

# ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Профессор Бойченко М.Н.





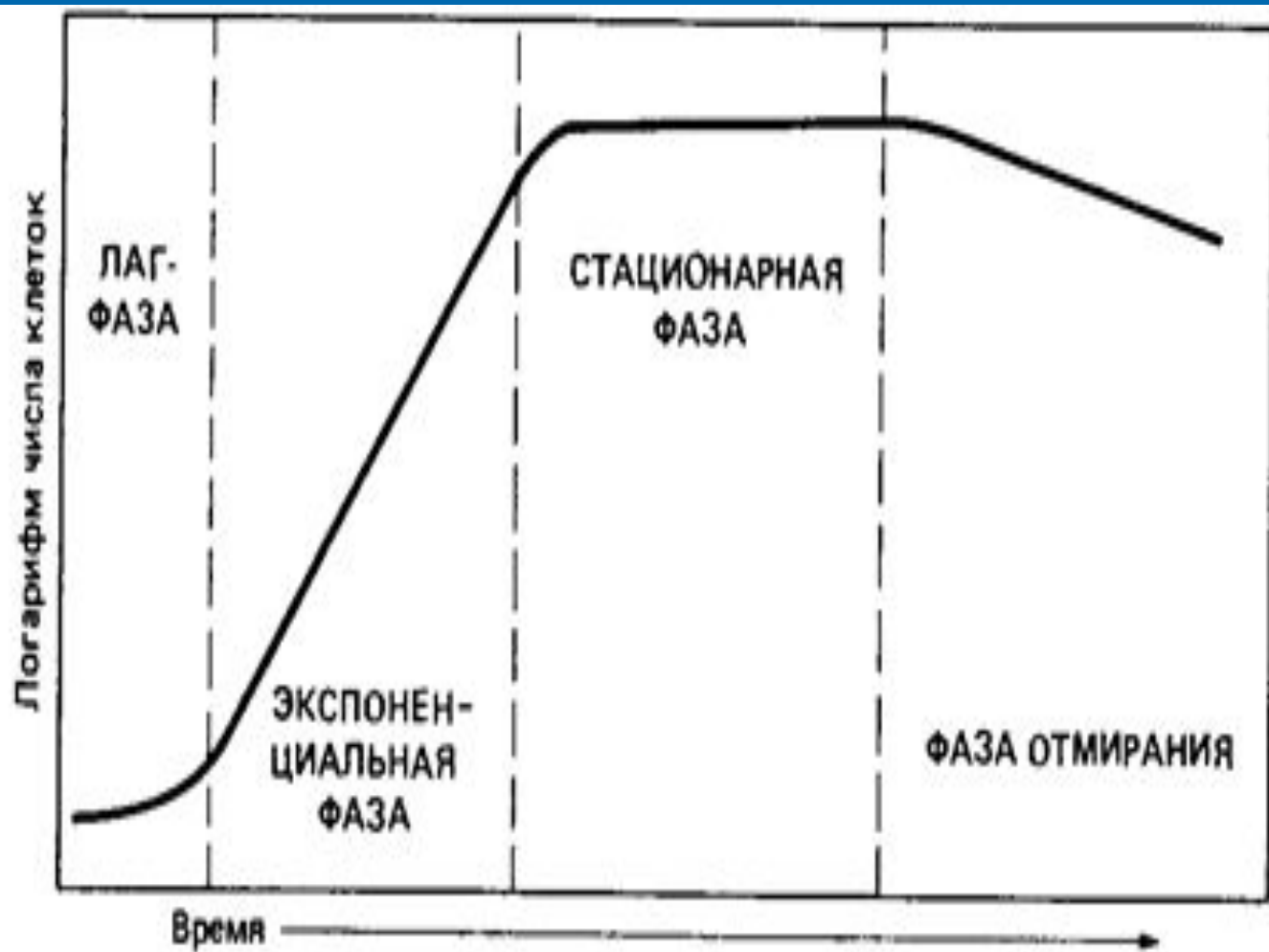


Рис. 6.6. Кривая роста бактериальной культуры.

# Параметры кривой роста

- **1. Время генерации** ( время удвоения бактериальной клетки варьирует от 20 мин до 24 часов в зависимости от вида бактерий)
- **2. Продолжительность lag-фазы** (показатель эффективности питательной среды)
- **3. Урожай клетки** (*разность между количеством клеток в стационарной и lag фазой*)

# Рост в периодической культуре

- Рост в периодической культуре описывается классической кривой
- Рост в периодической культуре ограничен концентрацией субстрата



# Непрерывное культивирование

- Непрерывное культивирование имитирует ситуацию в природе
- Микробы находятся в условиях постоянного поступления субстрата в низких концентрациях в течение определенного промежутка времени



# Непрерывное хемотростное культивирование

- В культиватор постоянно поддается свежая питательная среда
- Концентрация одного из субстратов находится на уровне лимитирующим рост
- Одновременно происходит отток культуры, создавая при этом постоянный объем

# Турбидостатная культура

- Основана на автоматизированной поддержании на постоянном уровне заданной концентрации клеток путем регулирования скорости подачи свежей среды в соответствии с измененной плотностью культуры
- Мониторинг проводят по измерению концентрации  $\text{CO}_2$



# Способы промышленного культивирования

- Осуществляют в биореакторах или ферментерах, которые обеспечивают оптимальные условия роста и защиту от внешнего загрязнения
- **Основное условие биотехнологического процесса -стерильность!**

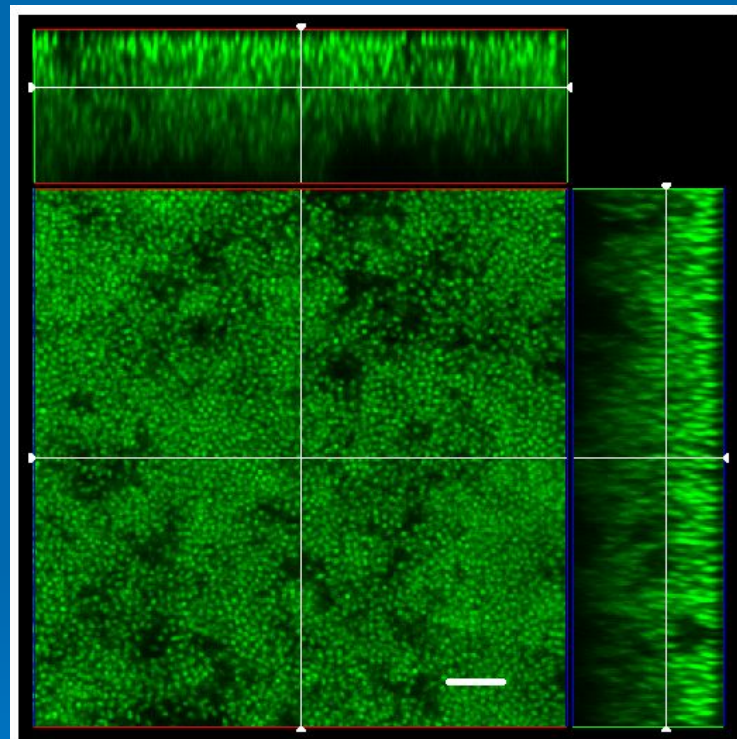
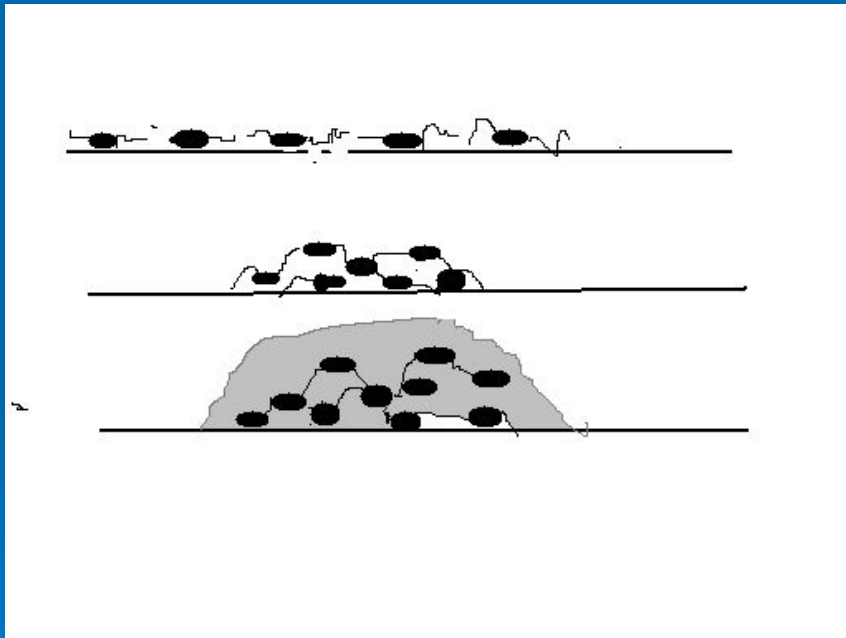
# Промышленное культивирование

- Среду стерилизуют пропусканием пара через биореактор
- Быстрорастущая культура требует большого количества кислорода, что достигается пропусканием через культуральную жидкость стерильного кислорода
- Воздух стерилизуют пропусканием через фильтры

# Промышленное культивирование

- Для увеличения насыщения кислородом питательной среды воздух подается через *рассекатели* (чем меньше пузырек воздуха, тем больше отношение его площади поверхности к объему, тем эффективнее переход кислорода в среду), при этом среда постоянно перемешивается

# Биопленка

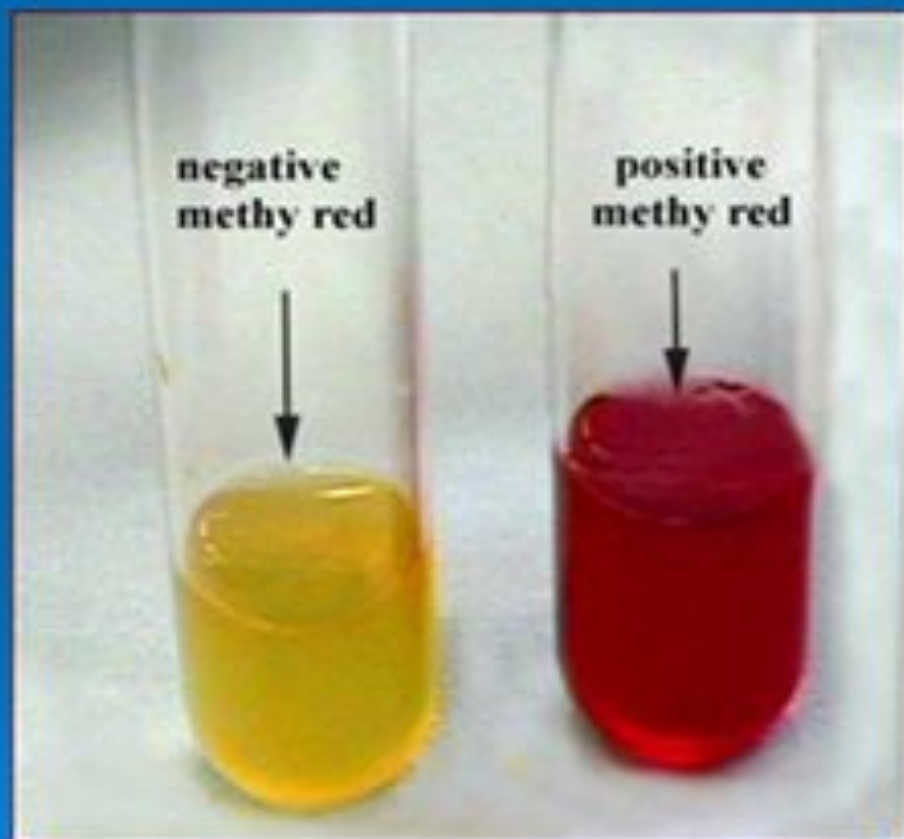


Биопленка, сформированная *Burkholderia cenocepacia* на стекле. Представлена трехмерная проекция. Бактерии окрашены акридиновым оранжевым и сфотографированы с помощью метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии на микроскопе Zeiss Axiovert 200M LSM510 (Германия). Маркер 5 мкм

# Муравьинокислое брожение

- $\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$
- $\text{HCOOH}$  ←  $\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$  →  $\text{Ac CoA}$
- $\text{H}_2$     $\text{CO}_2$
- Происходит образование **кислот и газов**, которые выявляются в реакции **метил-рот**

# Метил рот

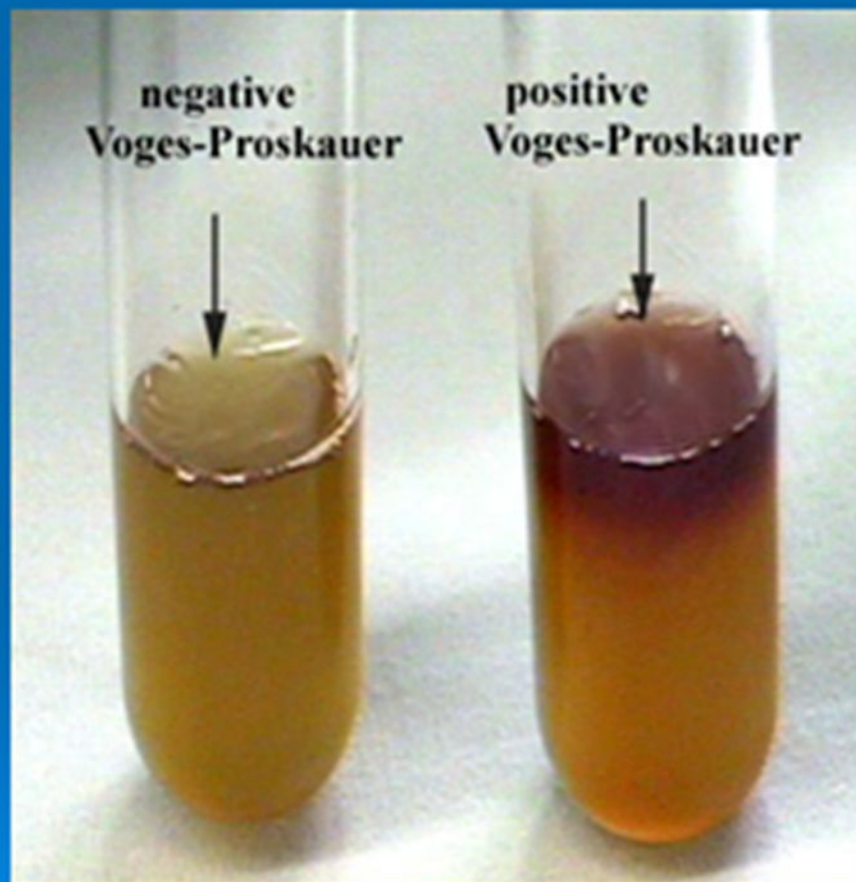




# Муравьинокислое брожение

- По второму варианту происходит конденсация 2 молекул пирувата с последующими двумя декарбосилированием с образование ацетоина, который выявляется в реакции Фогес-Проскауэра

# Реакция Фогес-Проскауэр





# СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ



Спиртовым брожением называется процесс расщепления сахара микроорганизмами с образованием **этилового спирта** и **углекислого газа**.



Возбудителями спиртового брожения являются **дрожжи сахаромицеты**, некоторые **мицеальные грибы**.

# СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ

- Процесс спиртового брожения лежит в основе получения этилового спирта, пивоварения, хлебопечения, производства глицерина. Совместно с молочнокислым брожением используется при получении кисломолочных продуктов (кумуса, кефира).

# Молочнокислое брожение



Молочнокислое брожение- это анаэробное превращение сахара молочнокислыми бактериями с образованием **МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ**.

По характеру брожения различают 2 группы молочнокислых бактерий:  
**гомоферментативные** и **гетероферментативные**.



# Молочнокислое брожение

- Процесс превращения глюкозы до пировиноградной кислоты у **гомоферментативных** молочнокислых бактерий протекает Г-6-Ф пути. Далее ввиду отсутствия у этих бактерий пируватдекарбоксилазы, **пировиноградная кислота не подвергается расщеплению, она является в этом брожении конечным акцептором водорода.** Пировиноградная кислота вступает во взаимодействие с восстановленным НАД Н<sub>2</sub> (кофермент) - образуется молочная кислота. -..



# Гетероферментативное молочнокислое брожение

- **Отсутствие фермента адьдолазы** меняет начальный путь превращения глюкозы. После фосфорилирования гексоза окисляется (отщепляется водород) и декарбоксилируется, превращаясь в **пентозофосфат**. Пентозофосфат при участии фермента фосфокеталазы расщепляется на **фосфоглицериновый альдегид**. Фосфоглицериновый альдегид превращается в пировиноградную кислоту, которая восстанавливается в молочную.

**Гексоза ----пентофасфат----  
фосфоглицериновый альдегид----пируват---  
молочная кислота**

# Молочнокислое брожение

- **Гомоферментативные бактерии** образуют в основном (не менее 85-90%) молочную кислоту и очень мало побочных продуктов.
- **Гетероферментативные бактерии** менее активные кислотообразователи. Наряду с молочной кислотой они образуют значительное количество других веществ-этиловый спирт, углекислый газ, ацетон, кислоты.

# Наиболее важные молочнокислые бактерии

- 1. Молочнокислый стрептококк ( *Streptococcus lactis* ) , относится к гомоферментативным молочнокислым бактериям, находится почти во всех молочных продуктах, является основной частью микрофлоры простокваш. Широко используют для изготовления кисломолочных продуктов, масла, сыра. Молочнокислый стрептококк обладает антимикробным действием, устойчивые к высокой температуре и задерживающие рост многих грамположительных микробов, в том числе и патогенных.

# Молочнокислое брожение

- 2. **Сливочный стрептококк (*S. cremoris*)**  
Оптимальная температура роста 25 С, минимальная- до 10 С. Используется в заквасках вместе с молочнокислым стрептококком для изготовления сметаны, масла, сыров.
  
- 3. **Ацидофильная палочка (*Lactobact. acidophilus*)** термофильная бактерия. Температурный оптимум роста 37-40 С. В молоке способна накапливать до 2,2% кислоты. Является постоянным обитателем желудочно-кишечного тракта животных.



# Молочнокислое брожение

- 4. К **гетероферментативным** молочнокислым бактериям относятся молочнокислые стрептококки.

Ароматобразующие ( *S. citrovorus*, *S. diacetylactis*) придают кисло-молочным продуктам приятные вкус и аромат. Для приготовления кисло-молочных продуктов ароматобразующие стрептококки соединяют с гомоферментативными-молочнокислым и сливочным.

# Молочнокислое брожение

- **Гомоферментативные бактерии** образуют в основном (не менее 85-90%) **молочную кислоту** и очень мало побочных продуктов.
- **Гетероферментативные бактерии** менее активные кислотообразователи. Наряду с молочной кислотой они образуют значительное количество других веществ-этиловый спирт, углекислый газ, ацетон, кислоты.

# Маслянокислое брожение

- Маслянокислое брожение - это процесс превращения сахара маслянокислыми бактериями в анаэробных условиях с образованием масляной кислоты, углекислого газа и водорода. .



Кроме основных продуктов брожения получают и побочные продукты - бутиловый спирт, ацетон, этиловый спирт.

# Маслянокислое брожение

- Пировиноградная кислота декарбоксилируется с образованием углекислого газа и уксусного альдегида. Далее под действием фермента карболигазы уксусный альдегид конденсируется и из 2 молекул уксусного альдегида образуется - ацетальдоль



Возбудители брожения- маслянокислые бактерии относятся к роду *Clostridium*

# Маслянокислое брожение

- В народном хозяйстве маслянокислое брожение часто приносит значительный ущерб, вызывая массовую гибель овощей, вспучивание сыра, порчу консервов, прогоркание молока.

Маслянокислое брожение применяют для производства масляной кислоты. При биохимическом производстве масляной кислоты сырьем служат дешевые сахара или хроммолокосодержащие вещества. Брожение ведут при 40 С в присутствии мела для нейтрализации

# Гниение

- Гниение — это процесс глубокого разложения белковых веществ микроорганизмами.



# ГНИЕНИЕ

- Процесс распада белков начинается с их гидролиза. Первичными продуктами гидролиза являются пептоны и пептиды. Они расщепляются до **аминокислот**, которые являются конечными продуктами гидролиза

# Гниение

- Образующиеся аминокислоты подвергаются **дезаминированию**, в результате чего образуются *аммиак и разнообразные органические* соединения в соответствии с характером самих аминокислот и ферментов микроорганизмов.
- Процесс **дезаминирования** может происходить различными путями. Различают **дезаминирование гидролитическое, окислительное и восстановительное.**



# Гидролитическое дезаминирование

- Гидролитическое дезаминирование сопровождается образованием **оксикислот** и **аммиака**.
- Если при этом происходит и декарбоксилирование аминокислоты, то образуются **спирт, аммиак** и **углекислый газ**:



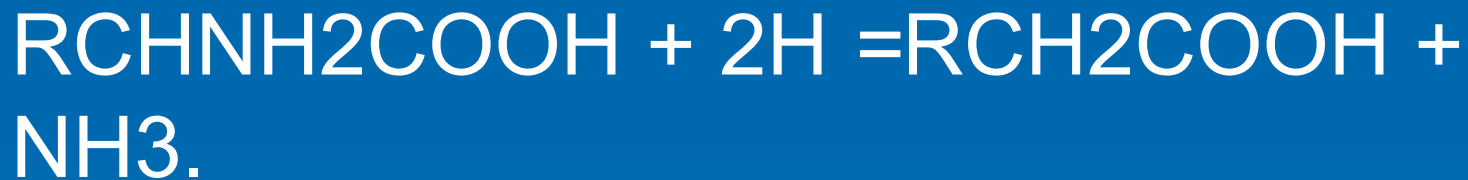
# Окислительное дезаминирование

- При **окислительном дезаминировании** образуются **кетокислоты** и **аммиак**:



# Восстановительное дезаминирование

- При восстановительном  
дезаминировании образуются  
карбоновые кислоты и аммиак:



# Продукты гниения

- При разложении аминокислот **жирного ряда** могут накапливаться **муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная** и другие кислоты, **пропиловый, бутиловый, амиловый** и другие спирты.
- При разложении аминокислот **ароматического ряда** промежуточными продуктами являются характерные продукты гниения: **фенол, крезол, скатол, индол** — вещества, обладающие очень неприятным запахом.

# Продукты гниения

- При распаде аминокислот, содержащих серу, получается сероводород или его производные — меркаптаны (например, метилмеркаптан  $\text{CH}_3\text{SH}$ ). Меркаптаны обладают запахом тухлых яиц, который ощущается даже при ничтожно малых их концентрациях.

# Возбудители гниения.

- .
- Наиболее распространенными и активными возбудителями гнилостных процессов являются следующие: ^ *Bac. subtilis* (сенная палочка) и *Bac. mesentericus* (картофельная палочка) — аэробные, подвижные, спорообразующие бактерии

# Значение гниения

- 1. Процесс гниения устраняет мертвые организмы на суше и в воде
- 2. Превращение отбросов животных и растений в навоз и перегной – удобряет почву
- 3. В процессе гниения в аэробных условиях происходит полная минерализация белка до углекислого газа, аммиака и сероводорода.

# Значение гниения

- Гнилостные бактерии-основные инструменты очистки бытовых сточных вод с помощью «активного ила» в интенсивно аэрируемом бассейне (**аэротехе**). При этом суспендированное вещество сточных вод окисляется комплексным микробным сообществом



# Фиксация молекулярного азота

- Некоторые бактерии, которые обитают в почве в симбиозе с бобовыми растениями способны фиксировать молекулярный азот, переводя его в аммиак



# Нитрофикация

- Нитрофицирующие бактерии-хемоорганотрофы, живущие в почве, воде
- В аэробных условиях они переводят сначала аммиак в соли азотистой кислоты (**нитриты**); во второй фазе нитриты окисляются в **нитраты**

# Денитрофикация

- Денитрофикация – процесс восстановления **нитрата** до **молекулярного азота** в анаэробных условиях
- **Денитрофицирующие бактерии** – палочковидные бактерии, факультативные анаэробы, обитающие в почве, воде, навозе

# Круговорот белка

□ Белок *гниение* ----- Аммиак-----нитрат



# Круговорот азота

□ Азот — аммиак — нитрат — азот



# Промышленные штаммы

- Все важнейшие бактерии-продуценты – **ГЕТЕРОХЕМООРГАНОТРОФЫ**
- Широко представлены Г+ бактерии родов *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*
- Из Г- бактерий используют уксуснокислые бактерии, рода *Xanthomonas*, а также *Pseudomonas*, *Salmonella*

# Требования к промышленным штаммам

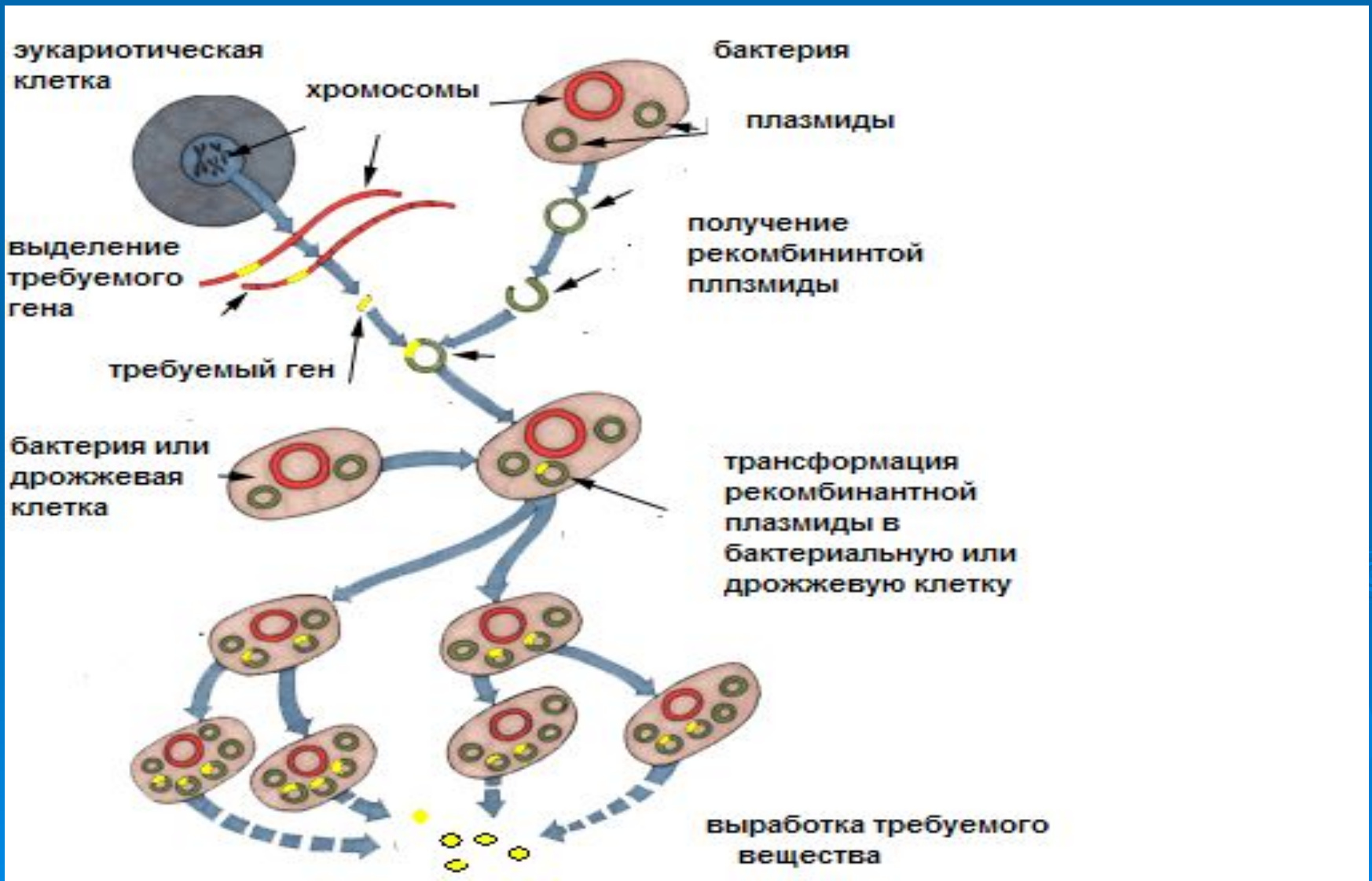
- Должны обладать:
- способностью хорошо расти в чистой культуре и быть генетически стабильными
- Отсутствием патогенности и токсичности
- Высокой скоростью роста и способностью синтезировать продукт в большом количестве за период не более 3 суток
- Не быть лизогенными

# Промышленные штаммы

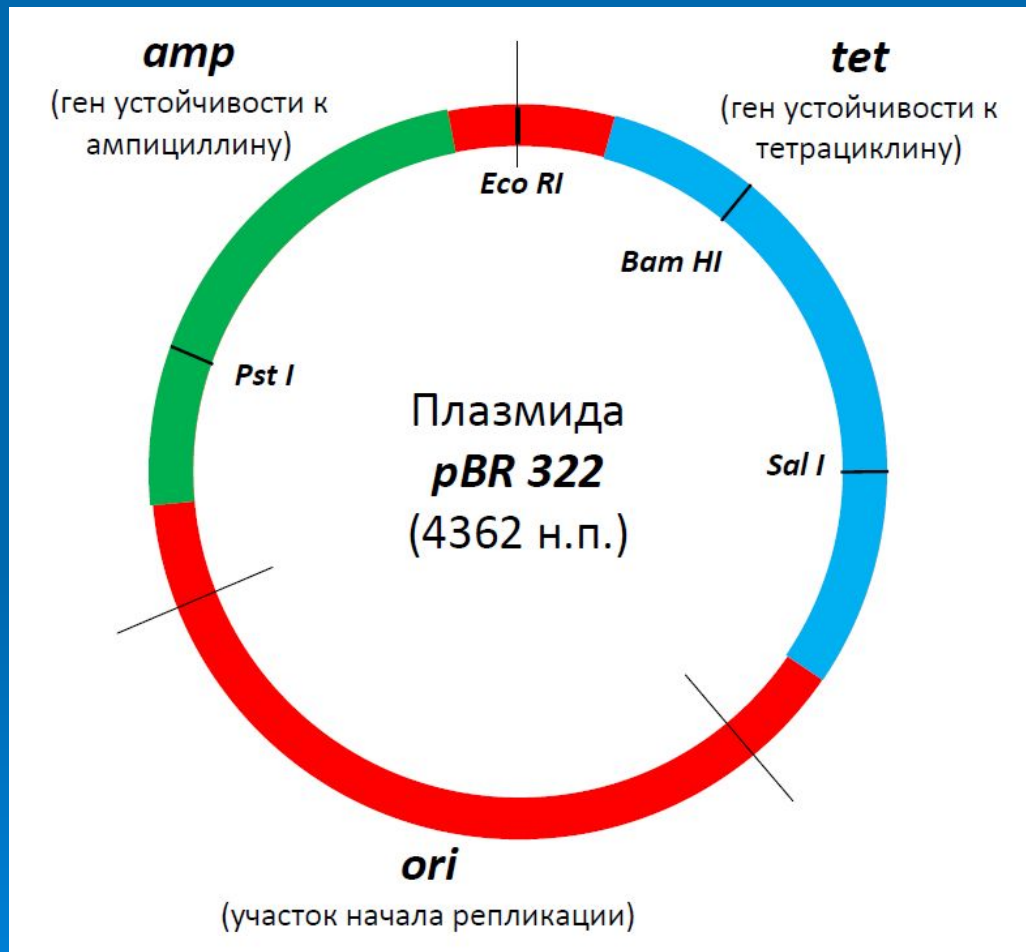
- Выделенные из природы штаммы используют в ограниченных технологиях пищевой промышленности
- В основном используют **оптимизированные штаммы**, которые ранее получали путем селекции , а теперь технологией рекомбинантных ДНК, так называемой метаболической инженерией



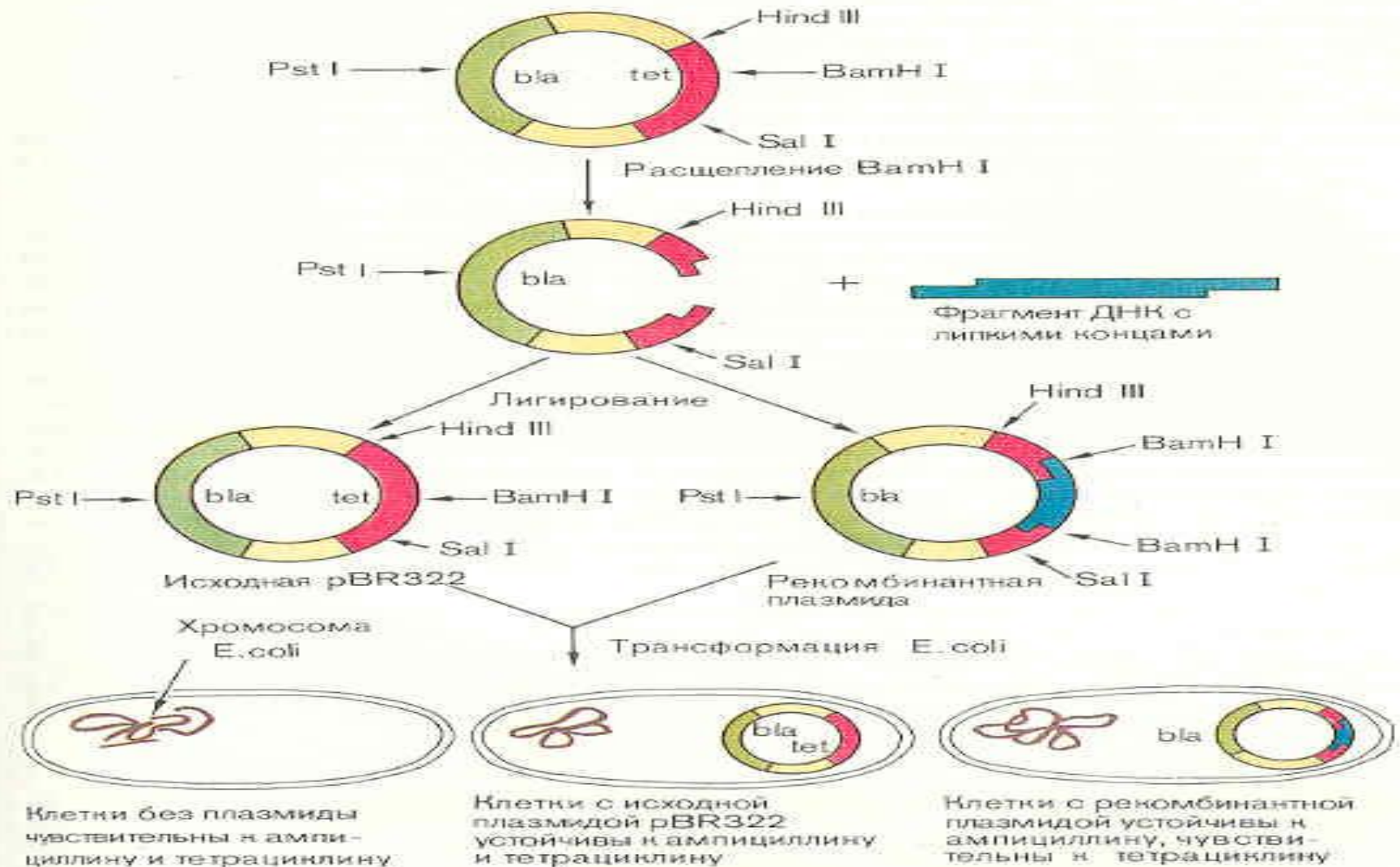
# Использование плазмид



# Плазмида pBR322



# Использование плазмид



# Промышленные штаммы

- Получение антибиотиков основано на использовании
- 1. нитчатых грибов
- 2. бактерий родов *Bacillus* , *Streptomyces*
-

# Промышленные штаммы

- Ферменты получают из бактерий рода *Bacillus* и грибов рода *Aspergillus*,
- так они хорошо выделяют ферменты в культуральную жидкость
- (*Грибная амилаза впервые была получена в США в 1964г.*)

# Препараты полученные при помощи методов рекомбинантной ДНК

- 1. человеческий инсулин
- 2. гормон роста
- 3. КСФ
- 4. интерлейкин-2
- 5. гамма-интерферон

# Методы хранения бактериальных культур

- **Непродолжительное хранение**
- 1. периодический пересев на свежую среду с выращиванием при пониженной температуре с последующим хранением в холодильнике не более 14 дней
- 2. в полужидком агаре, залитом стерильным вазелином (хранят максимально в течение 1 года)

# Методы хранения бактериальных культур

- Длительное хранение:
- 1. лиофилизация
- 2. ультразамораживание в жидком азоте (-196 С)



# Методы хранения бактериальных культур

- **Лиофилизация** заключается в удалении воды из замороженных клеток путем сублимации при низком давлении.
- При этом вода испаряется без перехода в жидкую фазу.
- В процессе лиофилизации добавляют **криопротекторы** (20% лошадиная сыворотка; 12% раствор сахарозы)

# Методы хранения бактериальных культур

- Ультразамораживание проводят с добавлением криопротекторов: 10% глицерола; ДМСО.
- Они замещают воду в качестве гидратной оболочки, уменьшая повреждающее действие кристаллов льда при замерзании воды