0,2-0,3%-ным раствором, опрыскивание растений – 0,5-1,0%-ным. В личных подсобных хозяйствах применяется для защиты огурца от корневых гнилей путем замачивания семян в 0,2%-ном рабочем растворе в течение 3-6 часов.

Глиокладин. Биопрепарат на основе гриба из рода *Gliocladium*, обладающего сильным антагонистическим действием на фитопатогены. Предназначается для борьбы с корневыми гнилями. Особенно эффективен препарат на огурце.

Алирин, Гамаир. Рекомендуются для широкого применения в открытом и закрытом грунте. Учитывая низкие нормы расхода препарата при обработке семян и при опрыскивании по вегетирующему растениям, удобную препаративную форму, обеспечивающую технологичность внесения, препараты начали пользоваться спросом крупных АО, фермеров,

владельцев личных подсобных хозяйств. Препараты имеются в розничной продаже. Их используют согласно инструкции.

Применение биопрепаратов для борьбы с болезнями отличается от тактики борьбы с вредителями. Их обычно начинают применять профилактически или при первых признаках появления заболевания.

Биоинсектициды на основе грибков

Принцип действия этих препаратов заключается в том, что сначала они парализуют вредителей и их личинки, а затем уничтожают их. Это происходит с помощью веществ, которые выделяет грибок *Streptomyces avermitilis*. На многих сосущих насекомых, в частности клещей и нематод, они действуют губительно. Препараты на основе грибков (авермектины) особенно эффективны на ранних стадиях развития вредителей (гусеницы, личинки).

Название препарата	Против чего применяется
Аверсектин С	Клещи, нематоды, колорадский жук
Авертин-Н	
Вертициллин	Тля и белокрылка
Пециломицин	Нематоды
Метаризин	
Басамил	
Микоафидин	Тля

Недостатки препаратов

- Перед использованием препараты на основе грибков нужно правильно подготовить (строго по инструкции).
- Растения можно обрабатывать только в вечернее время, когда становится прохладно.
- Препараты могут быть губительны для полезных насекомых, например для пчел.
- Хранить препараты следует при температуре 4-6°C в темном месте.

Биопрепараты против болезней могут быть на основе грибков и бактерий.

В состав этих препаратов входят полезные грибки, которые могут проникать в мицелий вредоносных грибков и разрушать его. Благодаря этому развитие грибковой болезни у растений замедляется или вообще прекращается.

Название препарата	Против чего применяется
Ампеломицин	Мучнистая роса
Глиокладин	Гнили (белая, серая, сухая, корневая), а также фитофтороз, вертициллез, гельминтоспороз
Триходермин	
Трихоцин	
Кониотирин	Белая и серая гниль

Недостатки

- Маленький срок годности.
- При хранении в тепле препараты быстро теряют свои свойства.

Биопрепараты на основе бактерий

В эту группу входит целый комплекс различных средств, которые вносят как корневым, так и внекорневым способом. Кроме того, эти препараты могут противостоять грибковым и бактериальным заболеваниям, а некоторые даже защищают растения от вредителей.

Средства, вносимые в почву, угнетают действие патогенных грибков вокруг корней, тем самым создавая на некоторое время безопасную среду для развития растений. Биофунгициды, применяемые при опрыскивании, выделяют антибиотики, уничтожающие патогенные грибки.

Название препарата	Против чего применяется
Алирин-Б	Гнили (серая и белая), мучнистая роса, фитофтора, аскохитоз, альтернариоз
Алирин-С	Корневые гнили
Бактофит	Корневые гнили, пятнистости, мучнистая роса, фузариоз, фитофтора, бурая ржавчина, бактериозы (сосудистый и слизистый).
Планриз	
Псевдобактерин-2	
Гамаир	Бактериальный ожог, пятнистости, некрозы, рак
Фитобактериомицин	Грибковые и бактериальные болезни
Фитолавин	
Фитоспорин-М	Гнили, парша, фузариоз, черная ножка, бурая ржавчина

Недостатки

- Чтобы правильно подобрать препарат, растению нужно поставить точный "диагноз". А сделать это не всегда просто. В то же время, биофунгициды на основе бактерий действуют строго против возбудителей конкретных болезней.

Контрольные вопросы: 1. Дать характеристику биопрепаратов на основе бактерий. 2. Перечислить основные недостатки бактериальных препаратов от вредителей растений. 3. Описать биопрепараты на основе грибков, назвать их недостатки

2.12 Лабораторная работа №12 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за 3 модуль»

2.12.1 Цель работы: Проверить знания студентов по пройденному материалу

2.12.2 Задачи работы: Оценить знания студентов по пройденному материалу.

2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, мультимедиа аппаратура, ампулы с биопрепаратами.

2.12.4 Описание (ход) работы:

Контрольные вопросы:

- Что такое биогаз?

2. Описать технологические стадии получения биогаза.
3. Перечислить области применения биогаза.
4. Дать характеристику биопрепаратов на основе бактерий.
5. Перечислить основные недостатки бактериальных препаратов от вредителей растений.
6. Описать биопрепараты на основе грибков, назвать их недостатки.

2.13 Лабораторная работа №13 (2 часа).

Тема: «Мембранные методы разделения биопрепаратов. Методы высушивания биопрепаратов. Оборудование»

2.13.1 Цель работы: Ознакомиться с мембранными методами разделения и методами для высушивания биопрепаратов.

2.13.2 Задачи работы:

1. Изучить мембранные методы разделения биопрепаратов.
2. Изучить методы высушивания биопрепаратов
3. Изучить оборудование, используемое для высушивания биопрепаратов.

2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ноутбук, мультимедиа аппаратура.

2.13.4 Описание (ход) работы:

К мембранным методам разделения относятся:

1. Диализ и электродиализ.
2. Обратный осмос.
3. Микрофильтрация.
4. Ультрафильтрация.

В основе этих методов лежит явление осмоса - диффузии растворенных веществ через полупроницаемую перегородку, представляющую собой мембрану с большим количеством (до 10^{10} - 10^{11} на 1 м²) мелких отверстий - пор, диаметр которых не превышает 0,5 мкм.

Под мембраной обычно принято понимать высокопористую или беспористую плоскую или трубчатую перегородку, оформленную из полимерных или неорганических материалов и способную эффективно разделять частицы различных видов (ионы, молекулы, макромолекулы и коллоидные частицы), находящиеся в смеси или растворе. Использование мембран позволяет создавать экономически высокоэффективные и малоотходные технологии.

Среди мембранных процессов особенно интенсивно развиваются баромембранные. Если обратный осмос изучен достаточно полно, то существенно в меньшей мере это касается микрофильтрации и тем более ультрафильтрации, несмотря на ее очевидную перспективность. Границы баромембранных методов разделения четко не определены, что, по видимому, принципиально невозможно, поскольку микро- и ультрафильтрация и обратный осмос в широких пределах перекрываются как в отношении их физико-химического описания, так и решаемых задач. Следовательно, приведенная классификация барометрических методов разделения в значительной мере условна. Тем не менее, каждый из указанных методов имеет свои характерные особенности, на основании которых предложено несколько их классификаций.

В биотехнологии применяются различные методы сушки, выбор которых определяется физико-химическими и биологическими свойствами обезвоживаемого продукта, в частности от вязкости раствора или степени сохранности жизнеспособности, если дело имеют с живыми объектами.

Существует несколько методов сушки:

Лиофильный. Он позволяет сохранить практически без изменения первоначальные свойства живых и реже инактивированных вакцин, диагностических и лечебных сывороток, антигенов и других биологически активных препаратов, используемых для профилактики, диагностики и лечения.

Лиофильное высушивание состоит из двух приемов консервирования - замораживания и высушивания. Влагу из замороженных препаратов удаляют с использованием глубокого вакуума, минуя жидкую fazу. В процессе сушки влага перемещается в препарате не в виде жидкости, а в виде пара. В результате удается максимально сохранить специфические свойства белков, свести к минимуму их денатурацию, обеспечить живым клеткам и вирусам состояние длительного анабиоза, что позволяет получить стандартизованные по активности биопрепараты.

Консервирование биопрепаратов методом лиофильного высушивания имеет ряд преимуществ перед другими методами:

- снижается масса биопрепарата.
- длительное время сохраняется исходная активность: вакцин-до 12-18 мес., сывороток - до 2-3 лет.
- прекращается рост микробных контаминаントов.
- высушенные препараты можно хранить при температуре 4-8°C, допускается кратковременное повышение температуры до 10-15°C.

Для лиофилизации биопрепаратов используют промышленные и лабораторные аппараты. Из промышленных установок получили распространение MAC-50, KS-30 (Чехословакия) и TG-50 (Германия), из лабораторных TG-2, TG-10, TG-3 (Германия), OE-960, OE-950 (Венгрия), LZ-45, LZ-90, LZ-92 (Чехословакия) и некоторые др. Эти установки комплектуются холодильными и вакуумными агрегатами.

Перспективным методом является обезвоживание в газообразных нагревающих агентах, которые с высокой скоростью подаются в сушильный аппарат снизу, а частицы обезвоживаемого продукта парят в этом газовом потоке. Схема такого сушильного аппарата напоминает газо-фазный реактор. Преимущество данного способа состоит в возможности регулировать интенсивность массо-тепло-обмена за счет изменения продолжительности пребывания препарата в воздушном потоке, а также возможность организации непрерывного процесса. Недостатком метода является прилипание продукта к стенкам сушильной камеры.

Для обезвоживания микробных взвесей применяются так называемые барабанные сушилки, в которых подогреваемые барабаны врачаются в сосудах с микробной взвесью. Соприкасаясь со стенками барабана, взвесь обезвоживается и биомасса присыхает к поверхности барабана. Засохшую биомассу удаляют специальными ножами.

Особо лабильные материалы сушат в вакуумных сушильных шкафах при пониженных давлениях и температурах. Довольно широкое распространение в биотехнологических производствах получили распылительные сушильные аппараты, в которых обезвоживающиеся растворы или суспензии превращаются путем пропускания через форсунки в аэрозоль, который подается в сушильную камеру с нагретым газом. В таких сушилках выживаемость

бактериальных культур достигает лишь 20-30%, что явно не удовлетворяет требуемому качеству препаратов.

Контрольные вопросы: 1. Перечислить и дать характеристику основным методам мембранныго разделения биопрепаратов. 2. Перечислить и дать характеристику основным методам высушивания биопрепаратов.

2.14 Лабораторная работа №14 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за четвертый модуль».

2.14.1 Цель работы: Проверить знания студентов по пройденному материалу

2.14.2 Задачи работы: Оценить знания студентов по пройденному материалу.

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ноутбук, мультимедиа аппаратура.

2.14.4 Описание (ход) работы:

Контрольные вопросы:

1. Перечислить и дать характеристику основным методам мембранныго разделения биопрепаратов.

2. Перечислить и дать характеристику основным методам высушивания биопрепаратов.