

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Майкопский государственный технологический университет»

Кафедра технологии, машин и оборудования  
пищевых производств

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

**ПО ИЗУЧЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ «БИОТЕХНОЛОГИЯ»**

для студентов очной и заочной форм обучения по направлению  
подготовки магистров 19.04.02 Продукты питания из растительного сырья по  
профилю подготовки Технология хранения и переработки злаковых,  
крупяных продуктов, плодоовощной продукции и виноградарства

Майкоп, 2019

УДК 574.6:[641.3:613.26](07)

ББК 28.4

М 54

Печатается по решению научно-методического совета технологического  
факультета

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Майкопский государственный технологический университет»

***Составитель:***

**Устюжанинова Таисия Аркадьевна** – кандидат технических наук,  
доцент кафедры технологии машин и оборудования пищевых производств  
ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет»

***Рецензент:***

**Агеева Наталья Михайловна** - доктор технических наук, профессор

Методические указания по изучению дисциплины «Биотехнология»  
для студентов очной и заочной форм обучения по специальности 19.04.02  
Продукты питания из растительного сырья по профилю подготовки  
Технология хранения и переработки злаковых, крупяных продуктов,  
плодоовощной продукции и виноградарства – Майкоп: Изд- МГТУ, 2019.

В методических указаниях изложены: тематика лабораторных работ,  
изучение роста микроорганизмов, получение чистой культуры посевного  
материала, технология производства ферментных препаратов, химизм  
образования пищевых органических кислот, получение биогаза, технология  
получения наиболее распространенных антибиотиков, технология получения  
хлебопекарных дрожжей

## 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» 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 высококачественных продуктов на основе максимального и рационального использования ресурсов.

# Лабораторная работа №1

## Тема: Изучение роста микроорганизмов

**Цель работы:** изучить особенности роста и развития микроорганизмов.

### Теоретическое обоснование работы

На оптимальной питательной среде при благоприятных значениях рН 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 получает 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  $\tau$ :  $\lg N = f(\tau)$ .

I 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 I фаза роста.

II фаза называется *фазой ускорения роста*, она характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы популяции и постоянным увеличением скорости роста культуры; обычно она непродолжительна.

III 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 со временем интенсивно 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 IV 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 VI фаза – *фаза ускорения отмирания*.

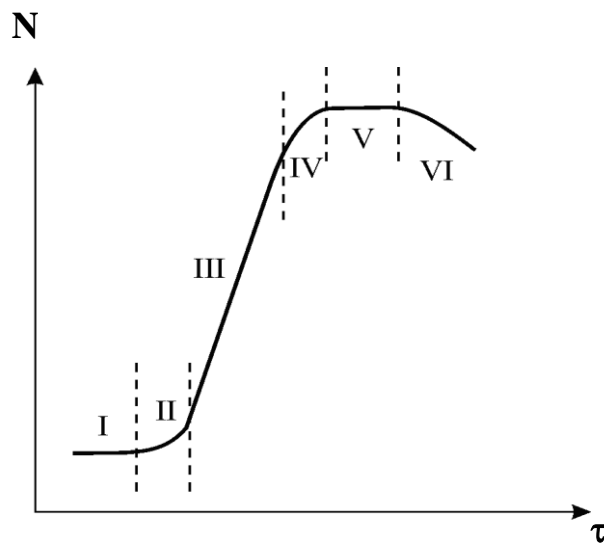


Рисунок 2 - Кривая роста микроорганизмов при периодическом культивировании:

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 VII 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 этапах 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.

## **Лабораторная работа №2**

### **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 каждых 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 3-4 °С. Пересевы культур проводят через определенные промежутки времени с таким расчетом, чтобы наилучшим образом сохранить физиолого-биохимические свойства штамма. Длительные промежутки между посевами недопустимы, так как микроорганизм в процессе роста и хранения потребляет из среды питательные вещества и накапливает продукты обмена, вредно влияющие на его свойства. При посевах 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 картофельно-мальтозный агар.

Известны способы хранения культур при температурах -11÷-14 °С. 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÷-196 °С. 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 сахаро-желатинную среду. Клетки микроорганизма помещают в стерильные ампулы, закрывают стерильными ватными тампонами и быстро замораживают при температурах  $-35 \div -78$  °С. 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 продукта. 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 25-35 °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 пронаблюдать 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.

## **Лабораторная работа №3**

### **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 sottomii* 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?

### **Лабораторная работа №4**

#### **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?

### **Лабораторная работа №5**

**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 липидов 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?

## **Лабораторная работа №6**

### **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 28-32°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 является максимальное сокращение длительности пребывания культуры гриба в сушилке до 5-8 минут при температуре продукта на выходе не выше 40-42°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  $\alpha$ -амилазы *Asp.oryzae*. Схема очистки и кристаллизации представлена на рисунке 5.

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 27-30°C, что увеличивает длительность и часто приводит к инфицированию культуры и инактивации ферментов.

Растворимые вещества, переходящие в экстракт, на 50% состоят 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 30-32°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 5-8°C, а водную вытяжку ферментов – до 5-6°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.

### **Лабораторная работа №7**

#### **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  $\text{CH}_3\text{COOH}$  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 schutzenbachi*, *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.

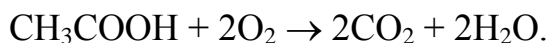
Для полученного микробиологическим путем уксуса характерны приятный аромат и вкус за счет образования в процессе брожения небольших количеств эфиров, например этилацетата, а также спиртов и кислот.

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. schutzenbachi*, для культуры *Bact. curvum* – 35-37 °С. Концентрация спирта в среде 7-15 %, конечная концентрация кислоты 8-14 % (в среднем 10%). Если в процессе брожения в среде кончается спирт, происходит окисление уксусной:



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 уксуснокислое 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 основной 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 м<sup>3</sup> 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  $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$ . Чаще всего они встречаются в молочных продуктах, на их деятельности основано получение простокваши, сметаны и других кисломолочных продуктов. Молочнокислые 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 45-50 °С. 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. 5).

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 48-50 °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 80-90 °С. Фильтрат упаривают до концентрации 27-30 %, затем охлаждают до 25-30 °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.

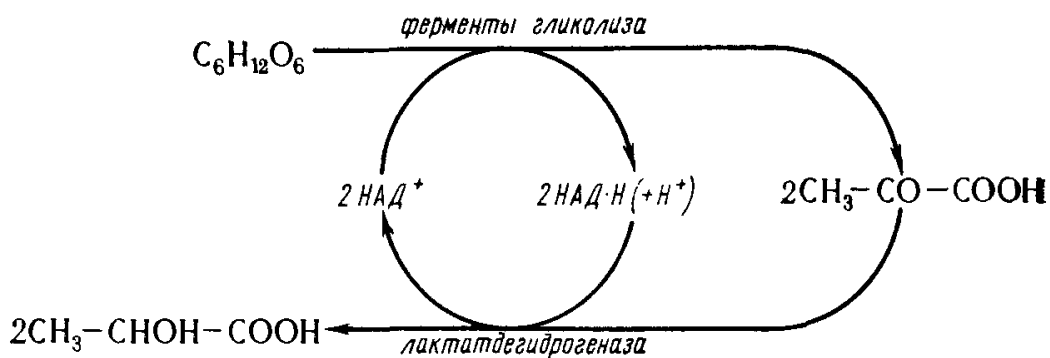
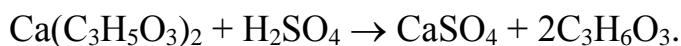


Рисунок 5 – Схема образования молочной кислоты

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



Для, отделения ионов железа сырец молочной кислоты при температуре 65 °С 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 пропионовокислые 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 В<sub>12</sub>.

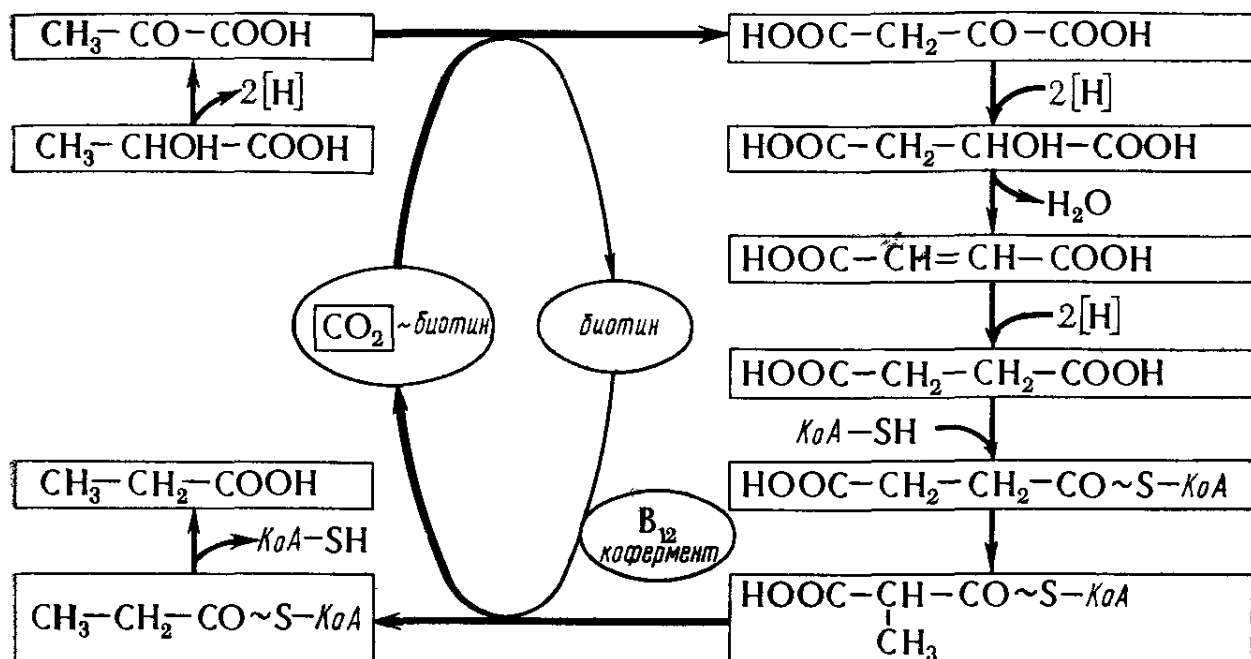


Рисунок 6 – Схема образования пропионовой кислоты

Пропионовую кислоту получают в анаэробных условиях методом глубинного культивирования (рис. 6). Используют среду, содержащую 2% глюкозы и источник органического азота, как, например, дрожжевой экстракт, а также соли молочной кислоты. Процесс идет в нейтральной среде (pH 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  $\text{CH}_2\text{COOH-COONH}_2\text{-CH}_2\text{COOH}$  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. Попав 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. 7).

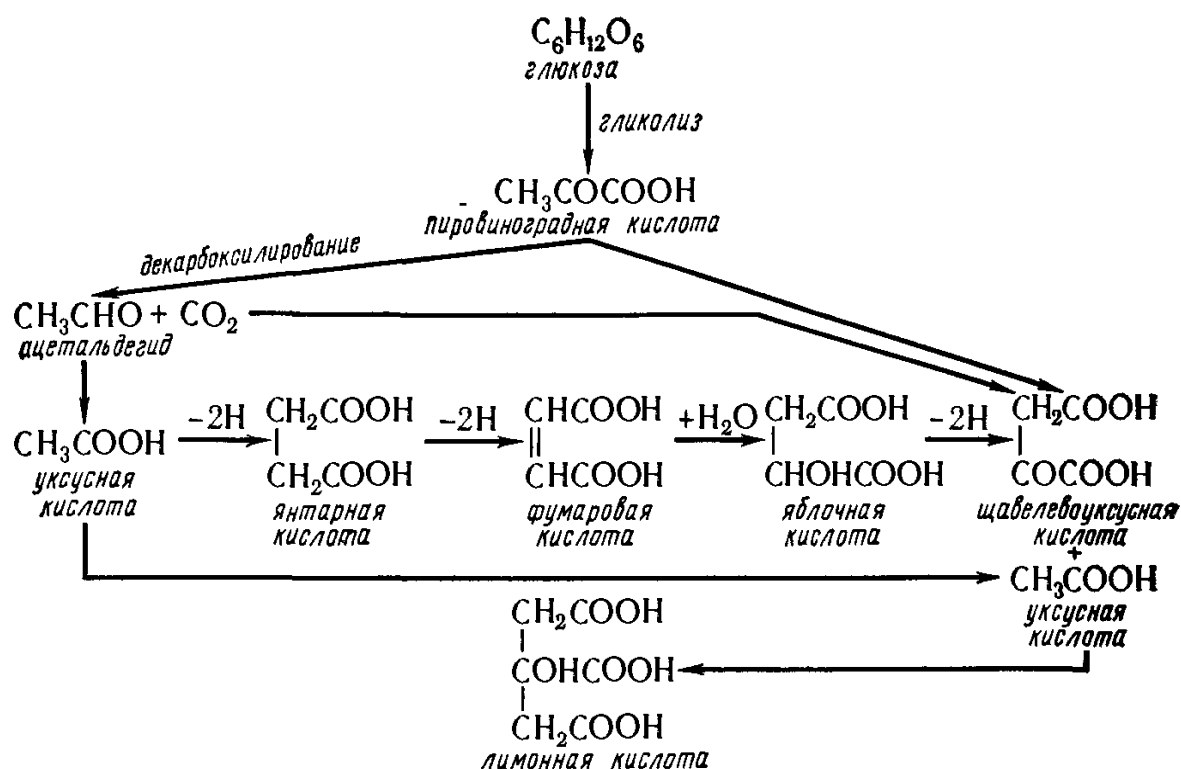


Рисунок 7 - Схема образования лимонной кислоты

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?

## **Лабораторная работа №8**

### **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. 1). По биологическому воздействию антибиотики делятся на антибактериальные (пенициллин, 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 1 – Наиболее широко применяемые антибиотики

<b>Антибиотики</b>	<b>Продуцент</b>	<b>Объект воздействия (бактерии)</b>	<b>Механизм действия</b>
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</i>	Грамположительные и	То же

	griseus	грамотрицательные	
Тетрациклин	Streptomyces ayerofaciens	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 25-27°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- 26°C, pH 5,0- 7,5, при

интенсивной 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 приспособляемость 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 – *Actinomyces 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 *Actinomyces*

lovendulae. Препарат производится в виде дутов 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.

### **Лабораторная работа №9**

#### **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 уксуснокислые 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 спириллы. 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 известь. Максимальная температура процесса зависит от мезофильности или термофильности микроорганизмов (30-40°C или 50-60°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.

### **Лабораторная работа №10**

#### **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  $(3\div 8) \times (6\div 14)$  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 солодовой среде при использовании колб на 100, 1000, 8000 мл, в которых выращивание дрожжей длится по 24 ч. Границы оптимальной температуры 28-32 °С, реакция среды pH 4,5-5,5.



Для ограничения бактериальной инфекции в начальных стадиях стараются использовать более низкую реакцию среды - рН 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 желателно 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% мелассы 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 выдержать 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 концентрации 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 м<sup>3</sup>/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 8-10 °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 30-40 °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. 41).

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.

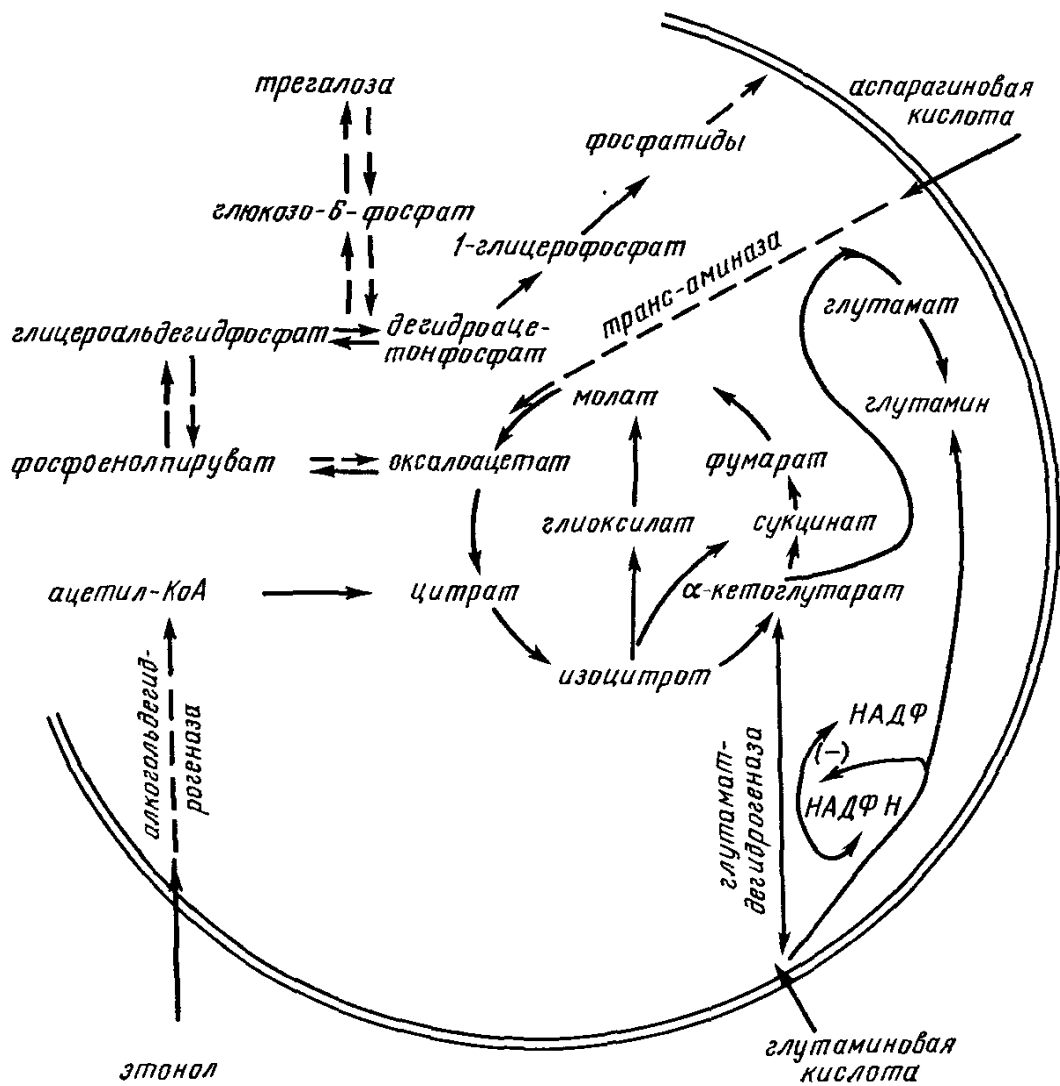


Рисунок 41 – Химизм использования этанола дрожжевой клеткой

### 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?

## ЛИТЕРАТУРА

1 Иванова, Л.А. Пищевая биотехнология. Кн. 2. Переработка растительного сырья: учебное пособие / Л.А. Иванова, Л.И. Войно, И.С. Иванова; под ред. И.М. Грачевой. - М.: КолосС, 2008. - 472 с.

2 Луканин, А.В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств [Электронный ресурс]: учебное пособие / А.В. Луканин. - М.: ИНФРА-М, 2017. - 304 с. - ЭБС «Znanium.com» - Режим доступа: <http://znanium.com/catalog.php?bookinfo=768026>

3 Неверова, О.А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения [Электронный ресурс]: учебник/ Неверова О.А., Гореликова Г.А., Позняковский В.М. - Саратов: Вузовское образование, 2014. - 415 с. - ЭБС «IPRbooks» - Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/4160.htm>

4 Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения [Электронный ресурс]: учебник/ О.А. Неверова и др. - М.: ИНФРА-М, 2014. - 318 с. - ЭБС «Znanium.com» - Режим доступа: <http://znanium.com/catalog.php?bookinfo=363762>

5 Введение в направление. Биотехнология [Электронный ресурс]: учебное пособие / Л. С. Дышлюк [и др.]. - Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2014. - 157 с. - ЭБС «IPRbooks» - Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/61262.html>

6 Рогов, И.А. Пищевая биотехнология: В 4-х кн. Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии [Электронный ресурс]: учебник / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Г.П. Шуваева - М.: КолосС, 2013. - 440 с. – ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа:

<http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN5953201044.html>

7 Неверова О.А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения: учебник/ О.А. Неверова, Г.А. Гореликова, В.М. Позняковский. - Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007

8 Иванова, Л.А. Пищевая биотехнология. Кн. 2: Переработка растительного сырья: учеб. пособие/ Л.А. Иванова, Л.И. Войно, И.С. Иванова; под ред. И.М. Грачевой. – М.: КолосС, 2008. – 472 с.

9 Виестур У.Э., Кристапсонк М.Ж., Быликина Е.С. Культивирование микроорганизмов. - М.: Пищевая промышленность, 1980.-231 с.

10 Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. - М.: Пищевая промышленность, 1976-248 с.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
Лабораторная работа № 1 .....	4
Лабораторная работа № 2 .....	7
Лабораторная работа № 3 .....	10
Лабораторная работа № 4 .....	11
Лабораторная работа № 5 .....	12
Лабораторная работа № 6 .....	14
Лабораторная работа № 7 .....	17
Лабораторная работа № 8 .....	22
Лабораторная работа № 9 .....	27
Лабораторная работа № 10 .....	29
ЛИТЕРАТУРА .....	34