

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра биохимии и микробиологии

О.Я. Соколова, Н.А Боркова

БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

Методические указания

Рекомендовано к изданию редакционно–издательским советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный университет» для обучающихся по образовательной программе высшего образования по специальности 06.05.01 Биотехнология и биоинформатика

Оренбург
2018

УДК 573 (076.5)
ББК 28.07 я 7
С 53

Рецензент – доцент, кандидат медицинских наук О.А. Наumenко

Соколова, О.Я.
С53 Биологическая безопасность: методические указания / О.Я. Соколова, Н.А Боркова; Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург: ОГУ, 2018.

В методических указаниях изложены основные методы определения биологически опасных веществ, методики определения представлены в соответствии с рабочей программой дисциплины «Биологическая безопасность».

Методические указания предназначены для самостоятельной подготовки обучающихся к лабораторным работам по дисциплине «Биологическая безопасность» для студентов очной формы обучения, обучающихся по специальности 06.05.01 Биотехнология и биоинформатика очной формы обучения.

УДК 573 (076.5)
ББК 28.07я7

© Соколова О.Я., 2018
© ОГУ, 2018

Содержание

Введение.....	4
1 Лабораторная работа №1	6
2 Лабораторная работа №2	11
3 Лабораторная работа №3	17
4 Лабораторная работа №4	22
5 Лабораторная работа №5	26
6 Лабораторная работа №6	28
7 Лабораторная работа №7	30
8 Лабораторная работа №8	32
9 Лабораторная работа №9	36
10 Лабораторная работа №10	40
11 Лабораторная работа №11	48
12 Лабораторная работа №12.....	54
13 Лабораторная работа №13	59
14 Лабораторная работа №14	62
15 Лабораторная работа №15	65
Список использованных источников	73

Введение

В настоящее время в силу бурного развития отраслей науки: биологии, биохимии, генетики, микробиологии, физической, коллоидной, аналитической и органической химии - биотехнология приобретает межотраслевое значение. Биотехнологию сегодняшнего дня отличают быстрые темпы развития и успехи как в области изучения традиционных разделов: строения, репликации, транскрипции, трансляции, рекомбинации, репарации генов, мутагенеза и клеточного цикла, так и в технологии получения и манипулирования рекомбинантными молекулами ДНК микроорганизмов, которые являются основным компонентом биотехнологии микробного синтеза в получении биопродукции. Курс «Биотехнология микроорганизмов» ставит целью познакомить студентов: с принципами и особенностями микробиологических процессов, используемых в биотехнологии; с требованиями, предъявляемыми к сырью и микроорганизмам-продуцентам; способами культивирования микроорганизмов; методами выделения и очистки целевых продуктов; конкретными промышленными производствами на основе микробиологического синтеза и трансформации.

Современному специалисту-биотехнологу необходимо владеть комплексом знаний в области химико-биологических наук для целенаправленного внедрения биотехнологии в производство. Настоящие методические указания включают комплекс лабораторных работ с применением традиционных и современных методов анализа. Освоение теоретического материала и выполнение перечня работ в рекомендуемом объеме обеспечит глубокие фундаментальные знания и практический навык при выполнении исследовательских работ и в организации технологических процессов, умение диагностировать превращения пищевых систем и контролировать их глубину и направленность в достижении главной цели производства - удовлетворения физиологических потребностей человека через создание высококачествен-

ных продуктов на основе максимального и рационального использования ресурсов.

1 Лабораторная работа № 1

Тема: Техника безопасности в микробиологической лаборатории

Цель работы: изучение техники безопасности в микробиологической лаборатории и основных правил микроскопирования.

Теоретическое обоснование работы

Техника безопасности в микробиологической лаборатории. При работе в микробиологической лаборатории необходимо соблюдать определенные правила поведения. Занятие начинают со знакомства с инструкцией по технике безопасности. В лабораторию запрещается входить в верхней одежде и класть на столы сумки, портфели и другие личные вещи. В микробиологической лаборатории разрешается работать только в халатах и косынках (шапочках), которые защищают одежду и волосы от контаминации микроорганизмами, а также препятствуют их распространению за пределы лаборатории. За каждым студентом закрепляется постоянное рабочее место и микроскоп. Рабочее место во время занятий должно поддерживаться в полном порядке. На всех пробирках и чашках обязательно пишется название микроорганизма, дата его посева, фамилия студента, номер группы. В ходе работы бактериологические петли и иглы обеззараживаются прокаливанием в пламени горелки до и после отбора микроорганизмов. Приготавливая препарат или производя пересев культур микроорганизмов, выросших в жидкой среде, пользуются не петлей, а пипеткой, в верхний конец которой должен быть вложен кусочек ваты, чтобы не допустить случайного соприкосновения микробного материала с полостью рта. Использованные шпатели, пипетки помещаются в фарфоровые стаканы с дезинфицирующими растворами (1% раствор хлорамина, 3% раствор фенола), спички,

фильтровальную бумагу, отработанные препараты помещают в кристаллизатор. Класть на стол названные предметы категорически запрещается. Все препараты готовят на специальных стеклянных мостиках над кристаллизатором. В случае попадания исследуемого материала или культуры микроорганизмов на руки, стол, халат или обувь необходимо сообщить об этом преподавателю и под его руководством провести дезинфекцию. В лаборатории категорически запрещается принимать пищу. После окончания занятия рабочее место дезинфицируется, использованный материал и другие предметы сдаются лаборанту, моются с мылом руки, помещение проветривают (30-60 мин), облучают УФ - лампами. Результаты исследований протоколируются.

Микроскоп. Изучение морфологии и строения клеток микроорганизмов, величины которых измеряются микрометрами ($1\text{ мкм} = 0,001\text{ мм}$), нанометрами ($1\text{ нм} = 0,001\text{ мкм}$), ангстремами ($1\text{ \AA} = 0,1\text{ нм}$), возможно только с помощью микроскопов. Наиболее распространены и удобны для микробиологических исследований прозрачных объектов в проходящем свете микроскопы МБИ-1, МБР-1, БИОЛАМ 70Р (рабочий), С (студенческий), Д (дорожный). Микроскоп имеет механическую и оптическую части. Механическая часть микроскопа включает штатив с предметным столиком, тубус, макро- и микрометрические винты. Верхняя часть штатива - тубусодержатель - может перемещаться на 50 мм с помощью механизма, приводимого в действие вращением макрометрического и микрометрического винтов, предназначенных для грубой и тонкой фокусировки препарата. При вращении этих винтов по часовой стрелке тубусодержатель микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки - поднимается. В верхней части тубусодержателя находится револьвер, в отверстия которого ввинчиваются объективы и тубус. Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного аппарата, объектива и окуляра. Осветительный аппарат состоит из зеркала и конденсора. Зеркало отражает падающий на него свет и направляет его в конденсор. Одна сторона зеркала плоская, и ее использу-

ют при любом источнике света и при любом увеличении. Другую, вогнутую, сторону зеркала употребляют при малых увеличениях без конденсора. Конденсор, состоящий из нескольких линз, собирает отраженный от зеркала свет в пучок, направляемый непосредственно на плоскость препарата. Под конденсором имеется ирисовая диафрагма и откидная оправа для светофильтра. Ирисовая диафрагма служит для задержания лишних лучей света и позволяет при необходимости уменьшить апертуру конденсора (апертура - это "охват" линзы, она характеризуется количеством лучей, попадающих в линзу). Объектив представляет собой наиболее важную часть микроскопа. Он состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу, которые дают действительное увеличенное обратное изображение. В микроскопах МБР-1, БИОЛАМ используются объективы, дающие увеличение в 8, 40 и 90 раз. Увеличение объектива зависит от фокусного расстояния фронтальной линзы и, следовательно, от ее кривизны. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива. Поэтому, чем большее увеличение дает объектив, тем ниже его следует опускать над плоскостью препарата. При 8х объективе расстояние между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом равно 8,53 мм, при 40х - 0,4 мм, при 90х - 0,1 мм. Изображение, получаемое при помощи линз, обладает рядом недостатков - аберраций. Наиболее существенные - сферическая (каждая точка объекта имеет вид кружочка, а не точки, изображение не резкое, размытое) и хроматическая (получаемое изображение приобретает окраску, которую не имеет объект) аберрации. Объективы, у которых аберрации скорректированы не полностью, называются ахроматами. Они содержат до шести линз и дают изображение наиболее резкое в центре. Более совершенные объективы - апохроматы - могут состоять из 10-12 линз, хроматическая погрешность в них в 10 раз меньше, чем у ахроматов. Планохроматы полностью устраняют искривление поля зрения, их применяют при микрофотографировании. Окуляр служит для рассмотрения изображения объекта, увеличенного с

помощью объектива, и содержит две линзы: глазную (верхнюю) и собирающую (нижнюю). Окуляры могут давать увеличение в 5, 7, 10, 12, 15 и 20 раз, что указано на их оправе. Увеличение, которое дает микроскоп, определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра. Бинокуляры имеют дополнительное увеличение насадки (она предназначена для наблюдения объекта одновременно двумя глазами). Однако общее увеличение еще не характеризует всех возможностей микроскопа. Увеличенное изображение может оказаться как четким, так и нечетким. Отчетливость получаемого изображения определяется разрешающей способностью микроскопа - минимальным расстоянием между двумя точками, когда они еще не сливаются в одну. Чем больше разрешающая способность микроскопа, тем меньшей величины объект можно увидеть. Повысить ее можно двумя путями: либо освещая объект короткими лучами света, например УФ, либо увеличивая показатель преломления среды (n), граничащей с линзой, с тем, чтобы приблизить его к показателю преломления стекла, на котором находится объект (n стекла = 1,5). В целом микроскопический объект может рассматриваться в трех типах системы: сухой - между линзой объектива и объектом находится воздух ($n = 1$); водной - между линзой объектива и объектом находится капля воды ($n = 1,3$) - водная иммерсия; масляной – линза объектива погружается в каплю иммерсионного масла - кедрового, касторового, вазелинового ($n = 1,52$) - масляная иммерсия. При микроскопии в дневное время можно пользоваться естественным светом, однако, чаще прибегают к источникам искусственного света, которые обеспечивают интенсивное регулируемое освещение (осветители типа ОИ - 19, ОИ - 35). При установке света конденсор должен быть поднят до упора, ирисовая диафрагма открыта; настройка освещения производится с объективом малого увеличения (8х). Объектив опускают на расстояние около 0,8 см от предметного стекла и, вращая зеркало, добиваются равномерного и яркого освещения. Яркость освещения следует регулировать только изменением накала лампы осветителя или применением светофильтров. Поло-

жение зеркала, конденсора и диафрагмы осветителя больше не изменять! Диафрагмой конденсора можно пользоваться только для изменения контрастности изображения. На предметный столик помещают препарат, закрепляют его боковыми зажимами и изучают сначала с объективом 8х. Для детального изучения препарата пользуются объективом 40х, осуществляя фокусировку только микровинтом! После просмотра препарата переводят револьвер на увеличение 8х и только после этого снимают препарат с предметного столика. Микроскоп в нерабочем состоянии должен находиться на увеличении 8х!

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Изучить инструкции по технике безопасности для студентов, работающих в лаборатории микробиологии, правила работы при выполнении микробиологического практикума.
2. Познакомиться с оборудованием микробиологической лаборатории.
3. Ознакомиться с различными видами микроскопов и основными правилами микроскопирования.

Контрольные вопросы:

1. Какие основные правила поведения в микробиологической лаборатории?
2. Назовите и охарактеризуйте наиболее распространенные микроскопы.
3. Назовите основные части микроскопа.

2 Лабораторная работа № 2

Тема: Строение микробной клетки

Цель работы: изучить прокариотическую бактериальную клетку и эукариотическую животную клетку.

Теоретическое обоснование работы

Прокариоты и эукариоты. Все живые организмы делятся на две основные группы: прокариоты и эукариоты. В основе этой классификации лежат многочисленные структурные различия, из них наиболее основными являются:

- 1) наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК;
- 2) строение и химический состав клеточной стенки;
- 3) наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических органелл. В прокариотической клетке, например бактериальной, хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме, клетка окружена ригидной клеточной стенкой, в состав которой часто входит пептидогликан, но не хитин или целлюлоза; в клетке нет субклеточных цитоплазматических органелл. В эукариотической клетке имеется ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре; клеточная стенка, если она есть, может содержать хитин или целлюлозу, но не пептидогликан; в цитоплазме содержатся различные субклеточные органеллы (митохондрии, аппарат Гольджи, хлоропласт в клетках растений) (рисунок 2.1).

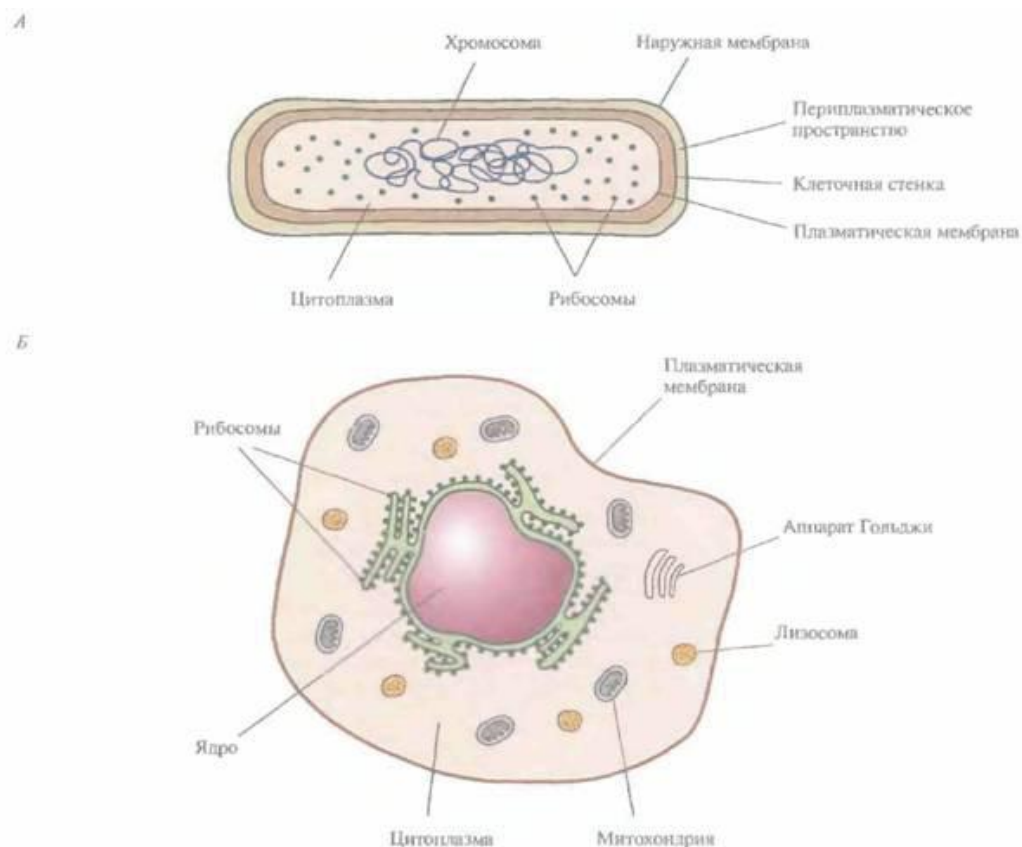


Рисунок 2.1 - Схематическое представление прокариотической бактериальной клетки (А) и эукариотической животной клетки (Б).

Escherichia coli. Бактерия *Escherichia coli* — один из наиболее хорошо изученных организмов. За последние пятьдесят лет удалось получить исчерпывающую информацию о ее генетике, молекулярной биологии, биохимии, физиологии и общей биологии. Это грамотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Ее средой обитания является кишечник человека, но она также может высеваться из почвы и воды. Благодаря способности размножаться простым делением на средах, содержащих только ионы Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} и SO_4^{2-} , микроэлементы и источник углерода (например, глюкозу), *E. coli* стала излюбленным объектом научных исследований. При культивировании *E. coli* на обогащенных жидких питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода, время генерации (т.

е. время между образованием бактерии и ее делением) в логарифмической фазе роста при температуре 37 °С составляет примерно 22 мин.

Для каждого живого организма существует определенный температурный интервал, оптимальный для его роста и размножения. При слишком высоких температурах происходит денатурация белков и разрушение других важных клеточных компонентов, что ведет к гибели клетки. При низких температурах биологические процессы существенно замедляются или останавливаются совсем вследствие структурных изменений, которые претерпевают белковые молекулы. Исходя из температурного режима, который предпочитают те или иные микроорганизмы, их можно подразделить на термофилы (от 45 до 90 °С и выше), мезофилы (от 10 до 47 °С) и психрофилы, или психротрофы (от —5 до 35 °С). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур, могут быть полезным инструментом для решения различных биотехнологических задач. Например, термофилы часто служат источником генов, кодирующих термостабильные ферменты, которые применяются в промышленных или в лабораторных процессах, а генетически видоизмененные психротрофы используют для биodeградации токсичных отходов, содержащихся в почве и воде, при пониженных температурах. *E. coli* можно культивировать как в аэробных (в присутствии кислорода), так и в анаэробных (без кислорода) условиях. Однако для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. coli* и другие микроорганизмы обычно выращивают в аэробных условиях. Если целью культивирования бактерий в лаборатории является синтез и выделение определенного белка, то культуры выращивают на сложных жидких питательных средах в колбах. Для поддержания нужной температуры и обеспечения достаточной аэрации культуральной среды колбы помещают в водяную баню или термостатируемую комнату и непрерывно встряхивают. Такой аэрации достаточно для размножения клеток, но не всегда — для синтеза белка. Рост клеточной массы и продукция белка лимитируются не содержанием в питательной среде источников углерода или

азота, а содержанием растворенного кислорода: при 20 °С оно равно примерно девяти миллионным долям. Это становится особенно важно при промышленном получении рекомбинантных белков с помощью микроорганизмов. Для обеспечения условий, оптимальных для максимальной продукции белков, конструируют специальные ферментеры и создают системы аэрации.

Saccharomyces cerevisiae. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* - это непатогенные одноклеточные микроорганизмы с диаметром клетки примерно 5 мкм, которые во многих отношениях представляют собой эукариотический аналог *E. coli*. Их генетика, молекулярная биология и метаболизм детально изучены. *S. cerevisiae* размножаются почкованием и хорошо растут на такой же простой среде, как и *E. coli*. Их способность к превращению сахара в этанол и углекислый газ издавна использовалась для изготовления алкогольных напитков и хлеба. В настоящее время ежегодно во всем мире расходуется более 1 млн. тонн *S. cerevisiae*. Дрожжи *S. cerevisiae* представляют также большой научный интерес. В частности, они являются наиболее удобной моделью для исследования других эукариот, в том числе человека, поскольку многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления *S. cerevisiae*, сходны с таковыми у человека. Это открытие способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. Широко используемая генетическая система дрожжей (искусственная хромосома) является неизменным участником всех исследований по изучению ДНК человека. В 19% г. была определена полная нуклеотидная последовательность всего набора хромосом *S. cerevisiae*, что еще более повысило ценность этого микроорганизма для научных исследований. Такая работа на эукариотах была выполнена впервые.

Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто приходится подвергать ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения — во многих случаях

это необходимо для правильного функционирования белка. К сожалению, *E. coli* и другие прокариоты не способны осуществлять эти модификации, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *S. cerevisiae*, а также другие виды дрожжей: *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces diastaticus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*. Наиболее эффективными продуцентами полноценных рекомбинантных белков являются *P. pastoris* и *H. polymorpha*.

Культуры эукариотических клеток.

При всех различиях между типами эукариот методические подходы к культивированию клеток насекомых, растений и млекопитающих имеют много общего. Сначала берут небольшой кусочек ткани данного организма и обрабатывают его протеолитическими ферментами, расщепляющими белки межклеточного материала (при работе с растительными клетками добавляют специальные ферменты, разрушающие клеточную стенку). Высвободившиеся клетки помещают в сложную питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозу и факторы роста. В этих условиях клетки делятся до тех пор, пока на стенках емкости с культурой не образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкости со свежей питательной средой, то рост прекратится. Обычно удается переносить (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50-100 клеточных генераций исходной (первичной) клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут. Культивируемые клетки сохраняют некоторые свойства исходного клеточного материала, поэтому их можно использовать для изучения биохимических свойств различных тканей. Часто некоторые клетки перевиваемых первичных клеточных культур претерпевают генетические изменения, в результате которых ускоряется их рост. Культуры клеток, которые при этом

приобретают селективные преимущества, оказываются способными к неограниченному росту *in vitro* и называются устойчивыми клеточными линиями. Одни клеточные линии сохраняют основные биохимические свойства исходных клеток, другие нет. У большинства клеток, способных к неограниченному росту, имеются значительные хромосомные изменения, в частности отмечается увеличение числа одних хромосом и потеря других. В молекулярной биотехнологии устойчивые клеточные линии иногда используют для размножения вирусов и для выявления белков, которые кодируются клонированными последовательностями ДНК. Кроме того, они применяются для крупномасштабного производства вакцин и рекомбинантных белков.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Изучить строение прокариотической бактериальной клетки и эукариотической животной клетки.
2. Сделать сравнительную характеристику прокариотической и эукариотической клеток.
3. Ознакомиться с наиболее хорошо изученными прокариотами и культурами эукариотических клеток.

Контрольные вопросы:

1. Кто такие прокариоты?
2. Кто такие эукариоты?
3. Перечислите основные свойства *Escherichia coli*.
4. Что означает термин «грамотрицательный»?
5. Перечислите основные свойства *S. cerevisiae*.

3 Лабораторная работа № 3

Тема: Изучение роста микроорганизмов

Цель работы: изучить особенности роста и развития микроорганизмов.

Теоретическое обоснование работы

На оптимальной питательной среде при благоприятных значениях pH и температуры, при условии подачи требуемого количества воздуха в среду микроорганизмы быстро начинают расти и размножаться, обеспечивая накопление биомассы продуцента и биологически ценных метаболитов культуральной жидкости. Существуют два способа культивирования микроорганизмов в глубине жидкой среды: периодический и непрерывный. При периодическом способе культивирования питательная среда засеивается исходной культурой продуцента, и далее в этой же емкости микроорганизмы при определенных условиях проходят через все стадии роста и развития популяции. Когда процесс культивирования заканчивается, емкость для выращивания освобождают и цикл возобновляется, начиная от засева стерильной питательной среды исходной культурой продуцента. При таком способе культивирования (его можно назвать «закрытой» системой, когда хотя бы один из компонентов не может поступать в нее или выводиться из нее) скорость роста биомассы всегда должна стремиться к нулю либо из-за недостатка питательных веществ, либо из-за накопления в среде токсических метаболитов. Поскольку при периодическом способе культивирования микроорганизма всегда имеет место некоторая неустойчивость в системе. При непрерывном способе культивирования микроорганизм постоянно по-

лучает приток свежей питательной среды, а из аппарата непрерывно отбирается биомасса вместе с образуемыми метаболитами (такой способ культивирования можно назвать «открытой» системой). При непрерывном культивировании микроорганизмы не должны испытывать недостатка в питательном субстрате, так как скорость его притока сбалансирована со скоростью выхода биомассы, кроме того, культура не отравляется продуктами обмена веществ – в этом большое преимущество непрерывного способа культивирования по сравнению с периодическим, преимущество «открытой» системы перед «закрытой».

Особенности роста и развития микроорганизмов.

При периодическом способе глубинного культивирования популяция микроорганизмов проходит семь стадий (фаз) роста (рис. 2). Иногда кривую роста числа клеток N дают в логарифмической зависимости от времени :

$\lg N = f$ фаза чаще всего называется **лаг-фазой**. В этот период культура как бы адаптируется (привыкает) к новой среде обитания. Активируются ферментные системы клетки, возрастает количество нуклеиновых кислот, клетка готовится к интенсивному синтезу белков и других соединений. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизма, состава посевной и производственной сред и условий культивирования. Чем эти различия меньше и чем больше посевная доза, тем короче фаза роста.

фаза называется **фазой ускорения роста**, она характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы популяции и постоянным увеличением скорости роста культуры; обычно она непродолжительна. фаза – это фаза наиболее активного роста числа клеток, она называется **экспоненциальной (логарифмической) фазой роста**. В этот период отмечается максимальная скорость роста культуры, интервалы между появлением

предыдущего и последующего поколений постоянны. Логарифм числа клеток линейно зависит от времени. В результате интенсивного роста и размножения культуры из питательной среды содей же интенсивностью поглощаются питательные вещества. Среда начинает истощаться вследствие катаболических и анаболических процессов, осуществляемых клетками микроорганизмов, в ней скапливаются продукты жизнедеятельности микроорганизмов, которые могут оказывать угнетающее действие на растущий организм. Возникает и пространственная ограниченность, клетки мешают друг другу, уменьшаются поверхности их контакта со средой, ухудшаются поступление питательных веществ внутрь клетки и выброс продуктов метаболизма. Скорость роста понижается, число делений сокращается, наступает V фаза роста, которую принято называть **фазой замедления**, или **уменьшения скорости роста**. V фаза роста называется **стационарной**. Масса и количество всех живых клеток достигают своего максимума. Количество вновь образовавшихся клеток становится на этом этапе равным количеству клеток, отмерших и автолизовавшихся. В какой-то момент это равновесие нарушается и количество отмерших клеток становится больше вновь образовавшихся, наступает V фаза – **фаза ускорения отмирания**.

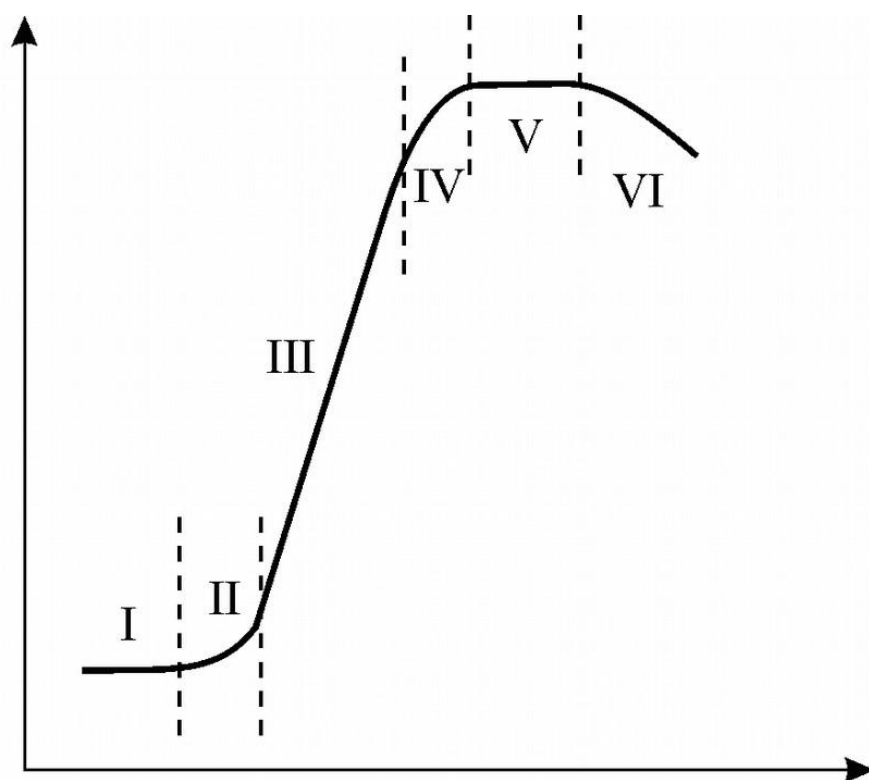


Рисунок 3.1 - Кривая роста микроорганизмов при периодическом культивировании: I – лаг-фаза; II – фаза ускорения роста; III – фаза экспоненциального роста; IV – фаза замедления роста; V – фаза стационарная; VI – фаза отмирания культуры

Завершается цикл роста и развития популяции в замкнутом объеме фазой, характеризующейся отмиранием и автолизом микроорганизмов, которая так и называется фазой отмирания. На этой стадии масса живых клеток значительно уменьшается, так как запасные вещества клетки исчерпываются. Если ставится задача получения при периодическом процессе культивирования биомассы продуцента, рационально вести процесс до момента перехода роста культуры в стационарную фазу. Если же в производстве получают продукт метаболизма, то конец процесса определяется экстремумом в накоплении этого метаболита, он может совпадать с логарифмической фазой, стационарной или с фазой отмирания.

Периодический способ выращивания микроорганизмов-продуцентов белковых веществ – используется только для получения на некоторых эта-

пах посевного материала и при микробиологическом производстве аминокислот. При производстве же белковых веществ и липидов повсеместно применяется непрерывный способ культивирования микроорганизмов. При непрерывном способе выращивания культура поддерживается постоянно в какой-то фазе роста. Если цель производства – получение биомассы продуцента, процесс рационально вести в режиме логарифмической фазы, когда микроорганизм способен обеспечить максимальные скорости роста популяции. Такой процесс можно осуществить в одном аппарате при условии постоянного притока сбалансированной по составу среды и оттока готовой культуры. После установления требуемого режима в начальный момент работы системы на протяжении всего времени последующей работы аппарата параметры процесса сохраняются постоянными. Если же целью культивирования микроорганизмов является получение метаболита, выход которого в среду обитания или накопление его в биомассе продуцента не соответствует логарифмической фазе роста, применяется непрерывный способ выращивания в двух или нескольких последовательно соединенных аппаратах, что позволяет как бы расчленить процесс на несколько стадий. В каждом аппарате параметры процесса будут постоянны, но они будут различаться с переходом от аппарата к аппарату. При этом способе непрерывного культивирования только в первый аппарат подается питательная среда и только из последнего отбирается готовый продукт.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Изучить стадии роста и развития микроорганизмов.
2. В лабораторных условиях пронаблюдать все стадии роста и развития микроорганизмов (бактерии и дрожжи).
3. Сделать сравнительную характеристику особенностей роста и развития дрожжей и бактерий.

Контрольные вопросы:

1. Какие существуют способы культивирования микроорганизмов в глубине жидкой среды?
2. Какие фазы роста проходят микроорганизмы при периодическом способе глубинного культивирования?
3. Охарактеризуйте каждую фазу роста популяции микроорганизмов при глубинном культивировании.

4 Лабораторная работа № 4

Тема: Получение чистой культуры посевного материала

Цель занятия: изучить методику получения чистой культуры посевного материала.

Теоретическое обоснование работы

Посевным материалом называют чистую культуру микроорганизма, которая получается путем ее последовательного пересева из пробирки в колбу, а затем в аппараты увеличивающегося объема, вплоть до большого посевного аппарата, из которого она передается в производство при вводе в работу очередного ферментатора, или в работающий ферментатор для поддержания в нем роста основной культуры продуцента. Приготовление посевного материала производится по стадиям:

- 1 – получение культуры микроорганизма в микробиологической лаборатории;
- 2 – выращивание дрожжей в малом посевном аппарате;
- 3 – выращивание дрожжей в большом посевном аппарате;

4 – накопление культуры микроорганизма в малом ферментаторе (который также называют большим инокулятором);

5 – накопление культуры микроорганизма в промышленном ферментаторе (для заводов большой производительности).

Первая стадия выращивания посевного материала осуществляется в заводской микробиологической лаборатории. При этом ставится задача сохранить исходный штамм в неизменном состоянии. Споры микроорганизмов, которые образованы неполовым путем, представляют собой наилучшую форму сохранения исходной, музейной культуры продуцента биологически активных веществ. Однако при длительном хранении даже совершенно однородных клеток и спор могут возникнуть спонтанные нерегулируемые мутации. Поэтому необходимо не только соблюдать правила хранения и поддержания исходной культуры, но и периодически проводить рассев культуры проверку ее однородности как по морфологическим, так и по физиологическим признакам. При расसेве из колонии, давшей наилучшие показатели на диагностирующей среде, делают новый рассев в 30-40 пробирок. Затем из каждой 5-6 пробирок отбирают одну и проверяют находящийся в ней микроорганизм на способность образовывать то вещество, продуцентом которого он является, например белок или липиды. Проведение такой непрерывной селекции позволяет сохранить в активной форме исходную культуру продуцента. Однородный штамм микроорганизма высевают в пробирки на скошенные агаризованные среды оптимального для каждого штамма состава и выращивают его до определенного возраста в оптимальных условиях. Готовую культуру в пробирках помещают в холодильник и хранят при температуре 3°C -4 °C. Пересевы культур проводят через определенные промежутки времени с таким расчетом, чтобы наилучшим образом сохранить физиолого-биохимические свойства штамма. Длительные промежутки между пересевами недопустимы, так как микроорганизм в процессе роста и хранения потребляет из среды питательные вещества и накапливает продукты обмена, вредно влияющие на его

свойства. При пересевах следует переносить только споры или небольшие кусочки мицелия без питательной среды, чтобы в свежую питательную среду не вносить продукты метаболизма. Для длительного хранения некоторых штаммов целесообразно использовать бедные сахарами крахмальные среды. Более длительное время можно хранить культуру под слоем вазелинового масла. Для этого целесообразно использовать вазелиновое масло медицинского назначения. Оно не должно содержать токсических и окисленных продуктов. Слой масла должен быть на 1 см выше агарового среза. Слишком большой слой масла может повлечь за собой гибель культуры из-за недостатка кислорода. Культуру заливают стерильным маслом после того, как она достигнет полной физиологической зрелости. Для этого способа хранения наилучшей средой считается картофельномальтозный агар. Известны способы хранения культур при температурах 11°C -14 °C. в этих условиях многие культуры полностью сохраняют активность в течение 10-16 мес. Грибные и дрожжеподобные культуры успешно хранят в замороженном состоянии в атмосфере жидкого азота при температурах 165°C - 196 °C. культуры замораживают в 10%-ном водном растворе глицерина и помещают в ампулы, которые запаивают. Ампулы хранят в контейнере с жидким азотом. По данным микробиологов, даже после 5-летнего хранения микроорганизмы сохраняют все физиолого-биохимические свойства. Перспективным следует признать способ хранения культур в лиофилизированном состоянии. Культуру микроорганизма помещают в защитную среду, замораживают и подвергают вакуумной лиофильной сушке. В качестве защитной среды можно использовать сахарожелатинную среду. Клетки микроорганизма помещают в стерильные ампулы, закрывают стерильными ватными тампонами и быстро замораживают при температурах 35°C - 78°C. Затем ампулы переносят в вакуум-сушильный аппарат и высушивают при комнатной температуре и остаточном давлении 1,0 - 10,0 Па в течение 25-30 ч. Лиофильно высушенные культуры могут сохраняться до 5-6 лет без потери способности к быстрому росту и накоплению целевого продук-

та. Этот способ считается наиболее эффективным. Штамм можно хранить длительное время в стерильной почве. Для этого почву стерилизуют и вносят в нее культуру продуцента. При возобновлении культуры смыв с почвы высевают на чашки Петри и выделяют на косой питательный агар. Часто штамм хранят на зерне, например, на пшене. Для этого пшено, очищенное от примесей, кипятят в минимальном количестве воды до полного поглощения влаги (на 1 кг пшена 800 мл воды), распаривают в течение 30 мин, высыпают на чистый стол, разбирают образовавшиеся комки и остывшее пшено по 15-16 г засыпают в стерильные флаконы объемом 250 мл, которые затем стерилизуют при давлении 0,1 МПа в течение 40 мин. На стерильное распаренное пшено наносят 2 мл густой взвеси конидий или 2 мл двухсуточной вегетативной биомассы продуцента, выращенного в колбах на качалках. Культуру продуцента выращивают при периодическом встряхивании при температуре 25 °С -35 °С. Выросшую культуру высушивают в вакууме при температуре 25 °С в течение 60-70 ч до влажности пшена 7%-8 %. Хранящиеся в заводской микробиологической лаборатории чистые культуры микроорганизмов по мере необходимости подаются в производство. Для этого штамм микроорганизма из пробирки переносят в конические колбы с питательной средой, состав которой соответствует составу среды, используемой в производстве. Колбы помещают на качалки в оптимальные условия и контролируют развитие в них микроорганизмов. Затем разводку чистой культуры, находящейся в стадии интенсивного роста, задают в малый посевной аппарат с подготовленной питательной средой (вторая стадия выращивания посевного материала). Третья стадия культивирования посевного материала осуществляется в посевных аппаратах, а четвертая стадия – в ферментаторах. И если предприятие имеет очень большую производительность, то в схему приготовления посевного материала вводится пятая стадия, т.е. еще один ферментатор, в 4-5 раз больший по объему ферментатора четвертой ступени.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Изучить стадии приготовления посевного материала.
2. В условиях заводской микробиологической лаборатории наблюдать все стадии приготовления посевного материала.
3. Занести в тетрадь все данные об условиях культивирования и технологических режимах приготовления посевного материала.

Контрольные вопросы:

1. Сколько существует стадий приготовления посевного материала?
2. Охарактеризуйте каждую стадию приготовления посевного материала.
3. Опишите основные параметры приготовления питательных сред.

5 Лабораторная работа № 5

Тема: Микроорганизмы-продуценты белка

Цель занятия: изучить характеристики основных микроорганизмов-продуцентов белка.

Теоретическое обоснование работы

Микроорганизмы-продуценты белка на гидролизных субстратах. В заводской практике и лабораторных исследованиях различные штаммы видов дрожжей *Candida utilis*, *Candida arborea*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida sottii* и др. нашли широкое применение как продуценты кормового белка при выращивании их на гидролизных субстратах.

Отличительным признаком дрожжеподобных грибов рода *Candida* является их способность к усвоению пентоз. Поэтому началом гидролизно-дрожжевого производства явилось выращивание дрожжеподобного гриба *Candida utilis* (*Monilia murmanica*), выделенного в 1935 г. Плевако, на гидролизатах растительного сырья, содержащих одни пентозы. Далее было доказано, что дрожжи, размножающиеся в гидролизной и послеспиртовой барде, различаются по скорости размножения, выходу биомассы и устойчивости к примесям, подавляющим их развитие в этих средах. Выход биомассы (в % от суммы редуцирующих веществ) при культивировании разных дрожжей колеблется от 16 до 58 %. Микроорганизмы-продуценты белка на негидролизованном полисахаридном сырье. Микроорганизмы-продуценты белка, усваивающие в качестве источника питания и энергии целлюлозу и гемицеллюлозы, должны обладать активным комплексом целлюлолитических и гемицеллюлазных ферментов. Среди возможных продуцентов белка на целлюлозосодержащем сырье имеются представители как грибов, так и бактерий, особенно бактерии родов *Cellulomonas*, *Alcaligenes*. Например, бактерии *Cellulomonas cartaluticum*, ассимилируя целлюлозу сточных вод бумажных производств, накапливают обильную биомассу. При этом выход биомассы на негидролизованной целлюлозе или целлюлозе, обработанной в мягких условиях щелочью, значительно выше, чем на сахаросодержащих растворах. Среди дрожжей встречаются очень мало видов, способных утилизировать негидролизованные полисахариды, например дрожжи *Trichosporon cutaneum* и *Tr. pullulans*, выделенные с листьев и стеблей ревеня. Для повышения выхода и улучшения качества белковых препаратов рекомендуется совместное культивирование нескольких микроорганизмов. Примером таких смешанных культур может служить симбиотическое выращивание *Cellulomonas* и *Alcaligenes faecalis*.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Ознакомиться с основными микроорганизмами-продуцентами белка на различных видах субстратов.
2. Изучить основной химический состав перечисленных сред для культивирования микроорганизмов-продуцентов белка.
3. Занести в тетрадь данные об условиях роста и развития и технологических режимах культивирования микроорганизмов-продуцентов белка.

Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы-продуценты белка культивируют на гидролизных субстратах?
2. Какие микроорганизмы-продуценты белка культивируют на негидролизованном полисахаридном сырье?
3. Какие микроорганизмы-продуценты белка культивируют на молочной сыворотке?

6 Лабораторная работа № 6

Тема: Микроорганизмы-продуценты белка на углеводородном сырье

Цель занятия: изучить основные микроорганизмы-продуценты белка, культивируемые на углеводородном сырье.

Теоретическое обоснование работы

Дрожжи, способные потреблять углеводороды, широко распространены не только в почвах нефтепромысловых районов, на участках вблизи бензиновых колонок и т.д., но и в полевых и огородных почвах, почвах гористых местностей, в речной и озерной воде и др.; причем дрожжей, потребляющих углеводород, в почвах, где нет углеводородов, содержится не меньше, чем в почвах, загрязненных нефтью. Однако, наибольшей способностью потреблять углеводороды обладают штаммы, которые выделены из загрязненных нефтью и нефтепродуктами почв, воды и других субстратов. Наибольшей способностью утилизировать углеводороды обладают аспорогенные дрожжи семейства *Cryptococcaceae*, особенно дрожжи рода *Candida*. Из них наиболее часто используются в промышленности представители видов *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *C. robusta*, *C. pelliculosa*, *C. scottii*, *C. rugosa*.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Ознакомиться с основными микроорганизмами-продуцентами белка на различных видах субстратов.
2. Изучить основной химический состав перечисленных сред для культивирования микроорганизмов-продуцентов белка.
3. Занести в тетрадь данные об условиях роста и развития и технологических режимах культивирования микроорганизмов-продуцентов белка.

Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы-продуценты белка культивируют на жидких углеводородах нефти?

2. Какие микроорганизмы-продуценты белка культивируют на газообразных углеводородах?

3. Какие микроорганизмы-продуценты белка культивируют на этиловом и метиловом спиртах?

7 Лабораторная работа № 7

Тема: Микроорганизмы-продуценты липидов и жирных кислот

Цель занятия: изучить основные микроорганизмы-продуценты белка, культивируемые на углеводородном сырье.

Теоретическое обоснование работы

Для промышленного использования важное значение имеет способность усиленно накапливать липиды. Этой способностью обладают немногие микроорганизмы, в первую очередь дрожжи. Процесс образования липидов у большинства дрожжей состоит из двух четко разграниченных стадий: - первая характеризуется быстрым образованием белка в условиях усиленного снабжения культуры азотом и сопровождается медленным накоплением липидов (в основном глицерофосфатов и нейтральных жиров); - вторая - прекращением роста дрожжей и усиленным накоплением липидов (в основном нейтральных). Типичными липидообразователями являются дрожжи *Cryptococcus terricolus*. Они могут синтезировать большое количество липидов (до 60% от сухой массы) в любых условиях, даже наиболее благоприятных для синтеза белка.

Из других липидообразующих дрожжей промышленный интерес представляют дрожжи *S. guilliermondii*, утилизирующие алканы. Они синтезируют в основном фосфолипиды. Накапливают большие количества липи-

дов и активно развиваются на углеводных субстратах (на мелассе, гидролизатах торфа и древесины) также дрожжи видов *Lipomyces lipoferus* и *Rhodotorula gracilis*. У этих видов дрожжей липогенез сильно зависит от условий культивирования. Эти продуценты накапливают значительные количества (до 70%) триацилглицеридов. Микроскопические грибы пока не получили большого распространения в получении липидов, хотя жир грибов по своему составу близок к растительному. Выход жиров у *Asp.terreus*, например, на углеводных средах достигает 51% от абсолютно сухого веса (АСВ). Липидный состав грибов представлен в основном нейтральными жирами и фосфолипидами. Липиды, синтезируемые бактериями, своеобразны по своему составу, так как включают в основном сложные липиды, тогда как нейтральные жиры составляют незначительную часть биомассы. При этом бактерии производят разнообразные жирные кислоты (содержащие от 10 до 20 атомов углерода), что важно для промышленного получения специфических жирных кислот. Водоросли перспективны для культивирования в качестве липидообразователей, так как не нуждаются в органическом источнике углерода. Химический состав (соотношение белков и жиров) водорослей также сильно варьирует в зависимости от содержания в среде азота. Недостатки - малая скорость роста и накопление токсических соединений в клетках, ограничивают промышленное применение. Итак, основную роль в процессе биосинтеза липидов играют различные штаммы дрожжей. Они используют те же источники сырья, что и для получения кормового белка, причем от ценности углеродного питания зависят выход биомассы, количество и состав синтезируемых липидов. Для обеспечения направленного биосинтеза липидов в питательной среде употребляются легкоассимилируемые источники азота.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Ознакомиться с основными микроорганизмами-продуцентами липидов и жирных кислот.
2. Изучить основной химический состав питательных сред для культивирования микроорганизмов-продуцентов липидов и жирных кислот.
3. Занести в тетрадь данные об условиях роста и развития и технологических режимах культивирования микроорганизмов-продуцентов липидов и жирных кислот.

Контрольные вопросы:

1. На каких средах культивируют микроорганизмы-продуценты липидов и жирных кислот?
2. Какие дрожжи являются продуцентами липидов и жирных кислот?
3. Какие бактерии являются продуцентами липидов и жирных кислот?
4. Какие микроскопические грибы и водоросли являются продуцентами липидов и жирных кислот?

8 Лабораторная работа № 8

Тема: Технология производства ферментных препаратов

Цель занятия: изучить технологические этапы получения микробных ферментов.

Теоретическое обоснование работы

Производство ферментных препаратов осуществляется двумя способами – поверхностным и глубинным. Поверхностный способ в основном применяется для культивирования микроскопических грибов. В его основе лежит выращивание микроорганизмов на твёрдых (реже жидких), рыхлых питательных средах. При глубинном культивировании микроорганизмы выращивают в толще жидких питательных сред. В этих условиях можно культивировать как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы.

Поверхностный способ культивирования

Подготовка твёрдой питательной среды состоит в том, что субстраты (пшеничные отруби, солодовые ростки, опилки и др.), как правило, смешивают в стерилизаторе и полученную смесь перед стерилизацией увлажняют до 20%-40% влажности. После стерилизации и охлаждения в питательную среду вносят посевной материал и стерильную воду с таким расчётом, чтобы конечная влажность среды была 58% - 60%. Среду раскладывают в кюветы слоем 2-3 см и выдерживают при 28°C -32 °C в течение 22-40 часов. Разные виды микроорганизмов культивируют при строго определённой температуре, влажности, аэрации. В процессе роста микроскопические грибы потребляют 25% - 35% сухих веществ среды и в окружающую среду выделяется большое количество тепла и углекислого газа, для отвода которых проводят интенсивное вентилирование растительных камер кондиционированным воздухом. Продукт грибковой переработки среды представляет собой брикет влажностью от 35% до 58%, в котором частицы питательной среды связаны мицелием. Это неустойчивый продукт, в нём ферменты могут полностью инактивироваться в течение 3 часов. Для сохранения культуры в активном состоянии в течение длительного времени её высушивают до влажности 10% - 13%. Основным условием высушивания явля-

ется максимальное сокращение длительности пребывания культуры гриба в сушилке до 5-8 минут при температуре продукта на выходе не выше 40°C - 42 °C.

При глубинном способе культивирования.

При глубинном способе культивирования состав питательных сред подбирают в зависимости от физиолого-биохимических особенностей микроорганизма-продуцента и того фермента или ферментного комплекса, который необходимо получить в промышленных условиях. После культивирования микроорганизма в ферментаторах для получения очищенных ферментных препаратов проводят отделение биомассы от культуральной жидкости, экстракцию ферментов из культуры, концентрирование культуральной жидкости, стандартизация ферментных препаратов, их сушка. Технологическую схему получения кристаллических ферментов можно проиллюстрировать на примере выделения -амилазы *Asp.oryzae*. Очищенные ферментные препараты получают из водных растворов ферментов. Для очистки от балластных веществ применяют различные методы: диализ, осаждение органическими растворителями и нейтральными солями, извлечение ферментов из сложных комплексов методом их иммобилизации. Для получения технических форм препаратов культуру продуцентов освобождают от нерастворимых балластных веществ – остатков твёрдой питательной среды и мицелия. Так как ферменты относятся к водорастворимым белкам, то лучший экстрагент для них – вода. Для извлечения эндоферментов клеточные стенки микроорганизмов подвергают механическому или литическому разрушению. Термостабильность ферментов вынуждает проводить процесс экстракции при температуре 27°C -30°C, что увеличивает длительность и часто приводит к инфицированию культуры и инаktivации ферментов. Растворимые вещества, переходящие в экстракт, на 50% состо-

ят из азотистых соединений, из которых только 0,5% составляют ферменты.

Полученную диффузионную вытяжку направляют на вакуум-выпарную установку, где концентрация сухих веществ повышается до 50%. Температура обработки должна быть не выше 30°C -32 °C. Полученный препарат в виде сиропа стандартизуют поваренной солью, так как содержание сухих веществ должно быть примерно 50%. Это и есть технический ферментный препарат, который в дальнейшем можно высушить в распылительной сушилке. Для получения очищенных ферментных препаратов из технического препарата проводят выделение ферментов из водных растворов органическими растворителями (риванолом, ацетоном, этанолом и др.) после предварительного высаливания насыщенным раствором сульфата аммония. Переосаждение проводят неоднократно (до 4 раз), до получения необходимой чистоты препарата. Способ выделения ферментов из водных растворов органическими растворителями является более эффективным по сравнению с высаливанием, так как он менее сложен, а растворители легко удалить перегонкой. Чтобы сократить потери ферментов при смешивании экстракта с растворителем, осаждение проводят при пониженной температуре. Например, этанол охлаждают до минус 5°C -8 °C, а водную вытяжку ферментов – до 5°C -6 °C. После перемешивания этанола с вытяжкой осадок фермента отделяют центрифугированием и направляют на сублимационную сушку. Технология выделения ферментов для каждого из них имеет свои особенности в температурном режиме, объеме экстракта и других показателях. Выделение препаратов с помощью органических растворителей в ряде случаев позволяет фракционировать (разделять) комплекс образовавшихся ферментов. Из таких высокоочищенных препаратов можно получать кристаллические ферменты.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Изучить способы культивирования при получении ферментных препаратов.

2. В лабораторных условиях пронаблюдать стадии роста и развития микроорганизмов-продуцентов ферментов методом поверхностного культивирования. 3. Определить преимущества и недостатки поверхностного и глубинного способов культивирования и внести данные в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. Назовите преимущества микробиологического синтеза ферментов.
2. Где используются ферменты?
3. Методы культивирования продуцентов ферментов.
4. Что является основой поверхностного метода культивирования?
5. Назовите органические и неорганические носители при иммобилизации.
6. Методы иммобилизации ферментов

9 Лабораторная работа № 9

Тема: Биосинтез лизина в микробной клетке

Цель занятия: изучить процессы образования лизина в микробной клетке.

Теоретическое обоснование работы

Еще 50 лет назад ученые Осборн и Мендель доказали, что в белке пшеницы мало лизина. В настоящее время установлено, что лизин в организме является не только структурным элементом белка, но и выполняет ряд важных биохимических функций — является предшественником карнитина и оксилизина, способствует транспорту кальция и стронция в клетки и др. В настоящее время во многих странах препарат лизина добавляют к хлебу для повышения его биологической ценности, а также для улучшения внешнего вида. Доказано, что лизин улучшает аппетит, способствует секреции пищеварительных ферментов, предотвращает кариес зубов у детей. Лизин является самой дефицитной в кормах животных незаменимой аминокислотой. Установлено, что добавка лизина в количестве 0,1-0,4 % к кормам значительно увеличивает продуктивность домашних животных. Для биосинтеза лизина используют гомосериндефицитные мутанты ауксотрофных бактерий родов *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* и др. Клетки имеют максимальную длину в логарифмической фазе роста. У быстрорастущих клеток хорошо выражен рибосомальный белоксинтезирующий аппарат, а у медленно растущих, но интенсивно синтезирующих мембранная система. У клеток, интенсивно синтезирующих лизин, активность проявляют и ферменты цикла Кребса, многие из которых связаны с мембранами. Продуценты лизина культивируются на средах, содержащих углеводы или уксусную кислоту, источники азота и кислород. В клетках бактерий лизин синтезируется из пировиноградной, аспарагиновой и янтарной кислот по схеме, показанной на рисунке 9.1.

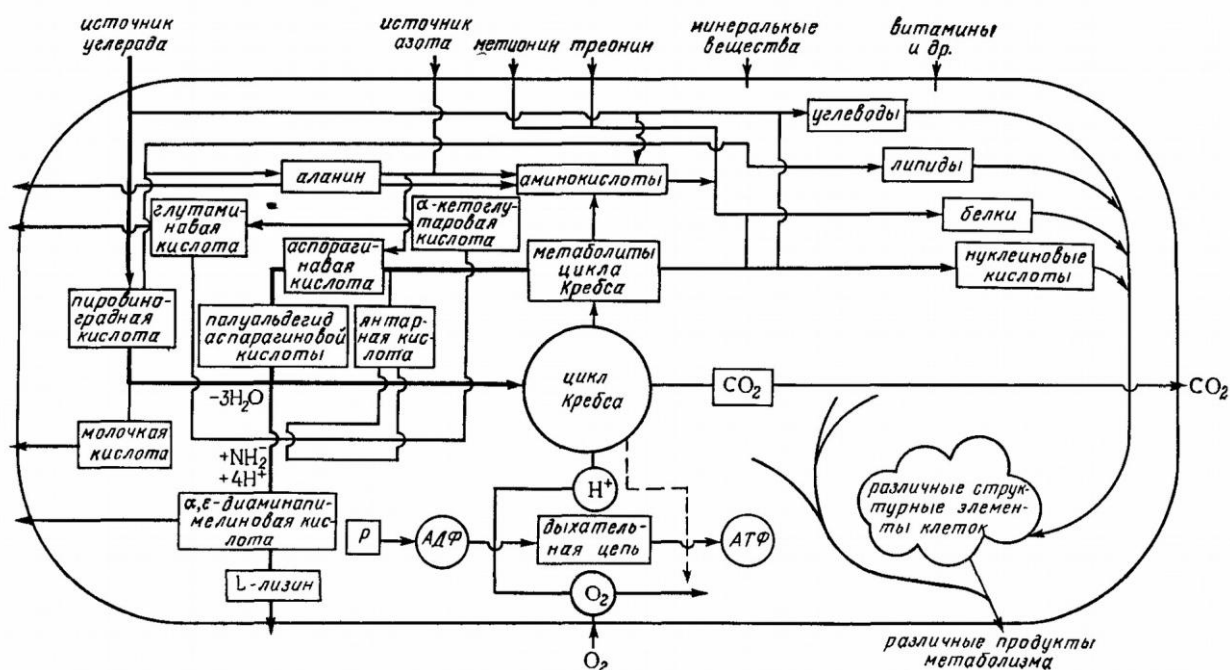


Рисунок 9.1 - Модель клетки – продуцента лизина

Химизм образования молекулы лизина показан на рис. 9.2. При получении лизина необходимо исключить нежелательные побочные процессы. Так, при недостаточной аэрации может идти образование аланина или молочной кислоты вместо синтеза лизина. Очень важным фактором является концентрация дефицитных гомосерина, метионина и треонина в среде. Для нормального роста и биосинтеза лизина культурой *Brevibacterium* sp. 22 оптимальной считается концентрация треонина в 800 мг, метионина 200 мг на литр питательной среды. Кроме того, для развития культуры необходим тиамин в концентрации 200 мкг на 1 л среды. Важным регулятором процесса является биотин. Одна и та же культура *Brevibacterium* sp. 22 при концентрации биотина в среде, равной 1-4 мкг/л, продуцирует глутаминовую кислоту, а при концентрации 15-20 мкг/л - лизин. Считают, что биотин изменяет проницаемость клеточной оболочки. При концентрации биотина 2,5 мг/л стимулируется также образование молочной кислоты.

Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы используют для биосинтеза лизина?
2. Как называется путь образования лизина в клетках дрожжей, актиномицетов и некоторых водорослей?
3. Как называется путь образования лизина в бактериальных клетках?

10 Лабораторная работа № 10

Тема: Химизм образования пищевых органических кислот

Цель занятия: изучить особенности получения уксусной, молочной, лимонной и пропионовой кислот микробиологическими методами.

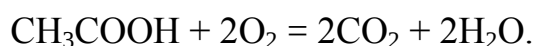
Уксусная кислота и уксус

Уксусом называется 5% - 9 %-ный раствор уксусной кислоты CH_3COOH в воде. Он был обнаружен в кислом вине раньше, чем уксусная кислота. Позже уксус начали получать, сбраживая спиртовой раствор при помощи особых уксуснокислых бактерий (*Bacterium schutzenbachii*, *Bact. curvum*). В результате перегонки перебродившего раствора получают 70%-80 %-ный раствор уксусной кислоты — уксусную эссенцию. Концентрация безводной или ледяной уксусной кислоты 99,8 %. Уксусную кислоту используют как в пищевой промышленности, так и для растворения органических красителей, получения медикаментов, пластмасс, синтетических волокон, в микробиологическом синтезе как источник углерода и др. Для полученного микробиологическим путем уксуса характерны приятный аромат и вкус за счет образования в процессе брожения небольших количеств эфиров, например этилацетата, а также спиртов и кислот. Уксуснокислые

бактерии принадлежат к роду *Acetobacter*. Это длиной в 0,5-8,0 мкм грамотрицательные, образующие споры палочки со жгутиками. Реакцию образования уксусной кислоты катализирует фермент алкогольоксидаза. Уравнение реакции имеет вид:



Для этого процесса оптимальны реакция среды pH 3,0 и температура 28 °С для культуры *Bact. schutzenbachii*, для культуры *Bact. curvum* – 35°С - 37 °С. Концентрация спирта в среде 715 %, конечная концентрация кислоты 8-14 % (в среднем 10%). Если в процессе брожения в среде кончается спирт, происходит окисление уксусной кислоты:



Необходимо следить за тем, чтобы в конце процесса в среде содержалось 0,3% -0,5 % неиспользованного спирта. Во время брожения необходимо обеспечить хорошую аэрацию теоретически на 46 частей по массе спирта необходимы 32 части кислорода. В промышленности уксуснокислородное брожение ведут в вертикальных генераторах по непрерывному методу. Генераторы заполняют специальной стружкой или другим наполнителем с большой площадью поверхности, например древесным углем, коксом и др. Раствор спирта подают в генератор сверху, воздух снизу встречным потоком. Находящиеся на поверхности стружек бактерии окисляют спирт до уксусной кислоты. Обычно диаметр генератора 1-3 м, высота 2,5-6 м. Генераторы делают из дерева, керамики или нержавеющей стали, стекла или железобетона, выложенного внутри керамическими плитками. При пуске генератор наполняют стружкой, подкисляя ее при помощи уксуса до тех пор, пока вытекающий из генератора уксус имеет ту же концентрацию, что и исходный раствор. Это длится примерно 8-10 сут. Затем начинается ос-

новной процесс ферментации. Для этого готовят среду, содержащую 6% уксуса, и добавляют 3 %-ный раствор спирта. Кроме того, в среду вносят определенное количество фосфатов калия и сульфат аммония. Среду равномерно разливают в верхней части генератора и дают свободно стекать по стружкам. После стабилизации процесса каждый день в генератор добавляют среду в количестве 16% -20 % объема находящейся в нем жидкости. Без смены стружек процесс может длиться несколько лет. Производительность генератора 2,9 кг 100 % уксусной кислоты на 1 м³ стружек за сутки. Теоретически из 100 л безводного спирта можно получить 103 кг уксусной кислоты, практически получают 75-93 кг уксусной кислоты, так как имеют место потери вследствие переокисления, неполного окисления спирта, а также испарения. В настоящее время широко используют метод рециркуляции, по которому вытекающий раствор многократно возвращают в генератор.

Молочная кислота

На субстратах, содержащих углеводы, многие молочнокислые бактерии продуцируют молочную кислоту $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$. Чаще всего они встречаются в молочных продуктах, на их деятельности основано получение простокваши, сметаны и других кисломолочных продуктов. Молочно-кислые бактерии находятся и на зерне, поэтому ржаной хлеб можно получить после естественного брожения теста. В промышленности молочную кислоту получают, используя *Bacterium delbrückii* (синоним *Lactobacillus delbrückii*), которые принадлежат к термофильным бактериям с оптимумом температуры развития 45°C -50 °C. В микроскопе они видны в виде длинных палочек. Молочную кислоту широко используют в химической (получение пластмасс, красителей, чернил, лаков), фармацевтической и пищевой промышленности. Ферментные системы молочнокислых бактерий превращают глюкозу в молочную кислоту согласно уравнению:



Вначале имеет место гликолиз, затем пировиноградная кислота восстанавливается под влиянием фермента лактатдегидрогеназы (рис. 10.1). Молочную кислоту в промышленных условиях получают методом анаэробной глубинной ферментации. В качестве основного сырья используют мелассу, сахарозу, гидролизаты крахмала. Концентрация сахара в среде 5% - 20 %, температура 48°С -50 °С, рН 6,3-6,5. Во время ферментации рН среды поддерживают при помощи мела, который добавляют 3-4 раза в сутки. На процесс молочнокислого брожения положительное влияние оказывают биологически активные вещества. С этой целью к среде добавляют вытяжку солодовых ростков. Продолжительность ферментации 7-11 сут. По окончании ферментации в среде остается 0,5% -0,1 % сахара и 11% —14% лактата кальция. Осадок мела и коллоиды отделяют фильтрованием или отстаиванием при 80°С -90 °С. Фильтрат упаривают до концентрации 27% - 30 %, затем охлаждают до 25°С -30 °С и выдерживают в кристаллизаторах 36-48 ч. Кристаллы лактата отцентрифугировывают (выход их составляет 50% -55 %). Осуществляя кристаллизацию из слабых растворов, удастся увеличить выход кристаллов до 95 %. В последнее время разработаны приемы непрерывной кристаллизации лактата.

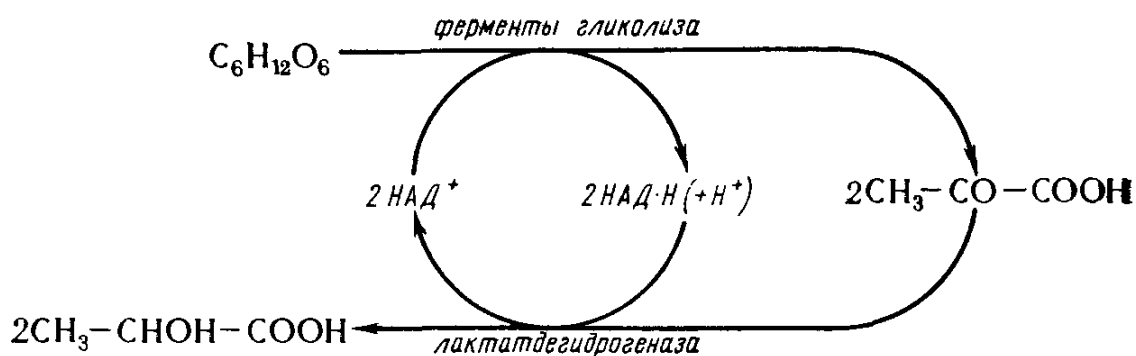
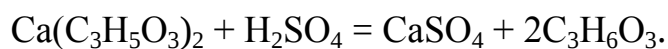


Рисунок 10.1 – Схема образования молочной кислоты

Молочную кислоту из лактата получают при помощи серной кислоты. Реакция идет при 60°C -70 °C в соответствии с уравнением:



Для, отделения ионов железа сырец молочной кислоты при температуре 65 °C обрабатывают желтой кровяной солью (выпадает берлинская лазурь). Тяжелые металлы осаждают сульфатом натрия. Для адсорбции красящих веществ используют активированный уголь и затем проводят концентрирование массы до 50% или 80% в вакуум-аппаратах при давлении 800-920 кПа. Молочную кислоту дополнительно обрабатывают еще раз активным углем, фильтруют и фасуют.

Пропионовая кислота

Пропионовую кислоту $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$ продуцируют пропионово-кислые бактерии. В производстве сыра они способствуют образованию специфического вкуса. Пропионовую кислоту как растворитель используют в производстве душистых веществ. В химико-фармацевтической промышленности она используется в качестве сырья. Для промышленного получения пропионовой кислоты используют различные культуры бактерий, например *Propionibacterium freudenreichii*, *P. shermanii*, *P. rubrum* и др. Это грамположительные факультативно анаэробные бактерии, не образующие споры. Бактерии этой группы являются активными продуцентами витамина B12.

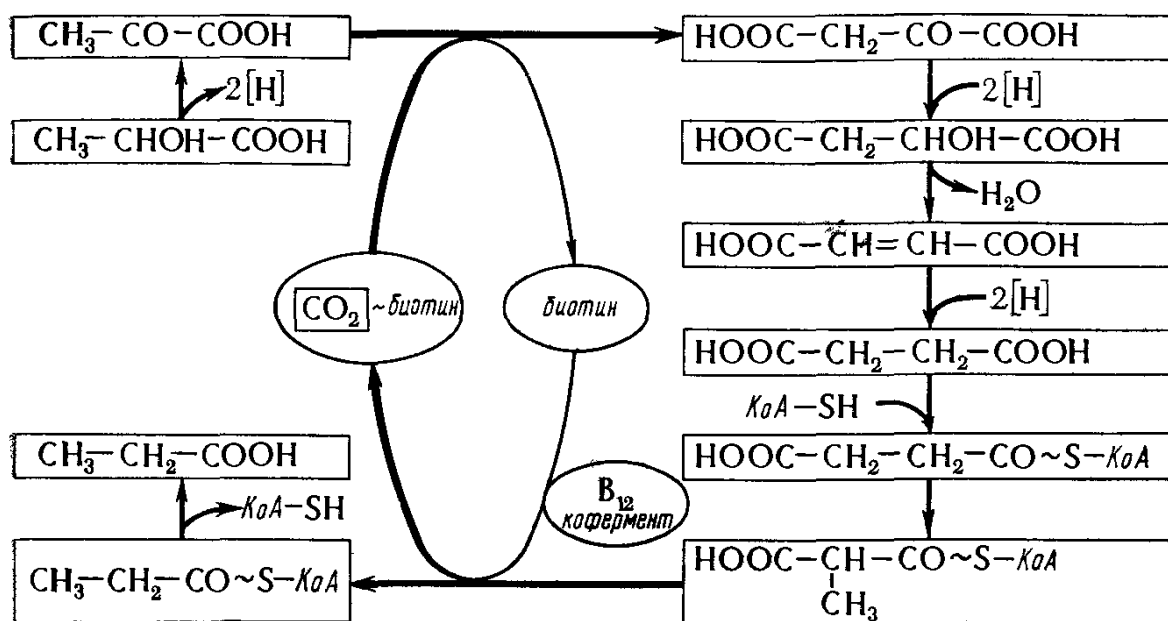


Рисунок 10.2 – Схема образования пропионовой кислоты

Пропионовую кислоту получают в анаэробных условиях методом глубинного культивирования (рис.10.2). Используют среду, содержащую 2% глюкозы и источник органического азота, как, например, дрожжевой экстракт, а также соли молочной кислоты. Процесс идет в нейтральной среде (рН 6,8-7,2), при температуре 30 °С, длится 7-12 сут. В процессе брожения накапливается пропионовая, уксусная кислоты (5:1) и выделяется углекислый газ. Примерно 75% сахара потребляется на образование кислот, а 20% - на образование углекислого газа.

Лимонная кислота

Лимонная кислота $\text{CH}_2\text{COOH-CO-COOH-CH}_2\text{COOH}$ широко распространена в фруктах - смородине, клюкве, лимонах и т. д. В Италии и Испании лимонную кислоту еще до сих пор получают из лимонов. Ее широко используют в пищевой промышленности для производства напитков и кондитерских изделий, в химической промышленности для приготовления светочувствительных фотоэмульсий, для окраски волокон, в медицине и т. д.

Лимонную кислоту микробиологическим методом получают, используя главным образом микроскопические плесневые грибы *Aspergillus niger*, выращиваемые методом поверхностного культивирования. *Aspergillus niger* размножается как вегетативно, так и при помощи спор, которые образуются на конце выростов конидиеносцев-стеригм в виде прямых цепочек. Конидиеносцы *Aspergillus* образуются из вегетативных клеток мицелия в виде прямых вертикальных, неразветвленных гиф, имеющих на конце пузырек. Попадая в питательную среду, спора набухает, прорастает и образует вырост - гиф, который продолжает расти, разветвляться, переплетаться, образуя мицелий. Диаметр гифов грибов 1-20 мкм. Оторванные от мицелия частицы гифов продолжают расти самостоятельно, вегетативно образуя новый мицелий. Раньше для получения лимонной кислоты главным исходным веществом была сахароза. В настоящее время лимонную кислоту получают из отходов промышленных производств, например, мелассы. Химизм процесса образования лимонной кислоты связан с реакциями цикла Кребса (рис. 10.3).

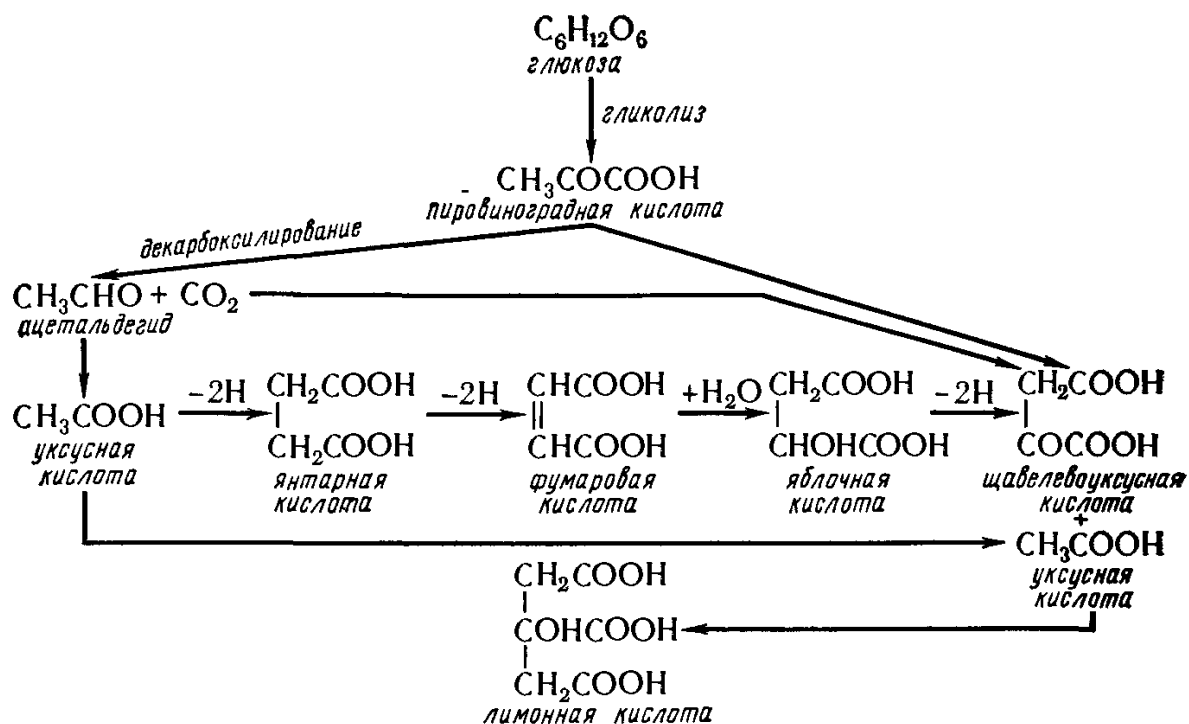


Рисунок 10.3 - Схема образования лимонной кислоты

Из схемы видно, что лимонная кислота образуется из уксусной и щавелевоуксусной кислот.

Экспериментально из потребленного сахара получают 98% лимонной кислоты, однако на практике выход продукта меньше, так как всегда имеют место различные побочные процессы. В культуральной жидкости можно обнаружить не только кислоты цикла Кребса — аконитовую, янтарную, фумаровую и яблочную, но иногда до 0,5% глюконовой, сахарной, щавелевой и малоновой кислот.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Ознакомиться с характеристикой органических кислот и микроорганизмами, используемыми при их производстве.
2. Изучить особенности биосинтеза каждой рассматриваемой органической кислоты.
3. На основании лекционного и лабораторного материала сделать сравнительный анализ особенностей химических процессов, происходящих при получении молочной, лимонной, уксусной и пропионовой кислот. Свести данные в таблицу.

Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы используют при получении молочной, лимонной, уксусной и пропионовой кислот?
2. В производстве каких продуктов используются получаемые микробным синтезом органические кислоты?
3. Какие основные химические процессы используются при получении молочной, лимонной, уксусной и пропионовой кислот?

11 Лабораторная работа № 11

Тема: Технология получения наиболее распространенных антибиотиков

Цель занятия: изучить технологию получения антибиотиков микробиологическим методом.

Теоретическое обоснование работы

Антибиотики - самый большой класс фармацевтических соединений, синтез которых осуществляется микробными клетками. Антибиотики (anti-против, bios-жизнь) - специфические продукты жизнедеятельности микроорганизмов, обладающие противомикробным действием. Некоторые антибиотики губительно действуют на гельминтов и простейших. Синтез микроорганизмами антибиотиков - одна из форм проявления микробного антагонизма, которое связано с определенным характером обмена веществ микроорганизма, возникшим и закрепленным в ходе его эволюции, т.е. это наследственная особенность, выражающаяся в образовании одного, строго специфичного для каждого вида антибиотического вещества. Воздействуя на постороннюю микробную клетку, антибиотик вызывает значительные нарушения в ее развитии. Некоторые из антибиотиков способны подавлять синтез оболочки бактериальной клетки в период размножения, другие воздействуют на ее цитоплазматическую мембрану, изменяя проницаемость, часть из них является ингибитором обмена веществ. В настоящее время известно более 6000 антибиотиков, продуцируемых плесневыми грибами, актиномицетами и др. микроорганизмами. Однако в медицинской практике используют лишь несколько десятков антибиотиков (табл. 11.1). По биологическому воздействию антибиотики делятся на антибактериальные (пени-

циллин, эритромицин", тетрациклин и т.д), антифунгицидные (нистатин, леворин и т. д.) и антираковые (митомицин, актиномицин и т.д.). Шесть родов плесневых грибов производят более 1000 различных антибиотиков, два рода бактерий синтезируют около 500 антибиотиков, три рода актиномицет - около 3000 антибиотиков. Среди актиномицетов наибольший вклад вносит род *Streptomyces* (один вид *St.griseus* синтезирует более 50 антибиотиков). В период с 40-х по 70-е годы количество ежегодно открываемых антибиотиков возросло до 200. К 1978 г. из 5500 известных антибиотиков использовалось около 100. Наиболее распространенными с коммерческой точки зрения оказались пенициллины, цефалоспорины и тетрациклины. В 2000 г. мировое производство антибиотиков составляло 25000 т, из них 17000 т - пенициллины, 5000 т - цефалоспорины.

Таблица 11. 1 – Наиболее широко применяемые антибиотики

Антибиотики	Продуцент	Объект воздействия (бактерии)	Механизм действия
Пенициллин	<i>Penicillium</i>	Грамположительные	Подавляет образование клеточной стенки
Цефалоспорин	<i>Cephalosporium</i>	Грамположительные и грамотрицательные	То же
Эритромицин	<i>Streptomyces erythreus</i>	Грамположительные	Подавляет функции рибосом
Стрептомицин	<i>Streptomyces griseus</i>	Грамположительные и грамотрицательные	То же
Тетрациклин	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Грамположительные и грамотрицательные	Ингибирует связывание т-РНК с рибосомой
Полимиксин	<i>Bacillus polymixa</i>	Грамотрицательные	Разрушает цитоплазматическую мембрану
Бацитрацин	<i>Bacillus subtilis</i>	Грамположительные	Подавляет синтез пептидогликана

Механизм действия Пенициллин *Penicillium* Грамположительные. Подавляет образование клеточной стенки Цефалоспорин *Cephalosporium* Грамположительные и грамотрицательные. То же Эритромицин *Streptomyces erythreus* Грамположительные. Подавляет функции рибосом Стрептомицин *Streptomyces griseus* Грамположительные и грамотрицательные То же Тетрациклин *Streptomyces aureofaciens* Грамположительные и грамотрицательные Ингибирует связывание т-РНК с рибосомой Полимиксин *Bacillus polymixa* Грамотрицательные Разрушает цитоплазматическую мембрану Бацитрацин *Bacillus subtilis* Грамположительные Подавляет синтез пептидогликана

Начиная с середины 60-х годов, в связи с распространением устойчивости к наиболее широко применяемым антибиотикам у большого числа патогенных бактерий исследователи перешли от поиска новых антибиотиков к модификации химической структуры уже имеющихся. Большинство исследований было основано на химических изменениях структуры боковых групп основных антибиотиков (пенициллинов, цефалоспоринов) - получении так называемых полусинтетических антибиотиков. Так, например, основная часть молекулы пенициллина без боковой группы представляет собой 6-АПК (6 - аминопенициллиновая кислота). В настоящее время все производные пенициллина во всем мире получают из 6 - АПК путем химической модификации. 6 - АПК отделяют от боковых групп при помощи фермента - пеницил-линамидазы. Необходимо отметить, что большой успех в интенсификации производства антибиотиков обеспечивает селекция более активных штаммов. Природные плесневые грибы (дикие типы) продуцируют 5- 50 условных единиц антибиотика на 1 л среды. Используемые ныне промышленные штаммы синтезируют его в 10 - 12 тыс. раз больше (пенициллин), в 2- 3 тыс.раз (стрептомицин) и т.д. Так, высокопродуктивные штаммы пенициллина были получены в результате 21 последовательных циклов мутагенеза и селекции, продолжавшихся более двух десятков лет. После того как микробная клетка обрабатывалась мутагеном,

исследовались и проверялись десятки тысяч колоний. Когда обнаруживали мутанта, дающего большое количество антибиотика, он становился исходным материалом для новых циклов мутагенеза и скрининга. Тем самым эволюция микроорганизма направлялась в неестественную для него сторону до тех пор, пока не удавалось получить высокопродуктивные штаммы. Так, исходный штамм пенициллина производил 25 мг/л антибиотика. Затем в результате спонтанной мутации возник штамм с выходом пенициллина 150 мг/л. После рентгеновского облучения был выделен мутант, дающий 900 мг/л пенициллина. В результате УФ - облучения был выделен штамм, который синтезировал 550 мг/л антибиотика. В качестве химического мутагена был использован иприт, который обеспечил появление более высокопродуктивного штамма (7гр/л). Анализируя процесс производства антибиотиков, необходимо подчеркнуть, что антибиотики относятся к числу вторичных метаболитов и их синтез начинается после прекращения роста продуцента. Поэтому на первых этапах культивирования целью производства является накопление необходимого количества биомассы (антибиотик при этом практически отсутствует). Биосинтез антибиотика происходит на второй стадии производственного культивирования, причем время биосинтеза может в 2- 3 раза превышать время, затрачиваемое на культивирование продуцента.

Биосинтез пенициллина. Пенициллин получают глубинным методом (т.е. в жидкой питательной среде). В качестве продуцентов используют плесневые грибы рода *Penicillium*. Исходная культура продуцента используется в виде спор. Их выращивают на флаконах при температуре 25°C - 27°C в течение 4-5 суток. Мицелии размножают до 5%- 10% объема ферментера. Питательные среды для биосинтеза пенициллина готовят из кукурузного экстракта (2%- 3%), лактозы (5%), глюкозы (1,5%), сульфата аммония и фосфатов (0,5% и 1,0 %) и фенилуксусной кислоты - предшественника антибиотика (0,3% -0,6 %). Для стабилизации pH используют мел. Ферментацию ведут при температуре 22°C - 26°C, pH 5,0- 7,5, при интен-

сивной аэрации среды. В течение 4 суток количество пенициллина достигает максимума (до 10000 ЕД/мл). Мицелий отделяют фильтрацией, и его используют в животноводстве как источник белков и витаминов. Из культуральной жидкости выделяют пенициллин (в фильтрате содержится 3- 6% сухих веществ, из которых лишь 15%- 30% составляет пенициллин). Белковые примеси удаляют осаждением солями металлов или денатурацией. Пенициллин двукратно экстрагируют органическими растворителями (бутилацетатом или амилацетатом). В результате экстракции чистота продукта возрастает в 4- 6 раз (активность 30000- 50000 ЕД/мл). Вторичная экстракция бутилацетатом увеличивает активность экстракта до 50000 - 70000 ЕД/мл. Выход пенициллина составляет 86% от его исходного количества в культуральной жидкости. Ферментативное превращение (модификация) пенициллина в 6 - АПК осуществляют с помощью микробных культур *Bacillus megatherium* и *E. coli*, которые продуцируют фермент пенициллинамидазу. Применение антибиотиков в пищевой промышленности позволяет снизить длительность термообработки различных продуктов питания при их консервировании, а это, в свою очередь, обеспечивает большую сохранность присутствующих в них биологически активных веществ, вкусовых качеств и консистенцию продуктов. Используемые антибиотики воздействуют в основном на термофильные бактерии, устойчивые к нагреванию. Так, наиболее эффективным антибиотиком при консервировании овощей общепризнан низин. Он не токсичен для человека и позволяет вдвое уменьшить время обработки овощей. В течение последних лет антибиотики используются как стимуляторы роста сельскохозяйственных животных и птицы. Механизм стимулирующего действия антибиотиков связан с двумя факторами: воздействием на микрофлору кишечника и непосредственным влиянием на организм животного. В первом случае антибиотики снижают число вредных для организма животного микробов, образующих токсины, изменяют метаболизм присутствующих микробов. Во втором случае ускоряется процесс потребления пищи, растет приспособляе-

мость организма к неблагоприятным условиям. Кормовые антибиотики применяют в виде неочищенных препаратов, которые представляют собой высушенную биомассу продуцента, содержащую помимо антибиотика аминокислоты, ферменты, витамины группы В и другие биологически активные вещества. Ограничение по использованию медицинских антибиотиков для кормовых целей (пенициллин, биомицин) связано с возникновением опасности снижения лечебного эффекта антибиотических веществ при инфекционных заболеваниях. Для производства кормовых антибиотиков в основном используют культуры актиномицетов. В бывшем СССР основным кормовым антибиотиком являлся биовит (-20,-40,-80) на основе продуцента хлортетрациклина – *Actinomyses rimosus* (20,40,80- содержание чистого антибиотика в 1 кг препарата). Препараты применялись как стимуляторы роста молодняка сельскохозяйственных животных, для профилактики желудочно-кишечных заболеваний. По внешнему виду биовит представляет собой однородный порошок коричневого цвета, выпускаемый в бумажных мешках по 10 - 20 кг. Окситетрациклин для животноводства выпускается в форме терразита. Антибиотики используют и как средство борьбы с различными фитопатогенами. Источники заражения растений фитопатогенными микроорганизмами различны. Воздействие антибиотического вещества сводится к задержанию роста или гибели фитопатогенных микроорганизмов, находящихся в семенах и вегетативных органах растения. Используемые препараты антибиотиков должны быть высокоактивными против возбудителя заболевания, безвредными для растения, легко проникать в соответствующие ткани растения и сохранять длительно антибиотическую активность. К числу антибиотиков, нашедших наиболее широкое применение в борьбе с фитопатогенами, относятся фитобактериомицин, трихотецин и полимицин. Продуцентом фитобактериомицина является *Actinomyses lovendulae*. Препарат производится в виде дустов и суспензии различных концентраций, которые применяют при заболеваниях хлопчатника, против корневой гнили пшеницы и т.д. Продуцентом антибиотика

трихотецина являются штаммы плесневых грибов *Trichothecium roseum*. Применяют трихотецин в борьбе с вредителями плодовых, зерновых, табака, овощных.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Изучить стадии роста и развития микроорганизмов-продуцентов антибиотиков.
2. В лабораторных условиях методом поверхностного культивирования вырастить плесневые грибы рода *Penicillium* и пронаблюдать антибиотические свойства полученного вещества.
3. Внести данные наблюдения в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы являются продуцентами ферментных препаратов?
2. Назовите наиболее широко применяемые антибиотики.
3. Назовите преимущества и недостатки поверхностного и глубинного методов культивирования.

12 Лабораторная работа № 12

Тема: Технология производства бактериальных удобрений на основе клубеньковых бактерий.

Цель занятия: изучить технологию производства бактериальных удобрений на основе клубеньковых бактерий.

Теоретическое обоснование работы

Микрофлора почвы оказывает непосредственное влияние на её плодородие и, как следствие, на урожайность растений. Почвенные микроорганизмы в процессе роста и развития улучшают структуру почвы, накапливают в ней питательные вещества, минерализуют различные органические соединения, превращая их в легко усвояемые растением компоненты питания. Для стимуляции этих процессов применяют различные бактериальные удобрения, обогащающие ризосферу растений полезными микроорганизмами. Микроорганизмы, используемые для производства бактериальных препаратов, способствуют снабжению растений не только элементами минерального питания, но и физиологически активными веществами (фитогормонами, витаминами и др.).

В настоящее время выпускают такие бактериальные удобрения, как нитрагин, ризоторфин, азотобактерин, фосфобактерин, экстрасол.

Технология получения препаратов клубеньковых бактерий

Отечественная промышленность выпускает два вида препаратов клубеньковых бактерий: **нитрагин** и **ризоторфин**. Оба препарата производятся на основе активных жизнеспособных клубеньковых бактерий из рода *Rhizobium*. Эти бактерии в симбиозе с бобовыми культурами способны фиксировать свободный азот атмосферы, превращая его в соединения, легкоусвояемые растением. Бактерии рода *Rhizobium* - строгие аэробы. Среди них различают активные, малоактивные и неактивные культуры. Критерием активности клубеньковых бактерий служит их способность в симбиозе с бобовым растением фиксировать атмосферный азот и использовать его в виде соединений для корневого питания растений. Фиксация атмосферного азота возможна только в клубеньках, образующихся на корнях растений. Возникают они при инфицировании корневой системы бактериями из рода *Rhizobium*. Заражение корневой системы происходит через молодые корне-

вые волоски. После внедрения бактерии прорастают внутри них до самого основания в виде инфекционной нити. Выросшие нити проникают сквозь стенки эпидермиса в кору корня, разветвляются и распределяются по клеткам коры. При этом индуцируется деление клеток хозяина и разрастание тканей. В месте локализации бактерий на корне растения-хозяина образуются клубеньки, в которых бактерии быстро размножаются и располагаются по отдельности или группами в цитоплазме растительных клеток. Сами бактериальные клетки увеличиваются в несколько раз и меняют окраску. Если клубеньки имеют красноватую или розовую окраску, обусловленную наличием пигмента леоглобина (леггемоглобина) - аналог гемоглобина крови животных, то они способны фиксировать молекулярный азот. Неокрашенные ("пустые") или имеющие зеленоватую окраску клубеньки не фиксируют азот. Бактерии, находящиеся в клубеньках, синтезируют ферментную систему с нитрогеназной активностью, восстанавливающую молекулярный азот до аммиака. Ассимиляция аммиака происходит, в основном, путем вовлечения его в ряд ферментативных превращений, приводящих к образованию глутамина и глутаминовой кислоты, идущих в дальнейшем на биосинтез белка. Помимо критерия активности в характеристике клубеньковых бактерий используют критерий вирулентности. Он характеризует способность микроорганизма вступать в симбиоз с бобовым растением, то есть проникать через корневые волоски внутрь корня и вызывать образование клубеньков. Большое значение имеет скорость такого проникновения. В симбиотическом комплексе растение - *Rhizobium* бактерии обеспечиваются питательными веществами, а сами снабжают растение азотистым питанием. С вирулентностью связана и видовая избирательность, которая характеризует способность данного вида бактерий к симбиозу с определенным видом бобового растения. Классификация различных видов *Rhizobium* учитывает растение-хозяина, например: *Rhizobium phaseoli* - для фасоли, *Rhizobium lupini* - для люпина, сараделлы и т.д. Вирулентность и видоспецифичность взаимосвязаны и не являются постоян-

ными свойствами штамма. Задачей производства бактериальных удобрения является максимальное накопление жизнеспособных клеток, сохранение их жизнеспособности на всех стадиях технологического процесса, приготовление на их основе готовых форм препарата с сохранением активности в течение гарантийного срока хранения. Отечественная промышленность выпускает два вида нитрагина: почвенный и сухой. Впервые культура клубеньковых бактерий на почвенном субстрате была приготовлена в 1911 году на бактериально-агрономической станции в Москве. В настоящее время его производство имеет ограниченное значение, так как технология довольно сложна и трудоёмка при выполнении отдельных операций. Более перспективна технология производства сухого нитрагина. Сухой нитрагин - порошок светло-серого цвета, содержащий в 1 г не менее 9 млрд. жизнеспособных бактерий в смеси с наполнителем. Влажность не превышает 5%-7%. Промышленное производство имеет типичную схему. Необходимо отметить, что важно подбирать штаммы, устойчивые к высушиванию. Для производства посевного материала исходную культуру клубеньковых бактерий выращивают на агаризованной среде, содержащей отвар бобовых семян, 2% агара и 1% сахарозы, затем культуру размножают в колбах на жидкой питательной среде в течение 1-2 суток при 28°C -30 C и pH 6.5-7.5. На всех этапах промышленного культивирования применяют питательную среду, включающую такие компоненты, как меласса, кукурузный экстракт, минеральные соли в виде сульфатов аммония и магния, мел, хлорид натрия и двузамещенный фосфат калия. Основная ферментация идет при тех же условиях в течение 2-3 суток. Готовую культуральную жидкость сепарируют, получается биомасса в виде пасты с влажностью 70% -80%. Пасту смешивают с защитной средой, содержащей тиомочевину и мелассу (1:20) и направляют на высушивание. Сушат путем сублимации (в вакуум-сушильных шкафах). Высушенную биомассу размалывают. Производить высушивание в распылительных сушках, но при этом 75% клеток теряют жизнеспособность. Препараты сухого нитрагина фасуют и герметизи-

зируют в полиэтиленовые пакеты по 0.2 - 1 кг, хранят при температуре 15 С не более 6 месяцев. Семена опудривают перед посевом. Внесение нитрагина повышает урожайность в среднем на 15% -25%. Препарат клубеньковых бактерий может выпускаться и в виде ризоторфина. Впервые торфяной препарат клубеньковых бактерий был приготовлен в 30-х годах, но технология была создана в 1973-77 гг. Для приготовления ризоторфина торф сушат при температуре не выше 100 С и размалывают в порошок. Наиболее эффективным способом стерилизации является облучение его гамма-лучами. Перед стерилизацией размолотый, нейтрализованный мелом и увлажненный до 30% - 40% торф расфасовывают в полиэтиленовые пакеты. Затем его облучают и заражают клубеньковыми бактериями, используя шприц, с помощью которого впрыскивается питательная среда, содержащая клубеньковые бактерии. Прокол после внесения бактерий заклеивается липкой лентой. Каждый грамм ризоторфина должен содержать не менее 2.5 млрд. жизнеспособных клеток с высокой конкурентоспособностью и интенсивной азотфиксацией. Препарат хранят при температуре 5-6 С и влажности воздуха 40% - 55%. Пакеты могут быть весом от 0.2 до 1.0 кг. Доза препарата составляет 200 г на га. Заражение семян производят следующим образом: ризоторфин разбавляют водой и процеживают через двойной слой марли. Полученной суспензией обрабатывают семена. Семена высевают в день обработки или на следующий. Обработка семян бобовых культур прочно вошла в мировую сельскохозяйственную практику. Крупнейшими производителями таких препаратов являются США и Австралия.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Ознакомиться с технологией производства бактериальных удобрений на основе клубеньковых бактерий.
2. Изучить основные характеристики микроорганизмов, используемых в производстве бактериальных удобрений.

3. Сделать сравнительную характеристику особенностей получения нитрагина и ризоторфина.

Контрольные вопросы:

1. Назовите бактериальные удобрения, применяемые для обогащения почвы азотом.
2. Какие существуют микроорганизмы-фиксаторы азоты?
3. Дайте характеристику препаратам клубеньковых бактерий.

13 Лабораторная работа № 13

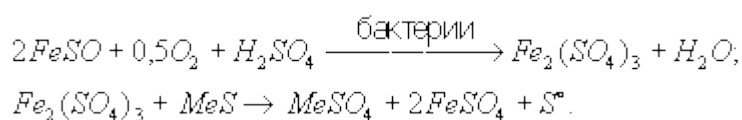
Тема: Микробное выщелачивание

Цель занятия: изучить возможности образования энергоёмких продуктов микробиологическими методами.

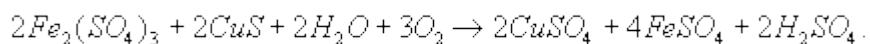
Теоретическое обоснование работы

Бактериальное выщелачивание - избирательное извлечение химических элементов из многокомпонентных соединений посредством их растворения микроорганизмами в водной среде. Благодаря бактериальному выщелачиванию появляется возможность извлекать из руд, отходов производства и т. д. ценные компоненты (медь, уран и др.) или вредные примеси (например, мышьяк в рудах чёрных и цветных металлов). Впервые запатентовано в США (1958) применительно к извлечению меди и цинка. Бактериальное выщелачивание можно пользоваться при всех способах выщелачивания, не связанных с повышенными давлениями и температурой. Наиболее широко для бактериального выщелачивания применяют тионовые бак-

тери: *Thiobacillus ferrooxidans*, способные окислять сульфидные минералы и закисное железо до окисного (так называемые железобактерии), и *Th. thiooxidans* (так называемые серобактерии). Тионовые бактерии являются хемоавтотрофами, т. е. единственный источник энергии для их жизнедеятельности — процессы окисления закисного железа, сульфидов различных металлов и элементарной серы. Эта энергия расходуется на усвоение углекислоты, выделяемой из атмосферы или из руды. Получаемый углерод идёт на построение клеточной ткани бактерий. *Th. ferrooxidans* окисляют сульфидные минералы до сульфатов прямым и косвенным путём (когда микроорганизмы окисляют сернокислородное закисное железо до окисного, являющегося сильным окислителем и растворителем сульфидов):



Важнейший фактор бактериального выщелачивания — быстрая регенерация сернокислородного окисного железа тионовыми бактериями (*Th. ferrooxidans*), что в некоторых случаях ускоряет процессы окисления и выщелачивания. Оптимальная температура для развития тионовых бактерий 25°C — 35°C, а pH от 2 до 4. Тионовые бактерии ускоряют растворение халькопирита в 12 раз, арсенонирита и сфалерита в 7 раз, ковелина и борнита в 18 раз по сравнению с обычными химическими методами. В значительных промышленных масштабах бактериальное выщелачивание применяется для кучного извлечения полезных ископаемых (меди и урана) из руд на месте их залегания. Например, экономически целесообразно извлекать бактериальным выщелачиванием медь из забалансовых сульфидных руд. Это осуществляется водными растворами $Fe_2(SO_4)_3$ в присутствии $Al_2(SO_4)_3$, $FeSO_4$ и тионовых бактерий *Th. ferrooxidans*. Раствор подаётся по шлангам в скважины, пробурённые в рудном теле; бактерии и сульфат окиси железа окисляют сульфиды меди по схеме:



По горным выработкам раствор из рудного тела подают на цементационную или др. установку для извлечения меди. В различных странах ведутся исследования по выщелачиванию с участием тионовых бактерий для извлечения мн. металлов (Zn, Co, As, Мп и др.). Ведутся работы по выявлению бактерий иных видов для извлечения др. полезных ископаемых. Например, для растворения и извлечения золота предложено использовать гетеротрофные бактерии *Aeromonas*, выделенные из рудничных вод золотоносных приисков. Простота аппаратуры для бактериального выщелачивания, возможность быстрого размножения бактерий, особенно при возвращении в процесс отработанных растворов, содержащих живые организмы, открывает возможность не только резко снизить себестоимость получения ценных полезных ископаемых, но и значительно увеличить сырьевые ресурсы за счёт использования бедных, забалансовых и потерянных (например, в целиках) руд в месторождениях, отвалов из отходов обогащения, пыли, шлаков и др. В перспективе бактериальное выщелачивание открывает возможности создания полностью автоматизированных предприятий по получению металлов из забалансовых и потерянных руд непосредственно из недр Земли, минуя сложные горнообогатительные комплексы.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Ознакомиться с микроорганизмами, которые используются в биотехнологии металлов.
2. Изучить условия проведения бактериального выщелачивания.
3. На основе лекционного и лабораторного материала внести в таблицу данные об основных металлах, подвергающихся бактериальному выщелачиванию.

Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы используются в биотехнологии металлов?
2. Какие металлы подвергаются бактериальному выщелачиванию?
3. какие существуют методы бактериального выщелачивания?

14 Лабораторная работа № 14

Тема: Получение биогаза

Цель занятия: изучить основные процессы получения биогаза.

Метановое брожение, или процесс биометаногенеза – давно известный процесс превращения биомассы в энергию. Он был открыт в 1776 году Вольтой, который установил наличие метана в болотном газе. Биогаз, получающийся в ходе этого процесса, представляет собой смесь из 65% метана, 30% углекислого газа, 1% сероводорода и незначительного количества кислорода, водорода и закиси азота. Биогаз даёт пламя синего цвета и не имеет запаха. Его бездымное горение причиняет гораздо меньше неудобств людям по сравнению со сжиганием дров, угля и других продуктов. Энергия, заключённая в 28 кубометрах биогаза, эквивалентна энергии 16,8 кубометров природного газа, 20,8 литров нефти или 18,4 литров дизельного топлива. Биометаногенез осуществляется в 3 этапа: растворение и гидролиз органических соединений, ацидогенез и метаногенез. В производстве биогаза участвует 3 группы бактерий. Первые превращают сложные органические соединения в масляную, пропионовую и молочную кислоты, вторые превращают эти органические кислоты в уксусную кислоту, водород и углекислый газ, а затем метанообразующие бактерии восстанавливают углекислый газ в метан с поглощением водорода. Было установлено, что уксус-

нокислые и метанообразующие микроорганизмы образуют симбиоз, который ранее ошибочно считался одним видом микроорганизмов. Среди бактериальных видов в процессе метаногенеза преобладают *Metanobacterium formosicum* и *Metanospirillum hungati*. Для всех метанобактерий характерна способность к росту в присутствии водорода и углекислого газа, а также высокая чувствительность к кислороду и ингибиторам производства метана. Однако, в пределах этой группы имеется и гетерогенность по морфологии микроорганизмов: в группу входят сарцины, кокки, бациллы и спироиллы. Всего известно 6 видов метанобактерий, 4 из которых принадлежат к хемолитоавтотрофам: они восстанавливают углекислый газ за счёт водорода как для синтеза аммиака, так и для синтеза собственного клеточного вещества. В природных условиях процесс метаногенеза осуществляется примерно за 20 дней, однако путём селекционного отбора был получен штамм *Metanobacterium cadomensis*, осуществляющий этот процесс за 8 дней. В промышленных условиях метановое брожение осуществляют в водонепроницаемых цилиндрических цистернах («дайджестерах») с боковым отверстием, через которое вводится ферментируемый материал. Над дайджестером находится стальной цилиндрический контейнер, который используется для сбора газа. Нависая над бродящей смесью в виде купола, контейнер препятствует проникновению внутрь воздуха, так как весь процесс должен происходить в строго анаэробных условиях. В газовом куполе имеется трубка для отвода биогаза, которая соединена с компрессором для его сгущения. В тех случаях, когда имеются отходы домашнего хозяйства или жидкий навоз, соотношение между твёрдыми компонентами и водой должно составлять 1:1, при этом соотношение количества сухих веществ в смеси составляет 8% - 11% по весу. Смесь сбраживаемых материалов обычно засевают уксуснокислыми и метаногенными бактериями или отстоем из другого дайджестера. Оптимальное переваривание происходит в условиях, близких к нейтральной pH (6,0-6,8). Низкая pH подавляет рост метаногенных бактерий и снижает выход биогаза. Против закисления используют из-

весть. Максимальная температура процесса зависит от мезофильности или термофильности микроорганизмов (30°C - 40°C или 50°C - 60°C). Резкие изменения температуры нежелательны. Обычно дайджестеры погружают в землю, чтобы использовать изоляционные свойства почвы. В странах с холодным климатом их подогревают. Производство биогаза путём метанового брожения отходов – одно из возможных решений энергетических проблем, особенно в сельских районах, удалённых от энергоносителей. И хотя при этом процессе только $\frac{1}{4}$ часть органического материала превращается в биогаз, последний выделяет тепла на 20% больше, чем его можно получить при полном сгорании навоза.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Изучить процесс получения биогаза.
2. Схематично изобразить биогазовую установку на основе лекционного и лабораторного материала (кустарного и промышленного типов).
3. Сделать сравнительную характеристику особенностей биогазовых установок для теплого и холодного времен года.

Контрольные вопросы:

1. Назовите недостатки традиционного спиртового брожения.
2. Получение этанола как экологически чистого топлива.
3. Что такое биометаногенез?
4. Назовите источники биогаза.

15 Лабораторная работа № 15

Тема: Технология получения хлебопекарных дрожжей

Цель занятия: изучить технологию получения хлебопекарных дрожжей на мелассной и этанольной средах.

Теоретическое обоснование работы

В производстве хлебопекарных дрожжей используют специально отобранные расы *Sacch. cerevisiae* 14,21, Томская 7 и др. При отборе культуры принимают во внимание способность дрожжей сбраживать тесто, т.е. они должны обладать силой и ферментативной активностью, хорошо расти на мелассной среде в условиях глубинной ферментации и давать высокий выход биомассы. Клетки дрожжей должны легко отделяться от культуральной жидкости сепарированием или фильтрацией и хорошо сохраняться в прессованном виде. Подъемную силу дрожжей выражают в минутах, в течение которых определенное количество дрожжей развиваясь в определенном количестве теста, увеличивает его объем на предусмотренную стандартом величину. Для хороших дрожжей подъемная сила не должна превышать 75 мин, зимазная активность – 30-40 мин, мальтазная активность 50-80 мин. Зимазную и мальтазную активность определяют по методу Елецкого, в основе которого лежит выделение определенного объема газа в сахарозной и мальтозной среде. Размеры клеток хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* равны (3х8) х (6х14) мкм. Форма их круглая или овальная. Хлебопекарные дрожжи обладают и бродильной активностью, но чтобы достигнуть использования сахаров только для образования биомассы, спиртовое брожение надо ограничить всеми доступными средствами. Это достигается интенсивной аэрацией среды, а также поддержанием низкой концентрации сахара в ней (0,5% - 1,5 %). При высокой

концентрации сахаров имеет место катаболитная репрессия цикла Кребса и переключение энергетического метаболизма преимущественно на брожение. Чтобы избежать этого, сахар в среду подают непрерывно с постоянной или возрастающей скоростью притока. Чтобы предотвратить чрезмерное размножение побочной микрофлоры, особенно так называемых диких дрожжей, удельная скорость роста которых выше, чем у хлебопекарных дрожжей, процесс ферментации обычно ведут по периодической схеме в течение 10-20 ч. Технология получения дрожжей имеет много различных вариантов.

Получение дрожжей из мелассы

Питательную среду для выращивания хлебопекарных дрожжей готовят из мелассы с добавками солей фосфора и азота, исходя из того, что готовая продукция должна содержать 6% - 7% азота и 3,6% - 4,4 % P_2O_5 в пересчете на сухое вещество. Мелассу разбавляют водой в соотношении 1:1 - 1:4, подкисляют серной кислотой до pH 5,0, осветляют центрифугированием в специальных кларификаторах. При центрифугировании из среды удаляются вещества, которые могут ухудшать цвет и качество дрожжей. Такой 20% - 45 %-ный раствор мелассы перекачивают в приточные мерные резервуары. Водные растворы солей (обычно в соотношении 1:10) перекачивают в отдельные приточные емкости. В размножении культуры дрожжей различают следующие стадии: *лабораторную; чистой культуры; естественно чистой культуры; товарных дрожжей*. В лаборатории размножение дрожжевой культуры идет через три этапа в 10% -12 %-ной содовой среде при использовании колб на 100, 1000, 8000 мл, в которых выращивание дрожжей длится по 24 ч. Границы оптимальной температуры 28°C - 32 °C, реакция среды pH 4,55,5. Для ограничения бактериальной инфекции в начальных стадиях стараются использовать более низкую реакцию среды - pH 4,3-4,6. Допускается также спиртовое брожение.

В стадии чистой культуры (ЧК) дрожжи размножаются в двух аппаратах на 12 %-ной мелассной среде, обогащенной солодовым экстрактом и фосфатом аммония. Емкость первого аппарата 80-100 л, второго – 800-820 л. Среда периодически аэрируется. Длительность ферментации 10-20 ч. Получают 2-4 кг дрожжей в пересчете на сухое вещество. В следующей стадии естественно чистой культуры (ЕЧК) получают посевной материал на 7% - 8 %-ной мелассной среде в условиях непрерывной, на первых стадиях менее интенсивной аэрации, а в конце на единицу объема жидкости за 1 мин вводят уже единицу объема воздуха. На последних стадиях дрожжи сепарируют и прессуют. Полученный посевной материал, который называют технической чистой культурой, хранят при 4 °С и используют в качестве посевного материала при производстве товарных дрожжей. С целью улучшения качества товарных дрожжей, уменьшения количества сопутствующей бактериальной микрофлоры желательно ЕЧК перед засевом подвергнуть кислотной обработке. Для этого прессованную ЕЧК суспендируют в воде (1:1) и добавляют 100 %-ную молочную кислоту в количестве 2% от массы дрожжей, перемешивают и выдерживают 1 ч. Для этих же целей можно использовать фуразолидон (0,05% к объему дрожжевой суспензии) при выдержке в течение 1 ч. Товарные дрожжи обычно получают три этапа. Сначала размножают первый посевной материал (задаточные дрожжи), затем вторые задаточные дрожжи и из них получают товарные дрожжи. Получение первых задаточных дрожжей идет без притока среды; длительность процесса 6-7 ч. На втором этапе стремятся полностью исключить спиртовое брожение, поэтому дрожжи выращивают в условиях очень интенсивной аэрации, лимитируя концентрацию сахара в среде, по проточному методу культивирования. Чаще всего длительность этого этапа 10-12 ч. Последний этап производства товарных дрожжей длится 10-24 ч. Рассмотрим подробно последний этап выращивания дрожжей, который длится 12 ч. В чистый аппарат вводят 70% - 80 % теплой воды от необходимого для конечного разведения мелассы (1:17 - 1:30) количества, добавляют 10% ме-

лассы и раствора солей, устанавливают оптимальные для культуры дрожжей рН среды, температуру и начинают умеренную аэрацию (1:1 по объему). В такую среду вводят посевной материал, т. е. вторые задаточные дрожжи – 8% - 15 % по сухой массе от количества усваиваемого сахара. В течение первого часа среду не добавляют, но в последующие 10 ч ее вводят непрерывным потоком в количестве 5; 6; 7,2; 8,2; 9,2; 10,2; 11,4; 12,8; 11; 9% за час от общего количества среды. Аэрация в течение всего времени ферментации также меняется. В первый и последний час культивирования она меньше (1:1), а в период интенсивного размножения дрожжей достигает 1,5-2,0 объема воздуха на 1 ед. объема среды в минуту. В таких условиях культура дрожжей проходит все фазы развития и соответственно этому меняется и технологический режим. Следовательно, в начальной лаг-фазе потребление кислорода воздуха меньше. В стационарной фазе надо выдерживать культуру до ее полного созревания, т. е. до прекращения интенсивного почкования. Во время ферментации незначительно возрастает концентрация среды (от 0,9% до 2,2% по сахаромеру) и титруемая кислота (от 0,3 до 0,8 мл 1 н. раствора кислоты на 100 мл раствора). В таких условиях выход прессованных дрожжей составляет 150%, сухой биомассы 37,5% от количества использованного сахара. Для обеспечения высоких выходов дрожжевой биомассы важно обеспечить в среде не только оптимальные концентрации сахара, азота, фосфора и других элементов, но и витаминов группы В, в первую очередь биотина, иногда пантотената кальция. Если в мелассе этих веществ недостаточно, добавляют кукурузный экстракт, вытяжку из солодовых ростков и другие добавки. Разработаны различные методы интенсификации процесса ферментации. На некоторых заводах для продления процесса ферментации последней стадии практикуют после 6-7-го часа ферментации ежечасовой отбор культуральной жидкости объемом 15% - 30 % и добавление такого же количества свежей среды. Для прекращения процесса размножения отобранную культуральную жидкость выдерживают 1-2 ч в резервуарах и затем сепарируют. Для повышения кон-

центрации клеток дрожжей в культуральной жидкости иногда практикуют возвращение сепарированных дрожжей в ферментатор (возвратная сепарация).

В производстве хлебопекарных дрожжей пытаются использовать метод непрерывной ферментации, но быстрое развитие побочной микрофлоры в этих условиях не дает возможности вести процесс дольше 4-6 сут. Биомассу дрожжей отделяют от культуральной жидкости, используя сепараторы, производительность которых 16-35 м³/ч. Сепарирование обычно идет в три этапа, при двукратной промывке суспензии клеток водой для удаления остатков среды, бактерий и примесей. Получают концентрат дрожжей, содержащий 80-120 г/л сухой биомассы. Его охлаждают до 8 °С - 10 °С, фильтруют на вакуум-фильтрах или фильтр-прессах и получают дрожжевую пасту с 70% - 75 % влажностью. После кондиционирования пасты водой до стандартной (75%) влажности, дрожжи в плитки массой 50, 100, 500, 1000 г и упаковывают. Хранят прессованные дрожжи при температуре 0-4 °С до 10 сут. Хлебопекарные дрожжи можно высушивать при температуре 30 °С - 40 °С до влажности 8% и хранить до 6 мес.

Выращивание дрожжей на этанольной среде

Ряд культур дрожжей, в том числе *Saccharomyces*, в условиях недостаточного обеспечения среды кислородом и при наличии углеводов получают энергию путем анаэробного расщепления сахаров (гликолиз); при этом образуется этанол. Как только в среде появляется кислород, клетки дрожжей сразу переключаются на энергетически более выгодный аэробный метаболизм (Пастеровский эффект) и способны метаболизировать не только глюкозу, но и накопившийся в среде этанол. Усваивать этанол дрожжи могут благодаря наличию в их клетках фермента алкогольдегидрогеназы (рис. 15.1). Выращивание дрожжей на этанольной среде представляет интерес в связи с тем, что химическая промышленность вырабатывает этанол на

основе гидратации этилена. Синтетический этанол сравнительно дешевый источник углерода, его ресурсы для нужд микробиологического в будущем могут увеличиться в связи с переводом производства каучука (основной потребитель этанола) на другие виды сырья. Технический этанол содержит мало вредных примесей, что дает возможность использовать выращенную на нем биомассу дрожжей не только для кормовых, но и для пищевых нужд. Большую роль в выборе сырья для микробиологического синтеза играет стабильность его качества. В этом отношении этанол выгодно отличается от мелассы, гидролизатов древесины, отходов промышленности.

Порядок выполнения лабораторной работы

1. Изучить расы дрожжей, которые используются при получении хлебопекарных дрожжей.
2. В лабораторных условиях приготовить питательную среду из мелассы для получения хлебопекарных дрожжей и пронаблюдать все стадии роста и развития дрожжей на данной среде.
3. Определить соответствие полученной в лабораторных условиях дрожжевой пасты заводскому продукту по физико-химическим и органолептическим показателям.

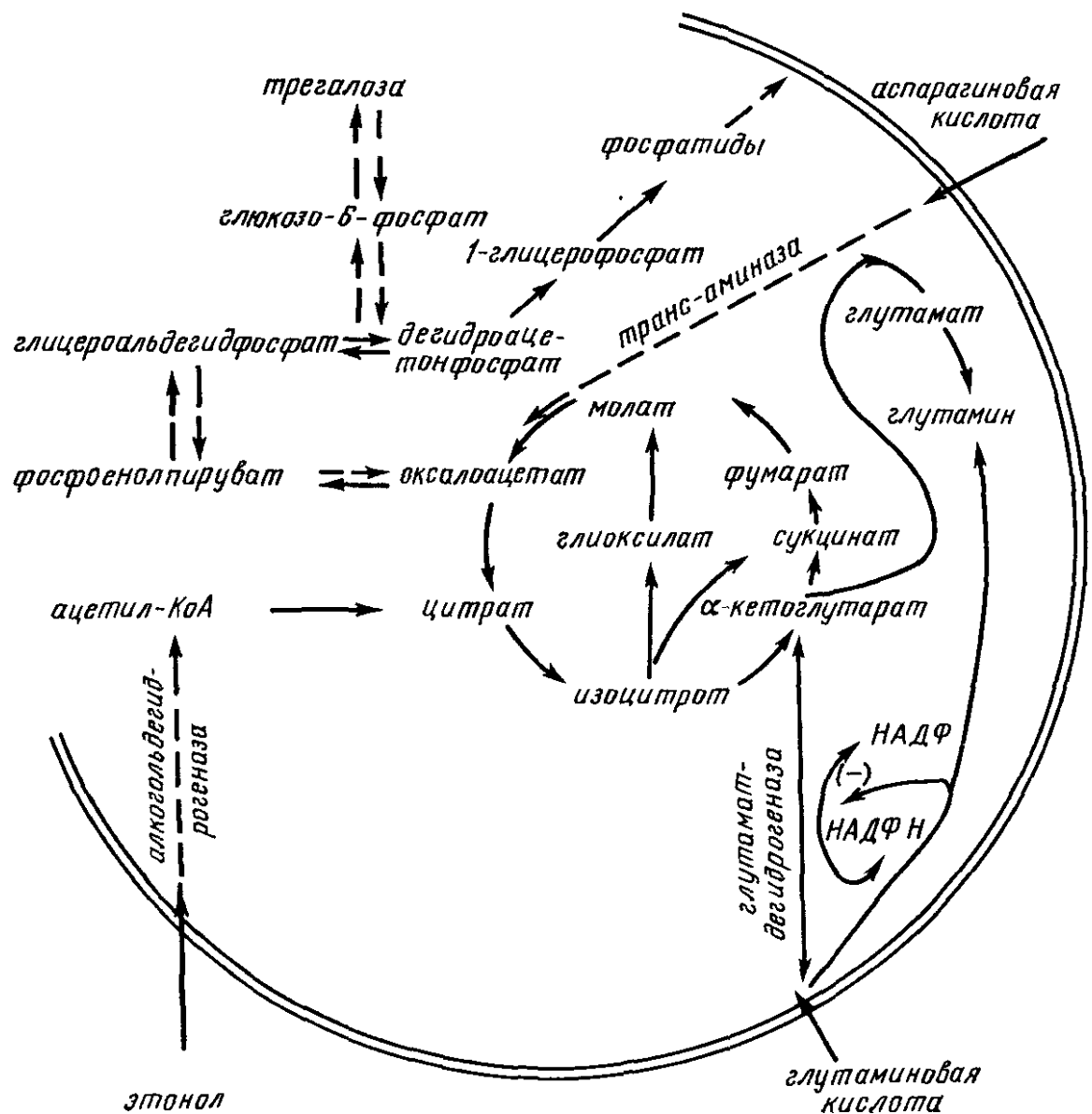


Рисунок 15.1 – Химизм использования этанола дрожжевой клеткой

Контрольные вопросы:

1. Какие расы дрожжей используются при производстве хлебопекарных дрожжей?
2. Охарактеризуйте наиболее оптимальные питательные среды для получения хлебопекарных дрожжей.

3. Какие существуют методы интенсификации процесса ферментации при получении хлебопекарных дрожжей?.

Список использованных источников

1. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии : учебное пособие / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. - М. : Логос, 2010. - 216 с. - (Новая университетская библиотека). - ISBN 978-5-98704-493-3 ; То же [Электронный ресурс]. - URL: <http://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=84985>

2. Ларичев, Т.А. Основы химии элементов : учебное пособие / Т.А. Ларичев, Т.Ю. Кожухова. - Кемерово : Кемеровский государственный университет, 2012. - 147 с. - ISBN 978-5-8353-1515-4 ; То же [Электронный ресурс]. - URL: <http://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=232759>.

3 Основы статической и динамической биохимии : курс лекций / Сибирский государственный университет физической культуры и спорта, Кафедра медико-биологических основ физической культуры и спорта ; сост. О.Н. Кудря, Л.Н. Тюрина и др. - Омск : Издательство СибГУФК, 2010. - 173 с. : табл., ил. ; То же [Электронный ресурс]. - URL: <http://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=274881>

4 Теоретические основы биохимии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Е. С. Барышева, О. В. Баранова, Т. В. Гамбург; М-во образования и науки Рос. Федерации, Гос. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т". - Электрон. текстовые дан. (1 файл: Kb). - Оренбург : ГОУ ОГУ, 2011. -Adobe Acrobat Reader 5.0. Издание на др. носителе [Текст] . - № гос. регистрации 0321102524. http://artlib.osu.ru/web/books/metod_all/11_20110615.pdf

5 Биохимия [Электронный ресурс] : электронное гиперссылочное учебное пособие / А. В. Дудко, А. Д. Стрекаловская, Е. С. Хайруллина; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т". - Электрон. текстовые дан. (1 файл: 245 Mb). - Оренбург : ОГУ, 2015. -Архиватор 7-Zip

http://ufer.osu.ru/index.php?option=com_uferdbsearch&view=uferdbsearch&action=details&ufer_id=1081