

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение
высшего профессионального образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н. И. Вавилова»

ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИЙ В НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

краткий курс лекций

для аспирантов

Направление подготовки
06.06.01 Биологические науки

Профиль подготовки
Микробиология

Саратов 2014

УДК 57:66
ББК 36

Применение бактерий в народном хозяйстве: краткий курс лекций для аспирантов направления подготовки 06.06.01 «Биологические науки» / сост.: Щербаков А.А., Карпунина Л.В.// ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2014. – 55 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Применение бактерий в народном хозяйстве» составлен в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначен для аспирантов направления подготовки 06.06.01 «Биологические науки». Краткий курс лекций содержит теоретический материал по основным микробиологическим технологиям, применяемым в промышленности. Направлен на формирование у студентов знаний об основных закономерностях протекания микробиологических и ферментативных процессов в ходе производства различных целевых продуктов, на применение этих знаний в профессиональной деятельности.

УДК 57:66
ББК 36

© Щербаков А.А., Карпунина Л.В. 2014
© ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2014

ВВЕДЕНИЕ

Современный этап развития экономики характеризуется широким использованием в различных отраслях промышленности микроорганизмов; созданием новых технологий получения функциональных продуктов питания; разработкой экспресс-методов анализа качества пищевых продуктов, способов утилизации и обезвреживания отходов промышленных предприятий. Иными словами, с каждым годом растет объем и расширяется ассортимент продуктов питания, полученных с использованием бактерий.

Данный курс лекций ставит своей целью рассмотреть ферментативные и микробиологические технологии, применяемые в пищевой промышленности. Он раскрывает основные методы, применяемые для защиты окружающей среды, и включает в себя биоремедиацию, основные законы микробного синтеза, методы генетической инженерии, знакомит с биотехнологическими процессами утилизации отходов.

Лекция 1

ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИЙ В НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

1.1 Применение бактерий в пищевом и сельскохозяйственном производстве

Биотехнология используется для изготовления продуктов питания уже на протяжении более 8000 лет. Наличие на полках магазинов и в холодильнике хлеба, алкогольных напитков, уксуса, сыра, йогурта и многого другого мы обязаны ферментам, вырабатываемым различными микроорганизмами. Современная биотехнология постоянно оказывает влияние на пищевую промышленность посредством создания новых продуктов, а также снижения себестоимости и усовершенствования бактериальных процессов, с незапамятных пор используемых в производстве продуктов питания.

Биотехнология позволяет *улучшить качество, питательную ценность и безопасность* как сельскохозяйственных культур, так и продуктов животного происхождения, составляющих основу используемой пищевой промышленностью сырья. Кроме того, биотехнология предоставляет массу возможностей усовершенствования методов переработки сырья в конечные продукты: натуральные ароматизаторы и красители; новые технологические добавки, в том числе ферменты и эмульгаторы; заквасочные культуры; новые средства для утилизации отходов; экологически чистые производственные процессы; новые средства для обеспечения сохранения безопасности продуктов в процессе изготовления; и даже биоразрушаемую пластиковую упаковку, уничтожающую бактерии.

Улучшение качества сырья. Возделывание трансгенных культур первого поколения уже принесло фермерам неплохие доходы. Польза, которую при этом получил потребитель, не так очевидна, но не учитывать ее нельзя. Например, исследования показали, что кукуруза устойчивых к насекомым сортов (содержащих ген Bt-токсина) практически не повреждается насекомыми и, соответственно, менее подвержена грибковым заболеваниям, чем кукуруза обычных сортов. Таким образом, содержание синтезируемых этими возбудителями микотоксинов, некоторые из которых могут вызывать гибель скота и хроническое отравление людей, в растениях Bt-сортов гораздо ниже.

На современном рынке представлено большое количество полезных для здоровья растительных масел, получаемых с помощью биотехнологии. Биотехнология позволила ученым снизить содержание насыщенных жирных кислот в некоторых растительных маслах. Им также удалось осуществить трансформацию омега-6 полиненасыщенной линолевой жирной кислоты в омега-3 полиненасыщенную линоленовую, встречающуюся в основном в рыбе и способствующую снижению уровня холестерина в крови. Биотехнологи, работающие с животными, тоже занимаются поисками путей повышения качества продуктов питания. Уже создана говядина с пониженным содержанием жира и свинина с повышенным соотношением мяса/сало.

Повышение питательной ценности продуктов имеет особенно большое значение для развивающихся стран. Исследователи университета Неру (Нью-Дели) использовали ген южноафриканского растения амаранта для повышения содержания белка в клубнях картофеля. Трансгенный картофель также содержит большое количество незаменимых аминокислот, не входящих в состав клубней обычного картофеля. В качестве примеров можно также упомянуть «золотой рис» и масло канолы, обогащенные витамином А.

Дальнейшее усовершенствование «золотого риса» привело к повышению содержания в зернах легкоусваиваемых форм железа.

Биотехнология подает большие надежды и в улучшении показателей *продуктов функционального питания*. Программы разработки и внедрения на рынок нутрицевтиков – продуктов-лекарств, систематическое употребление которых оказывает регулирующее действие на определенные системы и органы организма, улучшая здоровье человека, приняты во многих странах. Такие продукты содержат повышенное по сравнению с обычными количество незаменимых аминокислот, витаминов, минералов и других биологически активных веществ. Биотехнология используется для повышения содержания этих и других полезных соединений в продуктах функционального питания. Например, исследователи университета Пердью (г. Лафейетт, штат Индиана) и Министерства сельского хозяйства США (USDA) создали сорт томатов, содержащий в три раза более высокий по сравнению с обычными сортами уровень антиоксиданта ликопена. Употребление ликопена снижает риск возникновения рака простаты и молочной железы, а также снижает содержание в крови «плохого» холестерина.

Качество продуктов. Биотехнологи занимаются улучшением качества растительного сырья также с точки зрения его привлекательности для покупателя и легкости приготовления. Ученые удлиняют срок хранения фруктов и овощей; делают морковь, паприку и сельдерей более хрустящими; создают не содержащие семян сорта дынь и винограда; продлевают длительность сезонно-географической доступности томатов, клубники и малины; улучшают вкусовые качества томатов, салата-латука, перца, зеленого горошка и картофеля; создают не содержащие кофеина сорта кофе и чая. Японские ученые идентифицировали фермент, заставляющий нас плакать во время резки лука, и таким образом уже сделали первый шаг на пути к созданию лука, от которого не плачут. Другой областью пищевой промышленности, экономически выигрывающей от повышения качества сырья, является производство молочных продуктов. Биотехнологические методы позволили новозеландским ученым добиться повышения содержания в молоке белка казеина – важного компонента процесса сыроварения – на 13%.

Пищевые добавки используются для повышения питательной ценности, удлинения срока хранения, изменения консистенции и усиления вкуса и аромата продуктов. Используемые производителями пищевые добавки, как правило, имеют растительное или бактериальное происхождение, например, синтезируемые бактериями ксантановая и гуаровая смолы. Многие аминокислотные добавки, усилители вкуса и витамины, добавляемые в пищевые продукты, производятся с помощью бактериальной ферментации. Со временем биотехнология должна обеспечить производителям пищевых продуктов возможность синтеза большого количества пищевых добавок, которые в настоящее время слишком дороги либо малодоступны из-за ограниченности природных источников этих соединений.

Безопасность сырья. Наиболее значимой проблемой безопасности сырья для производителей продуктов питания является микробное заражение, которое может возникнуть на любом этапе движения продукта от фермы до стола потребителя. Любой биотехнологический продукт, снижающий количество микроорганизмов на продуктах животного и растительного происхождения, существенно повышает безопасность сырья пищевой промышленности. Повышение безопасности продуктов за счет снижения микробной контаминации начинается с фермы. Устойчивые к вредителям и заболеваниям трансгенные сорта растений в значительно меньшей степени подвержены

бактериальному заражению. Новые биотехнологические методы диагностики позволяют выявлять характер бактериальных заболеваний на ранних этапах и с высокой степенью точности, что позволяет изымать и уничтожать заболевших животных или инфицированные растения до того, как болезнь распространилась.

1.2 Биотехнология в медицине и ветеринарии

Интерес к клеточным культурам беспозвоночных связан:

1. С разнообразием и оригинальностью роста и метаморфоза, которые могут быть объектом для изучения основных процессов клеточной дифференцировки и регуляции активности генов.

2. Вирусы могут размножаться только при использовании живых клеток насекомых, в связи с чем, для получения вирусных препаратов необходимым условием является предварительное разведение насекомых-хозяев. Использование клеточных культур беспозвоночных позволяет решить эту проблему. Для получения культуры клеток и тканей беспозвоночных используют эмбрионы, имагинальные диски и органы насекомых, гомоциты, яичники, жировые тела: имагинальные диски (зачатки взрослых органов насекомых) используют для изучения процессов дифференцировки *in vitro*; эмбрионы с удаленной оболочкой используют для изучения начальных стадий развития насекомых; отдельные органы для различных целей, например, слюнные железы *Diptera* (мух) - для изучения процессов пуффирования в политенных хромосомах (пуф вздутие хромосом при "включении" ДНК на транскрипцию, когда определенные участки ее раскручиваются и РНК-синтезирующие ферменты начинают синтез РНК; при линьке насекомых пуфы появляются в определенной последовательности). Лучшие источники для получения культивируемых клеток - личинки и куколки насекомых.

Методика получения первичных культур клеток насекомых включает следующие этапы: стерилизация поверхности насекомых и подлежащих культивированию тканей; диссоциация клеток; пересадка их на питательную среду.

Срок жизни первичных клеточных культур ограничен. Через определенное время культура стареет, что проявляется в грануляции цитоплазмы, сморщивании и округлении клеток, потери связей между клетками и твердым субстратом.

Поэтому одной из проблем вирусологов является получение стабильных клеточных линий, т. е. клеток, способных культивироваться на искусственных питательных средах до бесконечности. В настоящее время получены стабильные (перевиваемые) клеточные линии таких важных вредителей сельского и лесного хозяйства, как непарный шелкопряд, капустная метелковидка, хлопковая и табачная совка и др.

Среды для культивирования клеток и тканей насекомых сильно варьируют по составу. При составлении сред используются данные по составу гемолимфы. Среды отличаются от сред для клеток и тканей млекопитающих наличием органических кислот, повышенным содержанием аминокислот и более высоким осмотическим давлением.

Перспективно исследование методик культивирования клеток морских беспозвоночных, линии которых используются для получения биологически-активных веществ.

Клеточные культуры насекомых имеют ряд *преимуществ* по сравнению с клетками млекопитающих как объект биотехнологических производств: возможность культивирования при комнатной температуре, дешевизна культуральных сред, отсутствие необходимости в CO_2 инкубаторах, высокая плотность в культуре и

др. Культивирование органов. Органная культура - культивирование *in vitro* органа или части органа, в которых сохраняются анатомическая связь и функционирование тканей, максимально приближенные к таковым в условиях *in vivo*, то есть в организме. Миграция изолированных клеток на периферии экспланта подавляется специальными условиями культивирования, в результате чего могут даже образовываться дифференцированные структуры. Например, на периферии эксплантов легочной ткани развиваются новые мелкие бронхи, состоящие из альвеол, окаймленных бронхиальным эпителием.

Органная культура сохраняет межклеточные взаимодействия, в течение долгого периода поддерживает гистологическую и гистохимическую дифференцировку, как правило, остается в не растущем состоянии в течение нескольких дней и даже недель. Эти культуры не способны к размножению.

Ткани, зависимые от гормонов, сохраняют чувствительность к ним и характерные ответы, эндокринные органы продолжают секрецию специфических гормонов и т.д. Наибольшее сходство процессов морфогенеза *in vivo* и *in vitro* отмечено для эмбриональных тканей.

Исследования показали, что для предотвращения центральных некрозов в эксплантах пробирки должны быть заполнены кислородом, а большинство органов или их фрагментов, за исключением кожи, растут на твердом субстрате лучше, чем в жидкой среде.

Существует несколько видов техники культивирования органов. В качестве субстрата можно использовать сгусток плазмы. Этот способ был предложен Феллом и Робинсоном и получил название "техника часового стекла", став классической техникой морфогенетического анализа эмбриональных органов:

Культивирование проводят во впадине часового стекла на поверхности сгустка, состоящего из плазмы цыпленка и эмбрионального экстракта кур. Часовое стекло помещают в чашку Петри и закрывают сверху влажной ватой или фильтровальной бумагой для предотвращения высыхания. Культивируют в термостате при 37,5°C. Существуют модификации этого метода, при которых часовое стекло покрывается крышкой, приклеенной воском и другие. Недостатком метода, ограничивающим применение его в биологических исследованиях, является разжижение сгустка в окрестностях экспланта, который в результате оказывается в жидкости. Кроме того, сложный состав среды затрудняет проведение биохимических исследований.

Эти недостатки устраняются при использовании сгустка агара. Такая техника была предложена Спраттом. Метод основан на получении агарового геля 1-4% концентрации, основу которого составляют забуференные солевые растворы или питательные среды типа 199 с добавлением эмбриональной сыворотки.

Позднее Чен обнаружил, что культуры можно выращивать на бумажных плотиках, плавающих на поверхности жидкости в часовом стекле. С целью улучшения техники бумагу обрабатывали силиконом, комбинировали с миллиметровыми фильтрами, а затем перешли на плотики из ацетата вискозы. Этот материал хорошо растворяется в ацетоне, что облегчает подготовку ткани для гистологического анализа.

Метод культивирования на плотиках не лишен недостатков, основной из них - погружение ткани в среду при затоплении плотика. Решение этой проблемы было предложено Троувеллом, который предложил культивировать органы на поверхности металлической сетки. Сетка представляет собой квадрат размерами 25*25 мм с отогнутыми краями, образующими четыре ножки высотой около 4 мм. Скелетные

ткани культивируют непосредственно на сетке, тогда как мягкие вначале эксплантируются на бумагу, а затем помещаются на сетку.

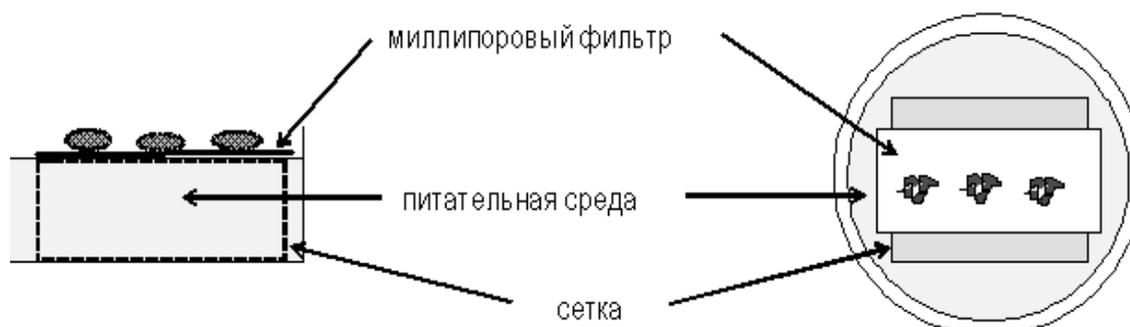


Рисунок 1. Модифицированный метод Троувелла (по И. Ласнитски)

Для длительного культивирования взрослых тканей человека, таких как эпителий бронхов и молочной железы, пищевод и др. был предложен метод поочередного культивирования в жидкой среде и газовой фазе. Для этого экспланты прикрепляются ко дну пластикового сосуда и покрываются средой. Сосуды помещают в камеру с определенным газовым составом, а камера помещается на качающуюся платформу.

Гибридизация животных клеток. Методы создания химер. Гибридные соматические клетки были получены путем смешения двух линий, выделенных ранее из 1 клетки мышинной саркомы. Исходные клеточные линии отличались от гибридных клеток по числу и морфологии хромосом, и по способности к образованию опухоли при введении их мышам. Гибридные клетки содержали поверхностные антигены клеток обеих родительских линий. Было установлено, что клеточные гибриды можно получить, используя клетки различных видов животных. В качестве агента, индуцирующего слияние клеток выступал инактивированный вирус NVJ, называемый вирусом Сендай. При изучении межвидовых гибридных клеток, способных к пролиферации были сделаны *два вывода*: в гибридах могут проявиться оба генома; в долгоживущих межвидовых гибридах элиминируются хромосомы одного вида.

До сих пор нерешенной остается одна из труднейших загадок биологии, состоящая в том, что мембраны, находящиеся внутри клетки сливаются часто, тогда как мембраны, разграничивающие клетки, сливаются редко. В то же время нормальные клетки в естественных условиях крайне редко сливаются друг с другом. Исключение составляет процесс оплодотворения. Кроме того, в качестве подобного рода исключения выступает процесс плазмогамии у высших грибов, когда одноядерные гаплоидные клетки сливаются, образуя двуядерные (дикарионы). Такие клетки размножаются митотически, оставаясь двуядерными, и в результате образуют плодовые тела.

В естественных условиях слияние клеток происходит и у млекопитающих. Например, клетки могут сливаться при формировании мышечных трубочек. Было показано, что миофибриллы поперечно-полосатых мышц образуются в поликарионах - крупных удлинённых многоядерных клетках. Поликарионы - продукт слияния одноядерных миобластов. Слияние опухолевых клеток - довольно обычное явление, при этом опухолевые клетки *in vivo* иногда сливаются и с нормальными. Эксперименты по спонтанному слиянию клеток проводились и *in vitro*. При проведении подобных экспериментов получают так называемых "химерных" или аллофеных мышей - животных, в тканях которых содержатся клетки различных генотипов:

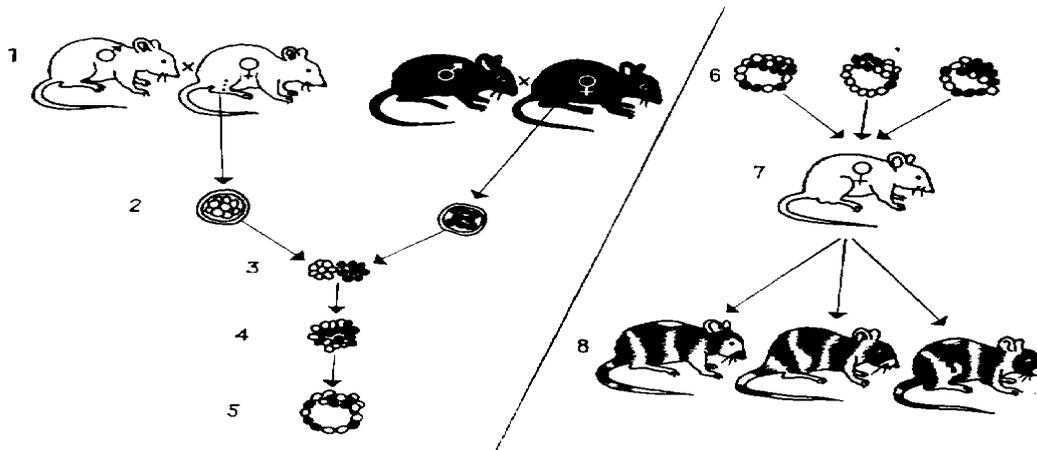


Рисунок 2. Получение аллофенных мышей

Методы создания химер. Агрегационный- был предложен практически одновременно и независимо друг от друга Тарковским в Варшаве и Минц в Филадельфии.

Из матки беременных самок-докторов извлекают зародыши, достигшие стадии 8 бластомеров. Бластомеры, полученные от двух животных с различными генотипами (например, от мышей с белой черной окраской шерсти) помещают в условия, способствующие их агрегации и образованию 16-ти клеточного зародыша. Такие составные зародыши развиваются *in vitro* до стадии бластоцисты, после чего их вводят в матку приемной матери, у которой предварительно вызывают ложную беременность путем введения соответствующих гормонов. В результате получают аллофенные мышата. Когда у мышонка появляется шерсть, окраска у него оказывается не белой или черной, как у родителей, а смешанной, с чередующимися черными и белыми пятнами или полосами. Это доказывает, что ткани животных-химер мозаичны, т.е. состоят из "белых" и "черных" клеток.

Внутренние ткани таких животных, естественно, также мозаичны, хотя это проявляется не так очевидно, как в случае окраски шерсти. Различия могут касаться белков, выполняющих ферментативную функцию: они могут катализировать одни и те же реакции у мышей-родителей, нуждаться в одних и тех же кофакторах, но при этом быть не идентичными, хотя и сходными. Такие белки называются изоферментами, и их можно разделить с помощью электрофореза. Агрегационные химеры можно получать не только между двумя эмбрионами, но и между различным числом изолированных бластомеров или отдельными частями эмбрионов. Масса химерных эмбрионов не больше обычной и подвержена действию механизмов эмбриональной регуляции. Преимущество метода - не требует вмешательства микрохирургической техники, поэтому широко используется в эмбриогенетике.

Инъекционный - был разработан Р. Гарднером. Используются эмбрионы на стадии бластоцисты. Бластоцисту фиксируют и, используя микроманипуляторы, вводят путем инъекции клетки внутриклеточной массы бластоцисты доноров в бластоцель эмбриона - реципиента. Этим методом можно инъектировать не только внутриклеточную массу ранних эмбрионов, но и более дифференцированные клетки.

Инъекционный метод нашел применение при получении межвидовых химер. Первые межвидовые химеры были получены между двумя ближайшими видами мышей, которые обычно не скрещиваются: *M. musculus* и *M. caroli*. Причем было отмечено, что химерные эмбрионы, полученные инъекционным методом, нормально

развивались только при пересадке их в матку того вида, чья бластоциста была использована в качестве реципиента. Например, в бластоцисту *M. musculus* вводили внутриклеточную массу эмбриона *M. caroli*. Полученные химеры имплантировались в матку *M. musculus* и благополучно развивались там, а в организме *M. caroli* погибали спустя две недели.

Межвидовые химерные зародыши между мышью и крысой путем агрегации были получены только в 70-х годах. Первые химерные животные были получены только в 1973 году Р. Гарднером и М. Джонсоном. Успех этих экспериментов позволил приступить в 80-х годах к созданию химерных сельскохозяйственных животных. Выяснилось, что агрегационный метод неприемлем для получения химер крупного рогатого скота. Химер телят *Bos indicus* + *Bos taurus* удалось получить только инъекционным методом.

В 1984 году были получены межвидовые химеры между овцой и козой - овцекозы. Половым путем овцы и козы не скрещиваются, так как имеют разный набор хромосом: коза $2n = 60$, овца $2n = 54$. В ФРГ в 1985 году были получены химерные телята после агрегации половинок 32-клеточных эмбрионов от коров швицкой (бурой) и голштино-фризской пород. В фенотипе химер сочетались обе масти - бурая и черно-пестрая.

Химерные животные не передают потомкам генетическую мозаичность. У них происходит расщепление, как у гетерозигот, поэтому ценные генетические комбинации нарушаются. Но на протяжении 1 поколения хозяйственно ценные признаки поддерживаются, поэтому можно, например, сочетать как молочную, так и мясную продуктивность.

Химерность довольно часто встречается и у растений. Она существует в скрытом виде, не проявляясь фенотипически. Однако пластидные мутации позволяют увидеть ее непосредственно на растении. Чаще всего спонтанная химерность наблюдается у гетерозиготных растений. Различные клеточные типы четко разделены в пространстве, образуя отдельные слои при делении апикальных меристем. Примером видимой мутации хлоропластов и образования химерного растения является пестролистность или появление секторов ткани другого цвета.

Трансплантация эмбрионов. Трансплантация эмбрионов является одной из наиболее актуальных проблем в области животноводства. С помощью пересадки эмбрионов можно резко увеличить выход числа потомков от высокопродуктивных коров. Трансплантация эмбрионов, или эмбриотехнология, заключается в получении одного или нескольких эмбрионов из матки племенных животных (доноров) и пересадке в матку коров (реципиентов), где эмбрионы развиваются до отела. Этот метод в сочетании с суперовуляцией у доноров позволяет получить большое потомство от высокопродуктивных животных. Этим способом эмбрионы можно внедрить в ту или иную породу в другие регионы, используя в качестве реципиентов коров мясных пород. Применение этого метода также упрощает обмен генофондом сельскохозяйственных животных между странами и континентами. Пересадка эмбрионов может быть использована для получения потомства от ценных, но бесплодных коров, утративших способность к размножению в результате несчастного случая, болезни или по возрасту. Трансплантация может быть использована и для временного хранения эмбрионов (например, яйцеводах крольчих удается осуществлять трансконтинентальную перевозку эмбрионов овец).

Трансплантацию производят с помощью специального зонда или пистолета для осеменения.

Регулирование пола. В практике разведения животных очень важно научиться управлять образованием в потомстве мужских и женских особей. Метод разделения эмбрионов по полу основан на определении белков, специфичных для самцов. Этот метод широко применяется в животноводческой практике многих стран. В Канаде уже с 1975 года рождаются телята, разделенные по полу на стадии эмбрионов. В перспективе для целенаправленного получения особей мужского или женского пола может быть применен метод микрохирургической замены X и Y хромосом. Такие манипуляции уже проводились на растительных клетках и яйцеклетках земноводных.

1.3 Использование бактерий при решении проблем охраны окружающей среды

В настоящее время экологическая биотехнология является одной из значимых отраслей биотехнологии. Непродуманная в ряде случаев деятельность человека оказывает на окружающую среду мощное техногенное воздействие, что сопровождается загрязнением почвы, воды, всей биосферы отходами производств и жизнедеятельности. Бурный научно-технический прогресс имеет и «вторую сторону медали» - большой объем разнообразных отходов, с переработкой которых мы просто не справляемся.

Особенно значительная роль в загрязнении окружающей среды принадлежит органическим отходам. В результате загрязнения почвы и воды органическими веществами подавляется естественная биота, изменяются соотношения между отдельными группами микроорганизмов, направление их метаболизма, ослабляются естественные процессы самоочищения. В районах постоянных загрязнений нарушаются процессы почвообразования, в почве и воде накапливаются неразлагаемые отходы. В загрязненной экосистеме с подавленной полезной микрофлорой развиваются патогенные микроорганизмы. Техногенные и антропогенные нарушения экологического баланса серьезно изменяют санитарное состояние в месте их образования, ухудшают условия жизнеобитания людей. В настоящее время только биотехнологическая конверсия отходов может обеспечить, с одной стороны, выравнивание экологических нагрузок антропогенной деятельности на окружающую среду, а с другой – получение практически значимых веществ различного назначения (биологически активные соединения, органические удобрения и т. д.). Одним из перспективных направлений в этом отношении является использование биотехнологических систем.

Одна из главных экономически выгодных задач технологий, связанных с окружающей средой, — это сохранение природных ресурсов путем повторного использования полезных веществ, содержащихся в отходах. Некоторые уже получили финансовую поддержку со стороны правительств и это принесло свои плоды, но все же пока выход конечных продуктов и стоимость повторного использования биомассы в широких масштабах таковы, что эта технология оказывается экономически невыгодной. Тем не менее, она может найти применение при получении таких, ценных продуктов, как масла, металлы, витамины и пептиды. Получение полезных материалов из отходов имеет два аспекта – извлечение и/или концентрирование полезных веществ из отходов и превращение отходов в полезные материалы.

В целом, усилия экологической биотехнологии концентрируются на трех основных направлениях: 1) биodeградация и биотрансформация органических и неорганических х отходов; 2) возобновление ресурсов; 3) получение ценных видов органического топлива.

Безусловно, в рамках одной лекции рассмотреть все аспекты экологической биотехнологии просто невозможно (да и не стоит дублировать самостоятельный курс «Экологическая биотехнология»), приведем ряд примеров биodeградации и биотрансформации органических отходов с целью получения возобновляемых ресурсов (отметим, что такой экономический значимый аспект экологической биотехнологии, как переработка отходов с целью получения биотоплива, будет нами подробно рассмотрен в следующей лекции).

Биodeградация и биотрансформация отходов. *Биodeградация органических соединений*, загрязняющих окружающую среду, оправдана только в том случае, если в результате происходит их полная минерализация, разрушение и детоксикация, если же биохимическая модификация этих соединений приводит к повышению их токсичности или увеличивает время нахождения в среде, она становится не только нецелесообразной, но даже вредной.

Рассмотрим процессы биodeградации сложных смесей углеводов и их производных в средах, *загрязненных нефтью*. Источники таких загрязнений могут быть самые разнообразные: промывка корабельных бункеров для горючего, аварии на танкерах в открытом море (основная причина нефтяных загрязнений окружающей среды), утечки в нефтехранилищах и сброс отработанных нефтепродуктов. Сточные воды нефтяной промышленности обычно очищают биологическим способом после удаления большей части нефти физическими способами или с помощью коагулянтов.

С помощью генетического конструирования создан «супермикроб», способный утилизировать большинство основных углеводов нефти. Многие природные штаммы *Pseudomonas putida* несут катаболические плазмиды, каждая из которых кодирует фермент для расщепления одного класса углеводов – плазида ОСТ обуславливает расщепление октана, гексана, декана; ХУЛ – ксилола и толуола; САМ – камфары, НАН – нафталина. Плазмиды САМ и НАН сами способствуют своему переносу, стимулируя спаривание бактерий. В результате последовательных скрещиваний был получен «суперштамм», несущий плазмиды ХУЛ и НАН и гибридную плазмиду, содержащую части плазмид ОСТ и САМ. Этот штамм способен быстро расти на неочищенной нефти, так как он метаболизирует углеводороды гораздо активнее, чем любой из штаммов, содержащих только одну плазмиду. Такие микроорганизмы удобно использовать для очистки нефтяных пятен на суше или море при различных авариях. Для большей эффективности создают микроэмульсию, содержащую бактериальные штаммы и капсулы со смесью основных питательных элементов - азота, фосфора и калия внутри. Добавление этих веществ стимулирует размножение бактериальных штаммов. Применение такого метода позволяет очистить от 70 до 90% загрязненной поверхности, за это же время очищается всего порядка 10-20% необработанной поверхности.

Важной проблемой является биodeградация ксенобиотиков. Напомним, что это за соединения. *Ксенобиотики* – чужеродные для организмов соединения (пестициды, ПАВ, красители, лекарственные вещества и пр.), которые практически не включаются в элементные циклы углерода, азота, серы или фосфора. Деградация ксенобиотиков может происходить в результате как физических, так и химических процессов. Биологическая трансформация соединений, попавших в окружающую среду, может протекать в различных направлениях, приводя к минерализации, накоплению или полимеризации. Преимущество бактериальной очистки по сравнению с химической в том, что она не вызывает появления нового загрязняющего агента в окружающей среде.

Для биодegradации ксенобиотиков лучше использовать ассоциации микроорганизмов, так как они более эффективны, чем отдельно взятые виды. При этом типы связей в подобной ассоциации могут быть различны. Некоторые микроорганизмы способны изменять молекулу ксенобиотика и делать ее доступной и привлекательной для других микроорганизмов («кометаболизм»). Примером может служить разложение инсектицида паратиона под действием двух штаммов *Pseudomonas* – *P. aeruginosa* и *P. stutzeri*. В некоторых случаях происходит неполное превращение молекулы ксенобиотика - фосфорилирование, метилирование, ацетилирование и т. д., результатом которого является утрата этим веществом токсичности.

Одним из сильных загрязнителей является ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). Причина в том, что ЭДТА связывает тяжелые металлы, способствуя их накоплению в почве. Бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus* способны за две недели разрушить все связи комплекса Fe-ЭДТА. Эти бактерии успешно применяются для очистки бытовых сточных вод, куда попадают детергенты моющих средств. Кроме *Pseudomonas*, биодegradацию ксенобиотиков могут осуществлять и представители родов *Acinetobacter*, *Metviosinus*.

Однако, в некоторых случаях внесение этих микроорганизмов в почву может изменить экосистему местности. Избежать этого можно ограничивая время жизнедеятельности бактерий. Например, облучая штаммы ультрафиолетом, получили мутант, ауксотрофный по лейцину. Бактерии размножают в питательной среде, содержащей лейцин. Суспензией микроорганизмов в питательной среде пропитывают древесную стружку, которую разбрасывают по загрязненной территории. Количество лейцина рассчитывается на время, достаточное для уничтожения вредных примесей, поэтому после очистки мутантные штаммы гибнут.

Еще эффективнее, чем бактерии, справляются с почвенными загрязнителями грибы. Они могут разрушать такие вещества, как пентахлорбензол, пентахлорофенол. В одном из экспериментов грибами обработали около 10000 тонн почвы с территории деревоперерабатывающего комплекса. В этой почве содержание пентахлорофенола достигало 700 мг/кг, но за год деятельности оно снизилось до 10 мг/кг, что является допустимой нормой. Бактерии смогли бы переработать эту почву лишь за 4-5 лет. Грибы активны и зимой, разрушают высокомолекулярные полиароматические углеводороды, действуют внеклеточно, выделяя неспецифические ферменты. Стоимость грибной и бактериальной очистки одинаковы, но применение грибов позволяет сокращать сроки дegradации и существенно удешевляет ее.

В основе биологической дegradации *лигноцеллюлозы* лежит действие целлюлолитических ферментов. Реакционная способность природных целлюлозосодержащих материалов невелика, поэтому сырье для ферментативного осахаривания целлюлозы должно иметь большую поверхность, а микрофибриллярная структура целлюлозы должна быть разрушена. Реакционную способность природных субстратов также снижает наличие лигнина. Наиболее эффективным, а также дорогим и энергоемким способом предварительной подготовки сырья является размол. Поэтому для предобработки используют воздействие 0.5-2% растворов щелочи, гамма-облучение, механо-термообработку в разбавленной серной кислоте с последующей экстракцией лигнина и др. методы.

Гидролиз можно проводить и биологическим способом, с помощью ферментов, выделяемых грибами видов *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Sporotrichum*. Далее при использовании дрожжей можно получить спирт, при использовании бактерий *Klebsiella* или *Aeromonas* - бутанол. Ряд микроорганизмов рода *Clostridium* могут продуцировать

уксусную и молочную кислоты, лактат, ацетон из опилок, соломы, отходов сахарного тростника. С помощью *Trichoderma reesii* биомасса разлагается до сахаров.

Ферменты и неразложившаяся целлюлоза поступают в повторные циклы, а остаточный лигнин используется в качестве источника энергии для перегонки спирта. Технология, разработанная в Арканзасском университете и используемая в промышленности нефтяной компанией «Галф ойл», заключается в одновременном осахаривании целлюлозы и сбраживании сахаров, полученных путем гидролиза. Для этого к смеси целлюлозной биомассы и дрожжей добавляют раствор целлюлаз. Остающийся лигнин также используется для перегонки в качестве топлива, но пентозы не сбраживаются. Фирма «Био фьюэл индастриз» из Ричмонда намерена построить в шт. Вирджиния фабрику, на которой в 1985 г. будет производиться 500 т этилового спирта в сутки из 2500 т целлюлозных отходов посредством этой технологии и целлюлаз из *Trichoderma reesii*.

При микробной деградации и конверсии целлюлоз и гемицеллюлоз можно получать этиловый спирт и сырье для химической промышленности (фурфурол, фенолы, крезолы). 200 000 т надлежащим образом переработанной соломы дают 50 000 т этанола и 20 000 т фурфурола. По оценкам некоторых специалистов, при микробной переработке целлюлозы можно получить до 30% нефтехимикатов. Методы генной инженерии помогут создать штаммы, которые будут лучше адаптированы к этим типам конверсии и дадут больший выход. Это позволит разработать реальную стратегию замещения, которая станет эффективной после 2000 г. (к тому времени химия углерода придет на смену нефтехимии при производстве новых биополимеров, биорастворителей и биодетергентов).

Интересными разработками нашей кафедры в данном направлении является биотрансформация соломы и пивной дробины. Показано, что под действием консорциума микроорганизмов (препараты «Байкал-ЭМ1», «Экофренд») эти трудноразлагаемые отходы «фрментировались» в неплохую кормовую добавку для сельскохозяйственных животных.

Итак, использование достижений в биотехнологии для переработки отходов и предотвращения загрязнения окружающей среды является весьма перспективным.

Вопросы для самоконтроля

1. С чем связан интерес к клеточным культурам беспозвоночных?
2. Что используют для получения культуры клеток и тканей беспозвоночных?
3. Проблемы и перспективы методики получения первичных культур клеток насекомых.
4. Расскажите технику культивирования органов. Какие ее виды вы знаете?
6. Назовите отличия гибридных клеток от исходных клеточных линий.
7. Какие методы создания химер вы знаете.
8. В чем сущность и основные проблемы трансплантации эмбрионов.
9. Каковы основные проблемы экологии? С чем они связаны?
10. Основные направления экологической биотехнологии. В чем заключается экономически выгодная переработка отходов?
11. Приведите примеры биообъектов, используемых для биodeградации нефтяных загрязнений.
12. В чем особенности биodeградации ксенобиотиков? Приведите примеры штаммов-продуцентов, участвующих в переработке ксенобиотиков.
13. В чем заключаются особенности биопереработки целлюлозосодержщих отходов?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии)/В.А. Блинов. – Саратов: ОГУП РИК «Полиграфия Поволжья», 2003. – 196 с.
2. **Шевелуха, В.С.** Сельскохозяйственная биотехнология/В.С. Шевелуха, Е.А.Калашникова, Е.С.Воронин. – М., 2003. – 469 с.
3. **Егорова, Т. А.** Основы биотехнологии / Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. — М.: Издательский центр «Академия», 2003. — 208 с.
4. www.biotechnolog.ru/ Кузьмина Н.А.
5. <http://ru.wikipedia.org/wiki/>
6. <http://www.advantageaustria.org.ru>
7. <http://smi-svoi.ru>

Дополнительная

1. Биотехнология: свершения и надежды/Под ред В. Г. Дебабова. — М.: Мир, 1987.— 411 с.
2. Биотехнология. Принципы и применение /Под. ред. И. Хиггинса, Д. Беста и Дж. Джонса. — М: Мир, 1988. — 480 с.
3. *Журналы: «Биотехнология»*

Лекция 2

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В БРОДИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДСТВАХ

2.1. Микроорганизмы, используемые при производстве пива

В пивоварении применяют специальные расы дрожжей-сахаромицетов, которые относятся к царству грибов *Mycota*, отделу *Eumycotai* классу *Ascomycetes*, семейству *Saccharomycetaceae*, роду *Saccharomyces*, виду *cerevisiae*.

Эмиль Христиан Ганзен в конце IX в. применил название *S. cerevisiae* (от кельтского *cervesa* – пиво) к верховым пивным дрожжам, используемым британской и германской промышленностью, в то время как низовым дрожжам он дал видовое название *S. carlsbergensis* (указывает на пивоваренный завод Carlsberg в Копенгагене).

В пивоварении применяют специальные расы (штаммы) дрожжей, выращенные в определенных производственных условиях.

Для сохранения жизнеспособности и характерных свойств штаммов требуются специальные методы хранения и консервирования. В связи с этим предназначенные для хранения чистые культуры дрожжей после изоляции и проверки их технологических свойств должны постоянно пересеваться на свежие питательные среды во избежание изменения их биохимических свойств, морфологии и токсичности.

Для хранения используемых в пивоварении штаммов дрожжей лучше всего себя зарекомендовали плотные питательные среды. Каждую расу (штамм) дрожжей пересевают в две пробирки со скошенным сусло-агаром, одна из которых используется в качестве рабочей культуры. Чистую культуру необходимо пересевать через 3-4 нед. со скошенного агара на жидкую питательную среду. Другая пробирка служит резервной, предназначенной для длительного хранения культуры. Ее следует покрыть слоем парафина, который предотвращает высыхание питательной среды. Культуры дрожжей хранятся при температуре 5 °С. Их следует обновлять каждые 6 мес.

Под влиянием дрожжей формируются тип пива и его качество. Для производства пива большое значение имеют морфолого-биохимические особенности, физиологические свойства дрожжей и условия их жизнедеятельности.

Морфолого-биохимические особенности пивных дрожжей. Клетки пивных дрожжей имеют овальную, яйцевидную или эллиптическую форму. Средние размеры их колеблются от 6 до 12 мкм в длину и от 4 до 8 мкм в диаметре.

Форма и размеры клеток зависят от возраста культуры, ее физиологического состояния и химического состава сусла. В зрелой культуре наряду с продолговатыми клетками всегда присутствует некоторое количество мелких круглых клеток.

Структура цитоплазмы дрожжевых клеток зависит от их возраста и присутствия в среде кислорода. В аэробных условиях «дышащие» клетки не имеют, как правило, вакуолей. В анаэробных условиях у «бродящих» клеток вакуоли то появляются, то исчезают.

Физиологические свойства пивных дрожжей. Дрожжи различаются характером брожения, температурой развития, потребностью в кислороде, скоростью размножения, биологическими и технологическими особенностями. Для получения пива высокого качества пивные дрожжи должны интенсивно сбраживать сусло, иметь высокую флокуляционную способность, плотно и полно оседать на дно бродительных аппаратов по окончании главного брожения и в конце дображивания, умеренно размножаться,

быть стойкими к автолизу, действию посторонних микроорганизмов, обработке антимикробными веществами, обеспечивать постоянство свойств и морфолого-физиологических характеристик в течение 10-12 генераций и более, сообщать пиву вкусовые и ароматические качества, свойственные определенному сорту.

В России при использовании верховых дрожжей производят в основном пшеничное пиво. Большой популярностью пользуется лагерное пиво, поэтому в отечественном пивоварении в основном получают лагерное пиво, для которого используют расы (штаммы) дрожжей низового брожения, обладающие различными свойствами.

Пивные дрожжи отличаются также метаболическими путями дыхания и спектром цитохромов. Дрожжи низового брожения обладают слабой дыхательной активностью, и энергетический обмен веществ у них происходит в основном путем брожения. Дрожжи верхового брожения богаче ферментами, у них выражен дыхательный обмен веществ, поэтому они размножаются интенсивнее, чем дрожжи низового брожения.

Потребность в кислороде у разных штаммов дрожжей колеблется в пределах от 2 до 30 мг/л. Дрожжи, находившиеся до брожения длительное время в контакте с кислородом, нормально растут и бродят независимо от содержания кислорода в сусле. При использовании осадочных дрожжей, полученных непосредственно после перекачивания молодого пива, свежее сусло, поступающее в бродильные аппараты, необходимо аэрировать достаточным количеством кислорода.

Наиболее важное физиологическое отличие дрожжей верхового и низового брожения заключается в том, что дрожжи верхового брожения сбраживают не встречающийся в сусле трисахарид раффинозу (фруктоза—глюкоза—галактоза) только на 1/3, поскольку у них отсутствует фермент мелибиаза, расщепляющая дисахарид мелибиозу (глюкоза — галактоза). Дрожжи низового брожения сбраживают мелибиозу полностью.

Хлопьевидные дрожжи в конце брожения слипаются в комки (флокулы) и либо оседают на дно аппарата, образуя плотный осадок, либо поднимаются на поверхность и удаляются из бродящего сусла. Хлопьевидные дрожжи менее полно выбраживают сусло, чем пылевидные, и образуют меньшую мутность. Дрожжи верхового брожения всплывают на поверхность в виде шапки. Это происходит в результате того, что дочерние клетки после окончания почкования не отделяются от материнских, а образуют скопления (агломераты), которые пузырьками CO₂ выносятся на поверхность.

Пылевидные дрожжи равномерно рассеяны в сусле и находятся во взвешенном состоянии до конца брожения. Они глубоко выбраживают сусло, мельче, легче хлопьевидных, подвержены автолизу, дают меньший прирост биомассы.

Вопросы для самоконтроля

1. Микроорганизмы, используемые при производстве пива
2. Морфолого-биохимические особенности пивных дрожжей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Ильяшенко, Н.Г. Микробиология пищевых производств / Н.Г. Ильяшенко, Е.А. Бетева, Т.В. Пичугина, А.В. Ильяшенко. – М.: КолосС, 2008. – 412 с.
2. Пищевая биотехнология. Кн. 2. Переработка растительного сырья/Под ред. И.М.Грачевой. – М.: КолосС, 2008.-472 с.

Дополнительная

1. Кислухина, О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов / О.В. Кислухина. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 336 с.
2. Рогов, И.А. Пищевая биотехнология / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Г.П. Шуваева. Кн. 1. – М.: КолосС, 2004. – 440 с.

Лекция 3

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ, ПРОТЕКАЮЩИЕ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СПИРТА

3.1 Микроорганизмы, используемые в производстве спирта

При производстве этилового спирта используют дрожжи – возбудители спиртового брожения и мицелиальные грибы – продуценты гидролитических ферментов, обуславливающих гидролиз крахмала, декстринов, белков и некрахмальных полисахаридов.

Дрожжи. Этиловый спирт получают с помощью дрожжей класса *Ascomycetes*, в основном вида *Saccharomyces cerevisiae* и некоторых рас вида *Schizosaccharomyces pombe*. Основным способом размножения дрожжей *S. cerevisiae* в производственных условиях – почкование, а *S. pombe* – деление. Дрожжи, применяемые в спиртовом производстве, должны обладать высокой скоростью размножения, высокой бродильной активностью, глубоко выбраживать субстраты; они должны быть устойчивы к высоким концентрациям сахара и спирта, продуктам собственного обмена веществ, воздействию посторонних микроорганизмов и продуктов их метаболизма, повышенным температурам, высокой кислотности среды и переносить обработку серной кислотой в процессе очистки их от посторонних микроорганизмов.

Сырье, используемое в производстве спирта, предъявляет к дрожжам свои требования. Так, дрожжи для переработки крахмалистого сырья должны сбраживать содержащиеся в нем моно- и дисахариды с образованием в среде сравнительно высокой концентрации спирта. Для сбраживания мелассы они должны переносить высокие концентрации солей и сухих веществ, содержащихся в сусле, полностью сбраживать раффинузу.

При выделении дрожжей из зрелой бражки и использовании их в хлебопекарном производстве они должны отвечать требованиям, предъявляемым к хлебопекарным дрожжам по стойкости при хранении, подъемной силе, зимазной и мальтазной активностям.

По морфологическим свойствам расы дрожжей для производства спирта из крахмалосодержащего сырья и из мелассы одинаковы. Однако они различаются по биохимическим свойствам. В связи с этим при переработке крахмалосодержащего сырья используют одни расы, а при использовании мелассы или других сахаросодержащих материалов – другие.

В последние годы ряд фирм предлагает для использования в производстве спирта сушеные дрожжи *S. cerevisiae*, применяемые, как правило, в качестве хлебопекарных, а также при производстве пива и спирта. По данным производителей, эти дрожжи сохраняют высокую стабильность при сушке, устойчивы к повышенным температурным режимам при сбраживании зернового сусла, к воздействию посторонних микроорганизмов, спиртоустойчивы (выдерживают 14 об.% спирта), отличаются высокой скоростью роста.

Исследованиями, проведенными во ВНИИПБТ, было выявлено, что испытанные сушеные дрожжи уступают по бродильной активности и термотолерантности спиртовым дрожжам 985Т. Они не позволяют достичь необходимой полноты сбраживания зернового сырья при повышенной температуре. По технологическим

показателям бражки и качеству получаемого спирта они также уступают дрожжам промышленной термотолерантной расы 985Т.

Использование сушеных дрожжей целесообразно на спиртовых заводах в качестве оперативного средства в тех случаях, когда требуется срочная замена дрожжей в производстве, но нет условий для разведения чистой культуры.

3.2 Микроорганизмы-продуценты гидролитических ферментов

В спиртовой промышленности, перерабатывающей крахмалистое сырье, широко применяют ферменты, гидролизующие крахмал, декстрины, белки и некрахмальные полисахариды. Для этой цели используют зерновой солод (солодовое молоко) и ферментные препараты микробного происхождения. Зерновой солод осуществляет гидролиз крахмала до сбраживаемых углеводов. Ферменты солода производят частичную деструкцию клеточных стенок крахмалистого сырья и белковых веществ, снабжая дрожжевые клетки азотистыми веществами.

В настоящее время большинство спиртовых заводов вместо дорогостоящей смеси солодов перешли на использование в качестве осахаривающих и гидролизующих белковые вещества материалов ферментов микробного происхождения.

За последние годы в нашей стране значительно изменился состав зернового сырья, перерабатываемого на пищевой этиловый спирт. Наиболее широко распространенными культурами стали рожь, ячмень и зерносмеси с преобладающим количеством в них этих культур. Переработку пшеницы на спирт проводили в ограниченных количествах и преимущественно в южных регионах. Изменился и углеводный состав перерабатываемых зерновых культур за счет увеличения в нем доли некрахмалистых полисахаридов.

Применение комплекса правильно подобранных высококачественных ферментов разного спектра действия способствует эффективному использованию всех высокомолекулярных полимеров зернового сырья в целях его экономии и повышения выхода конечного продукта – спирта.

Все ферментные препараты, предназначенные для спиртовой промышленности, можно разделить на три основные группы по специфичности их воздействия на различные высокомолекулярные полимеры зернового сырья.

К первой группе относятся ферментные препараты амилолитического действия (разжижающее, декстринирующее и осахаривающее), способствующие гидролизу крахмала. Это бактериальные и грибные амилазы, грибные глюкоамилазы и пуллулазы.

Ко второй группе относятся протеолитические ферменты, гидролизующие белковые полимеры зерна, – бактериальные протеиназы (нейтральные и щелочные, гидролизующие белки до пептидов) и грибные протеазы (гидролизуют белки до коротких пептидов и свободных аминокислот, ассимилируемых дрожжами).

К третьей группе относятся ферментные препараты целлюло-литического действия, гидролизующие некрахмальные полисахариды зернового сырья, которые, кроме того, снижают вязкость сусла, повышают доступность крахмала действию амилолитических ферментов.

Чаще всего в качестве продуцентов ферментов в спиртовом производстве используют мицелиальные грибы, спорообразующие бактерии и реже дрожжи. Микробные ферментные препараты применяют в виде естественной культуры – сухой поверхностной или жидкой глубинной, а также в виде концентрированных препаратов.

Штаммы-продуценты гидролитических ферментов, применяемых в качестве источников разжижающего, декстринирующего и осаживающего воздействия на крахмал, должны обладать и высокими сопутствующими протеолитической и целлюлозолитической активностями.

Среди продуцентов амилаз грибного происхождения при поверхностном культивировании используют аскомицетовые грибы *Aspergillusoryzae*, *A. awamori*, при глубинном – *A. niger*, *A. usamii*, *A. batatae*, *A. awamori* 446, *A. awamori* ВУД-Т2. Разные продуценты характеризуются эффективностью воздействия на крахмал и количественным и качественным составом конечных продуктов гидролиза – крахмала.

Спорообразующие палочковидные бактерии *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* и *B. stearothermophilus* при культивировании в глубинных условиях способны синтезировать активные амилазы и протеиназы. Амилолитические ферменты синтезируются также некоторыми дрожжами и дрожжеподобными грибами. В спиртовом производстве используют *Endomycopsis sp.* 20-9 и *E. bispora*, выращиваемые глубинным способом и продуцирующие главным образом активную глюкоамилазу; их амилазная активность проявляется слабо. В спиртовом производстве применяют обычно смесь ферментных препаратов бактериального, грибного и дрожжевого происхождения для более полного гидролиза исходного сырья. Более 10 отечественных спиртовых заводов имеют свои цехи по производству ферментов и обеспечивают собственные потребности и потребности близлежащих заводов в осаживающих ферментах.

3.3 Микробиологические процессы, протекающие при производстве спирта

Производство спирта включает в себя следующие основные стадии: подготовку сырья к сбраживанию; сбраживание сусла; отгонку спирта из бражки и его ректификацию. Каждая стадия имеет свои технологические особенности, обуславливаемые используемым сырьем (крахмалосодержащее и свекловичная меласса), однако общие принципы получения спирта и основные стадии сохраняются. Производственная аппаратура и технологические схемы постоянно совершенствуются с целью получения наибольшего теоретически возможного выхода спирта высокого качества и с низкой себестоимостью.

Производство спирта из крахмалосодержащего сырья. **Подготовка сырья к сбраживанию.** В настоящее время на заводах по производству спирта применяют несколько технологических схем производства спирта из зерна, отличающихся температурой тепловой обработки сырья: до 165 °С в аппаратах типа «Генц»; до 150 °С в агрегатах непрерывного разваривания (мичуринская схема); до 95 °С в аппаратах гидродинамической обработки замеса. Основная цель водно-тепловой обработки сырья – подготовка к осаживанию крахмала сырья амилолитическими ферментами солода или микробных препаратов. При этом клеточные стенки сырья разрушаются и ослабевают, в результате происходит разваривание, клейстеризация и разжижение крахмала. Такого эффекта достигают следующими способами: развариванием – тепловой обработкой цельного сырья при повышенном давлении; сверхтонким механическим измельчением сырья на специальных машинах; механическим измельчением сырья до определенных размеров частиц и последующим развариванием под давлением или без него (комбинированный способ).

На заводах широко распространен один из комбинированных способов – механико-ферментативная обработка сырья. Сущность его заключается в том, что измельченное сырье смешивается с водой и разжижающими ферментами, преимущественно

амилазой, и нагревается до 60 - 100 °С для клейстеризации, растворения, частичного ферментативного гидролиза крахмала. Обработку проводят при постепенном или ступенчатом повышении температуры в течение нескольких часов. Такое рдзваривание значительно снижает потери сбраживаемых веществ от перевара, повышает доступность сырья к дальнейшему осахариванию глюкоамилазой или солодом, является энерго- и ресурсосберегающим.

Подготовка дрожжей к сбраживанию. Для сбраживания подготовленного раствора Сахаров и других питательных веществ суслу применяют специальные расы дрожжей, хорошо сбраживающих сусло с высоким содержанием углеводов и устойчивых к высоким концентрациям спирта в среде.

Для сбраживания большого количества осахаренного суслу необходимо располагать достаточным количеством активных дрожжей.

При пуске завода после перерыва или при необходимости смены дрожжей их постепенно накапливают, начиная с пробирки чистой культуры. Обычно производственные дрожжи поддерживают в активном состоянии по методу естественной чистой культуры, т. е. стремятся создать оптимальные условия для основной культуры дрожжей и подавить размножение посторонней микрофлоры.

В качестве питательной среды для дрожжей используют осахаренную массу из производственных осахаривателей, при этом отбирают лучшее сырье из имеющегося на заводе. Отобранную массу подкисляют серной кислотой, а затем подвергают стерилизации.

Вопросы для самоконтроля

1. Микроорганизмы, используемые в производстве спирта
2. Микроорганизмы-продуценты гидролитических ферментов
3. Микробиологические процессы, протекающие при производстве спирта

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Ильяшенко, Н.Г. Микробиология пищевых производств / Н.Г. Ильяшенко, Е.А. Бетева, Т.В. Пичугина, А.В. Ильяшенко. – М.: КолосС, 2008. – 412 с.
2. Пищевая биотехнология. Кн. 2. Переработка растительного сырья/Под ред. И.М.Грачевой. – М.: КолосС, 2008.-472 с.

Дополнительная

1. Кислухина, О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов / О.В. Кислухина. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 336 с.
2. Рогов, И.А. Пищевая биотехнология / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Г.П. Шуваева. Кн. 1. – М.: КолосС, 2004. – 440 с.

Лекция 4

МИКРОБЫ-КОНТАМИНАНТЫ БРОДИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДСТВ

4.1 Микроорганизмы сырья

Зерно. На поверхности зерна злаков всех видов находится большое количество разнообразных микроорганизмов. Они попадают на поверхность зерен с частичками пыли во время их роста и созревания, затем с частичками почвы во время сбора урожая, при транспортировке и хранении в зернохранилищах. Среди микроорганизмов зерновых масс могут быть так называемые **фитопатогенные** и **эпифитные** микроорганизмы. К фитопатогенным мицелиальным грибам, вызывающим микозы злаковых растений в процессе их **роста** относятся *Tilletiatritici*, *Ustilagotritici*, вызывающие соответственно твердую и пыльную головню пшеницы, вызывает пузырчатую головню кукурузы, *Fusariumgraminerum* – фузариоз пшеницы, ржи, ячменя, овса, кукурузы, возбудитель спорыньи зерна. Микозы ухудшают качество зерна, придают ему ядовитые свойства. Головневые грибы продуцируют в растениях-хозяевах огромное количество спор, покрытых плотной оболочкой, защищающей спору от губительного воздействия температуры, обезвоживания, солнечной радиации и др. Споры разных видов головневых грибов могут сохранять жизнеспособность десятки лет. Склеротии спорыньи в виде рожков темно-фиолетового цвета ввиду их ядовитых свойств относят к вредной примеси зерна. Зерно, пораженное *Fusariumgraminearum*, не только теряет массу, но и часто приобретает токсические свойства. Токсины, образуемые грибом, очень устойчивы к внешним воздействиям и могут переносить нагревание до 200 °С. Кроме фитопатогенных микроорганизмов на поверхности зерна находятся эпифитные микроорганизмы — неспорообразующие (*Erwiniaherbicola*, *Pseudomonasfluorescens*, виды родов *Lactobacillus* и *Leuconostoc*, *Acetobacter* и др.) и спорообразующие бактерии (*Bacillusubtillis*, *Bacillusmycoides*, виды рода *Clostridium*), многие факультативно-анаэробные гнилостные бактерии (*Proteusvulgaris*) и др., мицелиальные грибы и дрожжи. Для спиртового производства особенно опасными микроорганизмами зерна являются спорообразующие бактерии, как аэробные, так и анаэробные, чаще всего это маслянокислые. При разваривании зерна в разварниках некоторые особенно устойчивые споры не погибают и в дальнейшем могут размножиться в осахаренной массе и вызывать ее скисание. Основная масса неспорообразующих бактерий, а также спор грибов при разваривании погибает, бактерии из группы гнилостных и споры грибов, случайно оставшиеся жизнеспособными, в кислой среде и анаэробных условиях размножаться не могут.

Среди мицелиальных грибов-эпифитов различают «полевые грибы» (так называемые «полевые плесени») и «хранилищные грибы» («плесени хранения»). К полевым грибам, содержащимся на созревающем и свежесобранном зерне и развивающимся на относительно увлажненном зерне, относятся в основном несовершенные грибы родов *Altemaria*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Dematium* и др. К типичным «плесеням хранения», обнаруживающимся на хранящемся зерне, относятся грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* и некоторые другие. Указанная группа грибов чаще развивается на относительно сухих субстратах (при критической и ниже критической влажности зерна). Кроме малой требовательности к влаге «плесени хранения» отличаются высокой ферментативной активностью и способностью развиваться в широком диапазоне температур. Большинство из них находятся в

неактивном состоянии, другие слабо размножаются. Важнейшими условиями, способствующими развитию микроорганизмов при хранении зерна, являются прежде всего влажность зерновой массы, присутствие воздуха в межзерновом пространстве, температура зерновой массы, состояние покровных тканей, количество и состав примесей и др. Под действием микроорганизмов зерно может приобретать различные посторонние запахи, не свойственные здоровому зерну: амбарный, гниlostный, плесенный, затхлый. **Амбарный запах** появляется в партиях свежееубранного зерна, хранящегося некоторое время без перемешивания и проветривания, и связан с протекающими в зерновой массе анаэробными процессами. **Гниlostный запах** может появиться в результате глубокого распада органических веществ и указывает на полную порчу зерна. Наиболее часто при развитии микроорганизмов в зерновой массе появляются **плесенный** и **затхлый** запахи. Эти запахи обусловлены развитием преимущественно представителей рода *Penicillium*. Процесс развития грибов можно приостановить сушкой, активным вентилированием или другими способами, но плесенный запах не исчезает, а переходит в затхлый. Затхлый запах очень стойкий и прочно удерживается зерном.

Для производства спирта опасны не все микроорганизмы, находящиеся на солоде. Сравнительно высокая температура осахаривания (60-62 °С), кислая реакция среды, анаэробные условия и образующийся при брожении этиловый спирт тормозят размножение одних и вызывают гибель других посторонних микроорганизмов. Наиболее вредны для производства кислотообразующие виды – гомо- и гетероферментативные молочнокислые бактерии. Они активно потребляют сахара, в результате обмена выделяют различные кислоты, неблагоприятно действующие на ферменты солода и дрожжевые клетки. Как уже упоминалось, на поверхности зерна злаков всех видов находится большое количество разнообразных микроорганизмов. Так, на поверхности одного зерна ячменя, взятого из зернохранилища, обнаружено около 1 млн различных микроорганизмов, а при благоприятных условиях для их размножения количество микроорганизмов значительно увеличивается.

Картофель. На поверхности картофельных клубней обнаружены самые разнообразные микроорганизмы, оставшиеся на коже вместе с частичками почвы. При хранении картофеля в соответствующих условиях влажности и температуры на неповрежденном эпидермисе большая часть микроорганизмов находится в неактивном состоянии и не размножается. Некоторые микроорганизмы могут отмереть, другие, особенно споры бактерий и плесневых грибов, сохраняются в жизнеспособном состоянии.

Состав поверхности картофельных клубней очень разнообразен и непостоянен, количество микроорганизмов тоже колеблется и зависит от характера и состава почвы, а также от климатических условий. Чаще всего встречаются споры и конидии грибов, аэробные спорообразующие бактерии *B. subtilis*, *B. mycoides*, споры различных видов маслянокислых бактерий, встречаются неспорообразующие гетеро- и гомоферментативные молочнокислые бактерии, представители группы кишечной палочки, гниlostные типа *B. proteus* и др.

На поврежденных клубнях картофеля количество микроорганизмов увеличивается. Мицелий паразитических и полупаразитических мицелиальных грибов прорастает во внутренние ткани картофельного клубня; бактерии также начинают усиленно размножаться, поскольку клеточный сок, вытекающий из поврежденных клеток ткани, служит хорошей питательной средой для различных микроорганизмов, и клубни начинают быстро портиться. Особенно быстро обсеменяется микроорганизмами за-

мороженный и потом оттаявший картофель. Количество микроорганизмов в 1 г такого картофеля исчисляется сотнями тысяч и миллионами. При переработке испорченного картофеля даже при высокой температуре разваривания большое количество микроорганизмов и их спор могут остаться жизнеспособными, в дальнейшем быстро размножиться в осахаренном сусле и нарушить процесс брожения.

Сусло. Развитие вредных микроорганизмов в сусле чаще происходит при использовании инфицированных осахаривающих материалов, остановках осахаривателей на срок более 2-3 ч, дефектах в устройстве аппаратов, насосов и коммуникаций, их небрежной мойке и нерегулярной дезинфекции. В этих случаях в сусле развиваются молочнокислые, маслянокислые и гаилостные бактерии, дрожжи, в труднодоступных местах могут прорасти мицелиальные грибы. При этом происходит отбор наиболее устойчивых видов микроорганизмов, способных выдерживать высокую температуру и воздействие антисептических средств. Неинфицированное сусло имеет титруемую кислотность в пределах 0,15 - 0,25.

4.2 Микроорганизмы воздуха

Спиртовое брожение – это процесс, идущий без участия кислорода воздуха, лишь сравнительно небольшое количество его вводят при размножении дрожжей. Количество микроорганизмов в воздухе и их качественный состав непостоянны и зависят от многих факторов.

В условиях спиртового производства могут размножаться далеко не все микроорганизмы, находящиеся в воздухе и попадающие в заторы и бродильные чаны. Особенно опасны молочнокислые бактерии, описанные выше. Бактерии этой группы часто находятся в воздухе. Кроме того, из него могут попадать в заторы и посторонние дрожжи. Однако ввиду специфичности технологии спиртового производства воацусная инфекция не имеет большого значения.

К вторичным источникам посторонних микроорганизмов относятся аппаратура и засевные дрожжи.

4.3 Микроорганизмы аппаратуры и трубопроводов

Основными источниками инфекции на заводе служат аппаратура и трубопроводы. При недостаточно тщательной мойке и дезинфекции аппаратуры и трубопроводов в них могут задерживаться остатки сырья, дрожжей, отбродившей бражки. При пропаривании аппаратуры и трубопроводов на поверхности из этих остатков образуется пленка из свернувшихся белков и слизи, которые защищают находящиеся во внутренних слоях микроорганизмы. Кроме того, некоторые виды гетероферментативных молочнокислых бактерий, например лейконосток, обладают способностью образовывать слизистую капсулу при росте на сахаристых средах, особенно содержащих сахарозу, т. е. в мелассных средах. Капсула защищает бактерии от неблагоприятных внешних воздействий: высокой температуры при пропаривании (есть данные, что для уничтожения капсульных форм необходима температура выше 100 °С) и дезинфицирующих средств. Микроорганизмы, оставшиеся в труднодоступных местах трубопроводов и в бродильных чанах, заражают поступающие порции свежего сусла или дрожжей в дрожжанках и дрожжегенераторах. Из аппаратуры в продуктовые линии и бродящий затор могут также попадать различные виды спорообразующих бактерий, так как споры очень устойчивы к

воздействию высокой температуры и дезинфицирующих средств.

Вопросы для самоконтроля

1. Микроорганизмы сырья
2. Микроорганизмы воздуха
3. Микроорганизмы аппаратуры и трубопроводов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

2. Ильяшенко, Н.Г. Микробиология пищевых производств / Н.Г. Ильяшенко, Е.А. Бетева, Т.В. Пичугина, А.В. Ильяшенко. – М.: КолосС, 2008. – 412 с.
2. Пищевая биотехнология. Кн. 2. Переработка растительного сырья/Под ред. И.М.Грачевой. – М.: КолосС, 2008.-472 с.

Дополнительная

3. Кислухина, О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов / О.В. Кислухина. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 336 с.
4. Рогов, И.А. Пищевая биотехнология / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Г.П. Шуваева. Кн. 1. – М.: КолосС, 2004. – 440 с.

Лекция 5

ЛЕКТИНЫ

5.1 Понятие “лектины”

Термин лектин был впервые предложен У. Бойдом в 60-х годах прошлого столетия. Лектин от латинского слова “legere” (выбирать), т.е. способность избирательно связываться с теми или иными углеводными рецепторами клеток. *Лектины* – это белки, не относящиеся к классу иммуноглобулинов, способные к обратимому связыванию с углеводной частью гликоконъюгатов без нарушения ковалентной структуры любых из узнаваемых гликозильных лигандов (от лат. “ligo” – связываю; в химии молекулы или ионы, принимающие участие в связывании). Первый лектин был выделен из клещевины (*Ricinus communis*) д-ром Германом Петером Штильмарком (1888 г.) в Дерпском университете (университет Российской империи конца позапрошлого века) и назван рицином. Г. В настоящее время растительные лектины найдены более чем у 800 видов растений в семенах листьях и др. частях.

Микробные лектины (агглютинины, адгезины, преципитины, некоторые микробные токсины и ферменты, белковые факторы, фимбрии) исследованы у более 130 видов (вирусы, бактерии, простейшие, грибы, причем у 100 видов изучена моносахаридная специфичность). Бактериальные лектины в настоящее время получены и изучены у представителей более 70 видов. Первая работа по обнаружению бактериальных лектинов (гемагглютининов) некоторых видов стафилококка и *Vibrio* относится к 1902 г. (Kraus, Ludwig). И лишь спустя десятки лет из этих бактерий были выделены и охарактеризованы различные лектины. Лектины найдены в различных тканях человека и млекопитающих (плаценте, гипофизе, поджелудочной железе, печени и т.д.). Т.е. лектины были обнаружены, выделены и охарактеризованы практически из всех живых организмов от вирусов до человека.

5.2 Классификация лектинов

Известны различные классификации лектинов в основе которых лежат следующие принципы:

- 1 – соотношение белка и углеводов в молекуле лектина,
- 2 – биологическая активность,
- 3 – происхождение,
- 4 – валентность и число субъединиц,
- 5 – домены (функциональные и структурные),
- 6 - антигенная специфичность,
- 7 – специфичность к моно- и дисахарам,
- 8 – специфичность к олисахаридам.

Существуют и другие классификации лектинов – по содержанию ионов металлов, S-S связей и т.д., однако наиболее важной является классификация по углеводной специфичности.

5.2 Роль лектинов в растениях

Лектины могут принимать участие в регуляции деления клеток при прорастании, в том числе в процессе органогенеза, при котором из семян формируется растение; лектины корневой системы выполняют роль защитников растений от болезнетворных микроорганизмов и низших грибов; лектины участвуют в углевод-белковом узнавании в системе азотфиксирующих систем (бактерия-растение).

5.3 Роль в организме животных

- Лектины – адгезины (лектины, находящиеся на поверхности бактерий и вирусов служат для того, чтобы избирательно связываться с клетками макро- и микроорганизмов и инфицировать их),
- исследование структуры клеточной поверхности (на поверхности мембраны расположены разнообразные углеводные рецепторы, их детекция специфическими лектинами – важный элемент в диагностике физиолого-биохимического состояния клетки),
- имея препараты с различной специфичностью, их можно использовать для исследования клеточной поверхности,
- эндогенные лектины могут менять функционирование в мембране ионных каналов т. о. воздействуют на серию метаболических реакций,
- способность лектинов взаимодействовать с ферментами или модуляторами ферментов в организме,
- лектины-ферменты (бифункциональные лектины),
- лектины являются митогенами, т.е. веществами, влияющими на циклы клеточного деления,
- лектины способны индуцировать синтез лимфоцитами разнообразных лимфокинов, биологически активных соединений, способных регулировать иммунологические реакции, рост клеток, миграцию макрофагов, цитотоксическое действие,
- лектины способны индуцировать образование интерферона Т-лимфоцитами, элиминировать из печени высших организмов гепатоциты и купферовские клетки, измененные в процессе старения,
- сигнальная роль лектинов,
- лектины семян бобовых (лейкоагглютинин фасоли) способны выступать в качестве пребиотика, повышающего накопление биомассы “полезных” микроорганизмов в кишечном тракте,
- лектины, поступающие с пищей можно рассматривать как структуры, способные модифицировать функции практически всех присутствующих в организме физиологически активных гликопептидов и др.

5.4 Биотехнологические аспекты получения и применения лектинов

Для получения ряда лектинов из предварительно очищенных препаратов белков используют аффинные сорбенты. Возможен путь отбора мутантных клеток растительного, животного происхождения, и особенно, микроорганизмов по признаку максимального продуцирования в среду того или иного лектина, или группы лектинов. Перспективным является получение лектинов на основе протопластов растительных

клеток – продуцентов лектинов. Ряд наиболее важных в практическом отношении лектинов уже получают генно-инженерным путем (фитогемагглютинин (ФГА), лектин гороха (ЛГ), и др.).

Лектины выступают в качестве чувствительных биосенсоров, детектирующих определенные углеводные последовательности в олигосахаридах, которые являются специфическими лигандами в углевод-белковом взаимодействии. В последние годы лектины все шире находят применение в различных медико-биологических исследованиях. Рядом авторов отмечены противоопухолевый, митогенный, инсулиноподобный, антивирусный эффекты лектинов. Весьма перспективным является использование лектинов для диагностики онкопатологий, иммунодиагностики, заболеваний ЖКТ, мочеполовой системы, легких. Однако, в преобладающем большинстве проводимых исследований, в настоящее время используют лектины растительного происхождения. Изучение свойств и функций лектинов бактерий, и в частности непатогенных бактерий, открывает возможность использования их в качестве своеобразных структурных и функциональных зондов в изучении углеводсвязывающих рецепторов клеточных мембран, характер гликозилирования которых, как известно, играет важную роль в регуляции различных метаболических процессов в организме.

Лектины в биотехнологии.

1. Для диагностики тех или иных заболеваний.
2. Идентификации некоторых микроорганизмов.
3. Специфические реагенты, избирательно сорбирующие те или иные сложные вещества: гликопротеиды, гормоны, сиалопротеиды и т.д. (Т.е можно получить ценные вещества, используемые при лечении многих тяжелых заболеваний).
4. Создание нового поколения препаратов – своеобразных гибридов лектинов и антител для воздействия на те органы и ткани, где действие лектина полезно. Например, в Кёльне д-р Андрес Энгерт для лечения рака лимфатических узлов использовал рицин “сшитый” с антителами, избирательно доставляющими этот токсичный лектин к опухоли.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что такое лектины ?
- 2) Роль лектинов в растениях, в организме животных?
- 3) Классификация лектинов.
- 4) Способы получения лектинов.
- 5) Применение лектинов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2005. –262 с.

Дополнительная

1. Лахтин В.М. Лектины в исследовании белков и углеводов /В.М. Лахтин. Итоги науки и техники. ВИНТИ. Биотехнология.- М., 1987. –Т.2. – 288 с.
2. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. – Львов: Вища школа, 1981. – 156 с.

Лекция 6

ПОЛИСАХАРИДЫ

6.1. Полисахариды и их свойства

Полисахариды (ПС) являются объектом интенсивных исследований, поскольку они имеют важное значение в строении и метаболизме растений, животных, микроорганизмов. Особое внимание в последние годы уделяется полисахаридам микроорганизмов, в частности, экзополисахаридам (ЭПС).

Многие физиологические, биохимические и иммунохимические особенности полисахаридов определяются их распределением в клетке (наружная и цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, выделение в виде внеклеточных слизей в окружающую среду).

Молекулярно-биологические исследования позволили установить, что полисахариды наружной мембраны участвуют в таких процессах, как клеточное узнавание, являются рецепторами бактериофагов и обладают уникальными иммунохимическими и фармакологическими свойствами. Внутриклеточные полисахариды типа гликогена, кроме основной функции запасных полисахаридов, могут принимать участие в регуляторных механизмах, контролирующих рост и деление клеток.

Полностью, однако, сводить физиологическую роль капсульных полисахаридов к их антифагоцитарным свойствам нельзя. Капсулообразование как видовой признак широко распространено и среди непатогенных видов, что свидетельствует о наличии у капсульных полисахаридов достаточно широкого спектра функций.

Главной функцией экзополисахаридов или капсульных полисахаридов является защитная функция. Экзополисахариды высоко гидрофильные и способствуют поглощению влаги бактериями, развивающимися в условиях ограниченной влажности.

Имеются наблюдения, свидетельствующие о большей радиорезистентности инкапсулированных клеток по сравнению с клетками, лишенными капсул. Полисахариды капсул создают особую поддерживающую среду вокруг клеток и препятствуют их сближению и тесному контакту, что сохраняет адсорбционную поверхность клетки в активном состоянии.

Важной является питательная функция экзополисахаридов. Так, ряд бактерий могут использовать в качестве продуктов питания как собственные, так и выделенные в окружающую среду экзополисахариды других микроорганизмов. Капсула может адсорбировать питательные вещества и ионы, особенно у морских микроорганизмов, концентрируя органические и неорганические ионы вокруг клеток, обеспечивая их существование в условиях пониженных концентраций питательных веществ.

Капсульные субстанции непатогенных микроорганизмов предохраняют последние от воздействия антибиотиков, продуцируемых конкурентами, и играют, наряду с вышеописанными функциями, роль "зоны селективного отбора", обеспечивающей избирательность поглощения определенных веществ из окружающей среды обитания и выделения за пределы микрзоны существования клетки подлежащих устранению продуктов метаболизма.

Эти вещества играют важную роль в функционировании органов и систем организма, в первую очередь, органов пищеварения. Они адсорбируют значительное

количество желчных кислот, а также прочие метаболиты, токсины и электролиты, что способствует детоксикации организма.

Многие полисахариды дрожжевого происхождения оказывают седативное действие, увеличивают продукцию гормонов надпочечников и обуславливают гипергликемию, повышают неспецифическую резистентность организма, стимулируют антителообразование. Среди дрожжевых полисахаридов наиболее полно изучен зимозан. Зимозан не оказывает прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки, но угнетает рост опухолей, снижает метастазирование. Одновременное применение иммуностимуляторов и химиотерапии показало, что глюкан повышает противоопухолевое действие циклофосфана, при этом увеличивается эффективность химиотерапии и уменьшается ее токсичность.

Также имеются сведения об использовании микробных (альгиновая кислота) и дрожжевых (аубазидан, родэксманн и др.) полисахаридов для получения водорастворимых волокон – современных полимерных материалов.

Исходя из разнообразия физико-химической структуры, определяющей свойства этих биополимеров, их относят к промышленно ценным продуктам.

Растворы микробных ЭПС характеризуются высокой вязкостью при низких концентрациях, сохранением стабильности в широком диапазоне значений температуры и рН, устойчивостью к механической и окислительной деструкции.

До 60-х годов прошлого века промышленность использовала полисахариды в основном растительного происхождения – крахмал, целлюлоза, агар, альгинат (альгиновая кислота) пектины, гуаровая камедь и т.д., а также полученные путем химического синтеза – метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза и т.д.

6.2. Классификация полисахаридов

Классификация по М. Stacey и S.A. Barker (1960).

- 1- внеклеточные
- 2- внутриклеточные
- 3- полисахариды клеточных стенок.

Классификация по Н.А. Кочеткову (цит. по Елинову Н.П., 1982)

на 6 групп по функциям

- 1 – резервные
- 2 – опорные
- 3 – защитные и т.д.

Классификация по I.W. Sutherland и D.C. Ellwood (1979).

- 1- экзополисахариды
- 2- эндополисахариды
- 3- гомополисахариды
- 4- гетерополисахариды

Классификация внеклеточных полисахаридов (ПС) по I.W. Sutherland (1982).

- 1 - гомополисахариды, состоят их моносахаридов одного типа (леваны, мутаны), среда с сахарозой,
- 2 - гетерополисахариды, среда сахароза (ПС из псевдомонад),
- 3 - гомополисахариды, среда – различные углеводы (пуллулан из гриба),
- 4 - гетерополисахариды, состоят из структур с повторяющимися блоками (ксантан),
- 5 - гетерополисахариды, состоящие из молекул двух типов: D-маннуроновой и L-гулууроновой кислот (альгинат).

6.3. Применение полисахаридов

Практическое использование ПС основано на их реологических характеристиках в водных растворах, т. образом, важнейшей характеристикой ПС являются их реологические свойства, и в первую очередь – вязкость водных растворов. Вязкость – явление внутреннего трения, связанное возникновением сил трения между двумя слоями жидкости, перемещающимися параллельно друг другу с различными скоростями. Интерес к этим структурным биополимерам клетки обусловлен тем, что полисахариды, применяются в качестве суспендирующих, железирующих, эмульгирующих реагентов в различных отраслях народного хозяйства: нефтеперерабатывающей, горнодобывающей, текстильной, пищевой, фармацевтической, химической, медицинской, ветеринарии, для улучшения качества кормов и т.д.

В последние годы потребность в экзополисахаридах (ЭПС), благодаря их использованию во многих отраслях промышленности, все больше возрастает. Среди них достойное место занимают экзополисахариды бактериального происхождения. Потребность в этих полимерах постоянно растет во всем мире. Промышленное производство внеклеточных бактериальных полисахаридов достигло крупных масштабов во многих зарубежных странах (США, Германии, Франции, Японии, Австрии и др.). Стоимость 10-12 \$/кг. В России в настоящее время, исходя из доступных нам источников, производится бактериальный экзополисахарид – сараксан (вариант ксантана), используемый в нефтегазовой отрасли, сельском хозяйстве.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Полисахариды и их свойства.
- 2) Классификация полисахаридов.
- 3) Применение полисахаридов в народном хозяйстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Гусев, М.В. Микробиология. / М.В. Гусев, Л.А. Минаева. – М.: Академия, 2008. – 464 с.
2. Емцев, В.Т. Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин – М.: Дрофа, 2005. – 446 с.
3. Котова, И.Б. Общая микробиология / И.Б. Котова, А.И. Нетрусов – М.: Академия, 2007. – 288 с.
4. Методические рекомендации по выделению и очистке экзополисахаридов бактериального происхождения / Е.В. Полукаров, Г.Е. Рысмухамбетова, Е.Н. Бухарова, Д.А. Жемеричкин, Л.В. Карпунина. – Саратов: ФГОУ ВПО Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова, 2009. - 12 с.

Дополнительная

1. Микробный синтез экзополисахаридов на C₁-C₂- соединениях / Т.А. Гринберг, Т.П. Пирог, Ю.Р. Малашенко, Г.Э. Пинчук. - Киев: : Наукова Думка, 1992. – 212 с.
2. Стейниер, Р. Мир микробов / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. – М.: Мир, 1979.: Т.1. – 320 с. Т.2. – 336 с.Т.3. – 488 с.
3. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель – М.: Мир, 1987. – 568 с.

Лекция 7

ПОЛУЧЕНИЕ КОРМОВЫХ БЕЛКОВ

7.1. Получение готовых товарных форм препаратов

Все товарные формы биопрепаратов с точки зрения технологии их получения можно разделить на три основные группы.

1. Биопрепараты, имеющие в товарном продукте в качестве основного компонента жизнеспособные микроорганизмы. К этой группе относятся средства защиты растений, бактериальные удобрения, закваски для силосования кормов, биодеграданты, другие активные средства биотрансформации.

2. Биопрепараты, в состав которых входит инактивированная биомасса клеток и продукты ее переработки. Это кормовые дрожжи, грибной мицелий и т.д.

3. Биопрепараты на основе очищенных продуктов метаболизма микроорганизмов. К ним относятся витамины, аминокислоты, ферменты, антибиотики, биолипиды, полисахариды, продукты комплексной переработки микробных масс и метаболитов.

Товарные формы представляют собой либо сложную смесь, содержащую некоторое количество основного вещества, либо высокоочищенный препарат, отвечающий ряду специальных требований.

Продукт может выпускаться в жидком (жидкий концентрат лизина) или сухом виде (белково-витаминный концентрат, энтомопатогенные препараты, кормовой концентрат лизина). Стадия фасовки заключается в помещении их в тару (мешки, барабаны и т.п.), размеры и тип которой определяются потребностями заказчика и свойствами продукта (его слеживаемостью, гигроскопичностью, стойкостью к загниванию и т.д.). Другие требования предъявляются к медицинским препаратам и биохимическим реактивам.

7.2. Сырьевая база для синтеза белка одноклеточных

Производство микробной биомассы является хорошей белковой добавкой для домашних животных, птиц и рыб. При выборе микроорганизма учитывают удельную скорость роста и выход биомассы на данном субстрате, стабильность при поточном культивировании, величину клеток. Клетки дрожжей крупнее, чем бактерий, и легче отделяются от жидкости при центрифугировании. Можно выращивать полиплоидные мутанты дрожжей с крупными клетками. В настоящее время известны только две группы микроорганизмов, которым присущи свойства, необходимые для крупномасштабного промышленного производства: это дрожжи рода *Candida* на п-алканах и бактерии *Methylophilus methylotrophus* на метаноле.

Микроорганизмы выращивают на газах, нефти, отходах угольной, химической, пищевой, винно-водочной, деревообрабатывающей промышленности. Экономические преимущества: килограмм переработанной микроорганизмами нефти дает килограмм белка, а килограмм сахара - всего 500 граммов белка. Аминокислотный состав белка дрожжей мало отличается от белка, полученного из микроорганизмов, выращенных на обычных углеводных средах. Биологические испытания препаратов из дрожжей, выращенных на углеводородах, выявили полное отсутствие у них какого-либо вредного влияния на организм испытуемых животных. В непереработанном виде дрожжи содержат неспецифические липиды и аминокислоты, биогенные амины, полисахариды

и нуклеиновые кислоты, а их влияние на организм пока еще плохо изучено. Поэтому и предлагается выделять из дрожжей белок в химически чистом виде.

Продуцентами белка служат дрожжи, грибы, бактерии и микроскопические водоросли. С технологической точки зрения наилучшими являются *дрожжи*. Преимущество: "технологичность" (легко выращивать в условиях производства), высокая скорость роста, устойчивость к посторонней микрофлоре, способны усваивать любые источники питания, легко отделяются, не загрязняют воздух спорами. Клетки дрожжей содержат до 25% сухих веществ. Ценный компонент дрожжевой биомассы - белок, он по составу аминокислот превосходит белок зерна злаковых культур и лишь немного уступает белкам молока и рыбной муки. Биологическая ценность определяется наличием значительного количества незаменимых аминокислот. По содержанию витаминов дрожжи превосходят все белковые корма, в том числе и рыбную муку. Дрожжевые клетки содержат микроэлементы и значительное количество жира, в котором преобладают ненасыщенные жирные кислоты. При скармливании кормовых дрожжей коровам повышаются удои и содержание жира в молоке, а у пушных зверей улучшается качество меха. Интерес представляют и дрожжи, обладающие гидролитическими ферментами и способные расти на полисахаридах без их предварительного гидролиза. Использование таких дрожжей позволит избежать дорогостоящую стадию гидролиза полисахаридсодержащих отходов. Известно более 100 видов дрожжей, которые хорошо растут на крахмале как на единственном источнике углерода. Среди них особенно выделяются два вида, которые образуют как глюкоамилазы, так и β -амилазы, растут на крахмале с высоким экономическим коэффициентом и могут не только ассимилировать, но и сбраживать крахмал: *Schwanniomycetes occidentalis* и *Saccharomycopsis fibuliger*. Оба вида - перспективные продуценты белка и амилолитических ферментов на крахмалсодержащих отходах. Ведутся поиски и таких дрожжей, которые могли бы расщеплять нативную целлюлозу. Целлюлазы обнаружены у нескольких видов, например у *Trichosporon pullulans*, однако активность этих ферментов низкая и о промышленном использовании таких дрожжей говорить пока не приходится. Дрожжи из рода *Kluveromyces* хорошо растут на инулине - основном запасном веществе в клубнях топинамбура - важной кормовой культуры, которая также может быть использована для получения дрожжевого белка.

В качестве продуцентов белка стали использовать *бактерии*, которые отличаются высокой скоростью роста и содержат в биомассе до 80% белка. Они хорошо поддаются селекции, что позволяет получать высокопродуктивные штаммы. Недостатки: трудная осаждаемость, обусловленная малыми размерами клеток, значительная чувствительность к фаговым инфекциям и высокое содержание в биомассе нуклеиновых кислот. Последнее обстоятельство неблагоприятно только в том случае, если предусматривается пищевое использование продукта. Снижать содержание нуклеиновых кислот в биомассе, употребляемой на корм животным, нет необходимости, так как мочева кислота и ее соли, образующиеся при разрушении азотистых оснований, превращаются в организме животных в алантоин, который легко выделяется с мочой. У человека избыток солей мочева кислоты может способствовать развитию ряда заболеваний.

Продуценты белка – *грибы* – привлекают внимание исследователей благодаря способности утилизировать самое разнообразное по составу органическое сырье: мелассу, молочную сыворотку, сок растений и корнеплодов, лигнин- и целлюлозосодержащие твердые отходы пищевой, деревообрабатывающей, гидролитической промышленности. Грибной мицелий богат белковыми веществами, которые по

содержанию незаменимых аминокислот ближе всего к белкам сои. Вместе с тем белок грибов богат лизином, основной аминокислотой, недостающей в белке зерновых культур. Это позволяет на основе зерна и грибной биомассы составлять сбалансированные пищевые и кормовые смеси. Грибные белки имеют достаточно высокую биологическую ценность и хорошо усваиваются организмом. Положительным фактором является и волокнистое строение выращенной культуры. Это позволяет имитировать текстуру мяса, а с помощью различных добавок - его цвет и запах. В качестве субстрата грибами используются глюкоза и другие питательные вещества, а общим источником азота служат аммиак и аммонийные соли. После завершения стадии ферментации культуру подвергают термообработке для уменьшения содержания рибонуклеиновой кислоты, а затем отделяют мицелий методом вакуумного фильтрования.

Источниками белковых веществ могут служить *водоросли*. При фототрофном способе питания и образования биомассы они используют углекислый газ атмосферы. Выращивают водоросли в поверхностном слое прудов, где с площади 0,1 га можно получить столько же белка, сколько с 14 га посевов фасоли. Белок водорослей пригоден не только для кормовых, но и пищевых целей.

Наконец, хорошими продуцентами белка являются рясковые, которые накапливают протеина до 45% от сухой массы, а также до 45% углеводов. Однако, несмотря на свои малые размеры, они не принадлежат к вышеперечисленным производителям белка (микроорганизмам), так как не только являются многоклеточными организмами, но и относятся к высшим растениям.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Назовите три основные группы товарных форм препаратов?
- 2) Какие факторы учитывают при выборе микроорганизма?
- 3) Назовите основное сырье, используемое для синтеза белка одноклеточных.
- 4) Почему с технологической точки зрения лучшими в качестве продуцентов являются дрожжи. Назовите их преимущество.
- 5) Приведите характеристику следующих продуцентов белка: бактерий, грибов и водорослей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии)/В.А. Блинов. – Саратов: ОГУП РИК «Полиграфия Поволжья», 2003. – 196 с.
2. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б.Глик, Дж.Пастернак. – М, 2002. — 720 с.
3. **Егорова, Т. А.** Основы биотехнологии / Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. — М.: Издательский центр «Академия», 2003. — 208 с.
4. www.biotechnolog.ru/ Кузьмина Н.А.

Дополнительная

1. Биотехнология. Принципы и применение /Под. ред. И. Хиггинса, Д. Беста и Дж. Джонса. — М: Мир, 1988. — 480 с.
2. *Журналы: «Биотехнология»*

Лекция 8

АНТИБИОТИКИ КАК ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ И ИХ ПРОДУЦЕНТЫ. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ

8.1 Производство вторичных метаболитов

Из всех продуктов, получаемых с помощью микробных процессов, наибольшее значение имеют вторичные метаболиты. Если вопрос о физиологической роли вторичных метаболитов в клетках-продуцентах был предметом серьезных дискуссий, то их промышленное получение представляет несомненный интерес, так как эти метаболиты являются биологически активными веществами: одни из них обладают антимикробной активностью, другие являются специфическими ингибиторами ферментов, третьи – ростовыми факторами, многие обладают фармакологической активностью. Фармацевтическая промышленность разработала сверхсложные методы скрининга (массовой проверки) микроорганизмов на способность продуцировать ценные вторичные метаболиты.

Среди вторичных метаболитов ведущее место по объему производства занимают антибиотики. Антибиотики продуцируются плесневыми грибами, актиномицетами, эубактериями и другими микроорганизмами. Некоторые из этих организмов способны продуцировать большое количество антибиотиков. Так, 6 родов филаментозных грибов производят около 1000 различных антибиотиков, в том числе пенициллин и цефалоспорин, а три рода актиномицетов — 3000 антибиотиков. Среди актиномицетов наибольший вклад вносит род *Streptomyces*, один из видов которого — *S. Griseus* синтезирует более 50 антибиотиков. К хорошо известным продуцентам антибиотиков относятся многие виды *Penicillium* (*Penic. Chrysogenum*, *Penic. Bericompactum*, *Penic. Nigricans*, *Penic. Turbatum*, *Penic. Steckii*, *Penic. Corylophilum*), а также некоторые виды *Aspergillus* (*Asp. Flavus*, *Asp. Flavipes*, *Asp. Janus*, *Asp. Nidulans* и др.)

Особенности культурального роста этих микроорганизмов необходимо учитывать при производстве. Например, в случае антибиотиков большинство микроорганизмов в процессе тропофазы чувствительно к собственным антибиотикам, однако во время идиофазы они становятся к ним устойчивыми. Чтобы уберечь микроорганизмы, продуцирующие антибиотики, от самоуничтожения, важно быстро достичь идиофазы и затем культивировать микроорганизмы в этой фазе. Это достигается путем варьирования режимов культивирования и составом питательной среды на стадиях быстрого и медленного роста. Например, лизин, как конечный продукт биосинтеза пенициллина *Penicillium chrysogenum* ингибирует гомоцитратсинтазу. А этот фермент необходим для образования ключевого соединения в синтезе пенициллина – α -аминоадипината. Для того, чтобы ослабить этот эффект, в питательную среду вместо глюкозы вводят лактозу, которая медленнее метаболизирует, при этом образуется и меньше лизина.

На продукцию первичных и вторичных метаболитов влияют также возраст инокулюма, морфология клеток, их жизнеспособность, митотическая активность, эффективность усвоения питания и др.

8.2 Механизм действия антибиотиков

По спектру действия антибиотики делят на пять групп в зависимости от того, на какие микроорганизмы они оказывают воздействие. Кроме того, существуют противоопухолевые антибиотики, продуцентами которых также являются актиномицеты. Каждая из этих групп включает две подгруппы: антибиотики широкого и узкого спектра действия. Антибактериальные антибиотики составляют самую многочисленную группу препаратов. Преобладают в ней антибиотики широкого спектра действия, оказывающие влияние на представителей всех трех отделов бактерий. К антибиотикам широкого спектра действия относятся аминогликозиды, тетрациклины и др.

Антибиотики узкого спектра действия эффективны в отношении небольшого круга бактерий, например полимиксины действуют на грациликотные, ванкомицин влияет на грамположительные бактерии.

В отдельные группы выделяют противотуберкулезные, противолепрозные, противосифилитические препараты. Противогрибковые антибиотики включают значительно меньшее число препаратов. Широким спектром действия обладает, например, амфотерицин В, эффективный при кандидозах, бластомикозах, аспергиллезах; в то же время нистатин, действующий на грибы рода *Candida*, является антибиотиком узкого спектра действия. Антипротозойные и противовирусные антибиотики насчитывают небольшое число препаратов. Противоопухолевые антибиотики представлены препаратами, обладающими цитотоксическим действием. Большинство из них применяют при многих видах опухолей, например митомицин С.

Антибактериальное действие антибиотиков может быть бактерицидным, т.е. вызывающим гибель бактерий (например, у пенициллинов, цефалоспоринов), и бактериостатическим – задерживающим рост и развитие бактерий (например, у тетрациклинов, левомицетина). При увеличении дозы бактериостатические антибиотики могут также вызывать гибель бактерий. Аналогичными типами действия обладают противогрибковые антибиотики: фунгицидным и фунгиостатическим. Обычно при тяжелых заболеваниях назначают бактерицидные и фунгицидные антибиотики. Действие антибиотиков на микроорганизмы связано с их способностью подавлять те или иные биохимические реакции, происходящие в микробной клетке. В зависимости от механизма действия различают пять групп антибиотиков:

- антибиотики, нарушающие синтез клеточной стенки. К этой группе относятся, например, (3-лактамы. Препараты этой группы характеризуются самой высокой избирательностью действия: они убивают бактерии и не оказывают влияния на клетки микроорганизма, так как последние не имеют главного компонента клеточной стенки бактерий – пептидогликана. В связи с этим р-лактамы являются наименее токсичными для макроорганизма;
- антибиотики, нарушающие молекулярную организацию и синтез клеточных мембран. Примерами подобных препаратов являются полимиксины, полиены;
- антибиотики, нарушающие синтез белка; это наиболее многочисленная группа препаратов. Представителями этой группы являются аминогликозиды, тетрациклины, макролиды, левомицетин, вызывающие нарушение синтеза белка на разных уровнях;

▪ антибиотики – ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот. Например, хинолоны нарушают синтез ДНК, рифампицин – синтез РНК; антибиотики, подавляющие синтез пуринов и аминокислот К этой группе относятся, например, сульфаниламиды.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Классификация продуктов биотехнологических производств. Дайте определение и краткую характеристику первичных и вторичных метаболитов.
- 2) На каких стадиях роста клеток синтезируются первичные и вторичные метаболиты? С чем это связано?
- 3) Какие факторы влияют на продукцию первичных и вторичных метаболитов?
- 4) Приведите примеры продуцентов аминокислот, органических кислот и витаминов.
- 5) Приведите примеры продуцентов антибиотиков.
- 6) Как можно повысить выход первичных метаболитов?
- 7) Какие факторы необходимо учитывать при производстве вторичных метаболитов? Как можно повысить их выход?
- 8) Спектр и механизм действия антибиотиков

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. — М.: Издательский центр «Академия», 2003. — 208 с.
3. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. – СПб., 1995. – 600 с
4. <http://www.biotechnolog.ru/> Кузьмина Н.А. Биотехнология
5. <http://ru.wikipedia.org/wiki/>

Дополнительная

1. Биотехнология: свершения и надежды: Пер. с англ./Под ред. В. Г. Дебабова.— М.: Мир, 1987.—411 с
2. Биотехнология. Принципы и применение: Пер с англ / Под. ред. И. Хиггинса, Д. Беста и Дж. Джонса. — М: Мир, 1988. —480 с.
3. Блинов В.А. Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. – Саратов, 2003. – 161 с.
4. Блинов В.А. Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 2. – Саратов, 2004. – 144 с.
Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. – М, 2002.

Лекция 9

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МЕТАЛЛОВ

9.1 Роль микроорганизмов в изменении подвижности и концентрировании металлов в природных средах

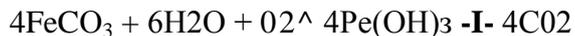
Микробиологическая трансформация металлов часто является результатом **минерализации органических соединений** и приводит к включению их в биогенное вещество.

При минерализации, микробном разложении естественного опада и гумусовых веществ в почве высвобождаемые макро- и микроэлементы становятся более доступными для растений. Из микроэлементов для растений наиболее важны Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, V, Co. В процессе разложения комплексных соединений органических веществ с металлами ионы металлов осаждаются в виде нерастворимых гидроксидов, оксидов или солей.

В природе наиболее распространено микробное окисление железа и марганца. Отложение их оксидов и гидроксидов на поверхности микробных клеток часто является причиной засорения труб водопроводной сети.

Железо в закисной форме окисляется с образованием Fe(OH)₃. Процесс осуществляют нитчатые и одноклеточные формы железобактерий. Нитчатые железобактерии р. *Leptothrix* (*L. ochracea*, *L. crassa*) играют важную роль в образовании болотных железных руд. Они распространены в лесных ручьях, болотах, водоемах, богатых солями закиси железа, и образуют скопления в виде бурых хлопьев, вытянутых по течению. Большие скопления нитчатых бактерий наблюдаются при выходе на поверхность почвенных и подземных вод, богатых железом в закисной форме и углекислотой.

Автотрофные аэробные нитчатые бактерии получают энергию при окислении закисных солей углекислого железа в гидроксид железа:



В благоприятных условиях рост железобактерий может быть очень обильным. Максимальное развитие *L. ochracea* наблюдается в зоне, где концентрация Fe²⁺ превышает 2,5 мг/л, CO₂ - не менее 12,5 мг/л, а кислорода менее 2 мг/л.

Одноклеточные железобактерии р. *Gallionella* развиваются в железистых водах при нейтральном pH и пониженной концентрации кислорода; способны расти в холодной воде и даже под снегом.

В природе железо активно окисляется при биовыщелачивании железных руд в процессе окисления серы железooksисляющими микроорганизмами.

Марганец в виде Mn²⁺ может окисляться микроорганизмами до Mn³⁺, Mn⁴⁺ и осаждаться.

В окислении соединений марганца участвуют многие почвенные бактерии и грибы. В ассоциации с марганцоокисляющими микроорганизмами р. *Metallogenium* облигатно и факультативно анаэробные бактерии рр. *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* участвуют в мобилизации марганца, восстанавливая его и иммобилизуя в результате поглощения из растворимых форм. В присутствии кислорода марганцоокисляющие бактерии окисляют растворимые соединения марганца, образующиеся в болотах, иле и в почвах в результате деятельности факультативно-анаэробных микроорганизмов. Образующиеся оксиды марганца устойчивы в аэробных условиях и нерастворимы в воде. Осаждаясь на дно водоемов, оксиды и гидроксиды Mn(III,IV) адсорбируют и удаляют из воды катионы, особенно тяжелых металлов.

Многие морские бактерии окисляют Mn(II) при образовании железо-марганцевых конкреций, известных как марганцевые друзы. Железомарганцевыми конкрециями покрыто около 10% всей площади океанического ложа.

В реакциях окисления марганца выход энергии незначителен и не обеспечивает существования микроорганизмов. Микроорганизмы, участвующие в превращении соединений марганца, помимо марганца окисляют и органические соединения, относятся к органотрофам.

В связывании ионов металлов могут участвовать внеклеточные полимеры, главным образом, полисахариды. Внеклеточные полисахариды обычно обладают кислотными свойствами, что определяет возможность их взаимодействия с катионами металлов. Они содержат остатки сахаров, глюкуроновую кислоту, органические кислоты, их производные – аminosа[ара, ацильные производные и др. Полисахариды микроорганизмов содержат мало ксилоры и глюкозы. Они подвижны в почвенной среде и устойчивы к биодеградации другими почвенными микроорганизмами.

Внеклеточные капсулы микроорганизмов, состоящие из полисахаридов и других веществ, связывают металлы в неактивные комплексы и тем самым предотвращают токсическое действие тяжелых металлов.

Синтез микробной клеткой внеклеточных полимеров, адсорбирующих металлы, зависит от состава питательной среды. При высоком соотношении C : N количество синтезируемых экзополимеров увеличивается.

Микроэлементы, участвующие в метаболизме бактерий, поступают в клетку в виде внеклеточных комплексов. Соединения, не участвующие в метаболизме микроорганизмов, также могут накапливаться в клетках при их транспорте в виде комплексов с органическими лигандами (например, Ge в виде комплекса с ароматическими субстратами).

В микробных превращениях металлы способны вступать в реакции метилирования и трансалкилирования с образованием металлоорганических соединений. Метилированные производные летучи и легко выводятся из микробных клеток в атмосферу. Этот процесс приводит к устранению токсичного действия металлов на микроорганизмы, однако метилированные продукты могут накапливаться в концентрациях, токсичных для высших организмов. Например, в виде метилртути может быть связано более 90% ртути, содержащейся в рыбе.

9.2 Токсическое действие металлов на микроорганизмы

Характер воздействия металлов и радионуклидов на биоту определяется устойчивостью живых организмов к токсическому действию их.

В малых концентрациях большинство металлов стимулируют рост микроорганизмов, так как являются необходимыми элементами, входящими в состав ряда ферментов.

Один из механизмов токсического действия тяжелых металлов обусловлен тем, что они легко взаимодействуют с различными электронодонорными группами органических соединений, образуя комплексы с гидроксильными, карбоксильными и аминокгруппами, ковалентные связи с сульфгидрильными группами. Например, ртуть имеет высокое сродство к сере, в частности, к S-H группам белков. Проникая в клетку, ртуть связывается с белками. Ингибирование тяжелыми металлами активности металлоферментов может быть обусловлено и замещением катиона в их активном центре.

Тяжелые металлы могут играть роль антиметаболитов, образовывая стабильные соединения с метаболитами, инактивируя их, или ускоряя процессы их катаболизма. Например, ион Cs* по химическим свойствам подобен иону K*. В результате

моновалентного катионного транспорта Cs^+ поступает в клетки, замещает внутриклеточный K^+ , что приводит к нарушению биологических процессов, в которых участвует K^+ .

Ионы тяжелых металлов часто нарушают функции цитоплазматической мембраны. Угнетение функций мембраны - один из механизмов токсического действия ртути, серебра и меди, который основан на взаимодействии металлов с компонентами дыхательной цепи, с сульфгидрильными группами мембранных белков. У фототрофов тяжелые металлы нарушают фотосинтез. Этот процесс более чувствителен к тяжелым металлам, чем дыхание. Ионы ртути и меди ингибируют фотосинтез в концентрации 10^{-6} М, ионы других тяжелых металлов - в концентрациях 10^{-4} М. У циано-бактерий ртуть связывается с белками тилакоидов. Ионы свинца, конкурируя с ионами железа, ингибируют превращение копропорфириногена в протопорфириноген и нарушают биосинтез гемов, например, у *Rhodobactersphaeroides*. Тяжелые металлы ингибируют синтез рибофлавина и витамина В12, а также нарушают процесс азотфиксации у микроорганизмов.

Вопросы для самоконтроля

1. Роль микробов в трансформации металлов
2. Токсическое действие металлов на бактерии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

3. Ильяшенко, Н.Г. Микробиология пищевых производств / Н.Г. Ильяшенко, Е.А. Бетева, Т.В. Пичугина, А.В. Ильяшенко. – М.: КолосС, 2008. – 412 с.
2. Пищевая биотехнология. Кн. 2. Переработка растительного сырья/Под ред. И.М.Грачевой. – М.: КолосС, 2008.-472 с.

Дополнительная

5. Кислухина, О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов / О.В. Кислухина. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 336 с.
6. Рогов, И.А. Пищевая биотехнология / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Г.П. Шуваева. Кн. 1. – М.: КолосС, 2004. – 440 с.

Лекция 10

БИОДЕГРАДАЦИЯ ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ, КОМПСТИРОВАНИЕ

10.1 Катаболизм твердых отходов

Перед транспортировкой твёрдых отходов на свалку они могут быть подвергнуты обработке, т.е. измельчению, перемалыванию и дроблению. Эта предварительная обработка может сильно влиять на катаболические процессы в твёрдых отходах. На типичной свалке, где отходы размещаются по отсекам, вся система в целом работает как группа реакторов периодического действия, в которых отходы находятся на разных стадиях биodeградации и подвергаются случайным воздействиям, например, попаданию воды, содержащей растворённый кислород или различные ксенобиотики. В этом случае можно применить простую модель периодических культивирований, действующих в той последовательности, в какой происходит загрузка. Для более традиционного типа свалки можно использовать модель периодического культивирования с повторным внесением посевного материала микроорганизмов и беспозвоночных.

В начальной стадии катаболизма твёрдых отходов, сопровождаемого физическими и химическими процессами, преобладают аэробные процессы, в ходе которых наиболее лабильные молекулы быстро разрушаются рядом беспозвоночных и микроорганизмами. Утилизация миксотрофных субстратов затем сменяется последующим катаболизмом макромолекул, таких как лигноцеллюлозы, лигнин, танины и меланины, которые способны только к медленной биodeградации, что приводит к тому, что кислород перестаёт быть лимитирующим субстратом.

Биodeградация органических соединений, загрязняющих окружающую среду, оправдана только в том случае, если в результате происходит их полная минерализация, разрушение и детоксикация; если же биохимическая модификация этих соединений приводит к повышению их токсичности или увеличивает время нахождения в среде, она становится не только нецелесообразной, но даже вредной. Детоксикация загрязняющих среду веществ может быть достигнута путем всего одной модификации структуры. Судьба ксенобиотика зависит от ряда сложным образом взаимосвязанных факторов как внутреннего характера (устойчивость ксенобиотика к различным воздействиям, растворимость его в воде, размер и заряд молекулы, летучесть), так и внешнего (рН, фотоокисление, выветривание). Все эти факторы будут определять скорость и глубину его превращения. Скорость биodeградации ксенобиотика данным сообществом микроорганизмов зависит от его способности проникать в клетки, а также от структурного сходства этого синтетического продукта и природного соединения, которое подвергается естественной биodeградации. В удалении ксенобиотиков из окружающей среды важную роль играют различные механизмы метаболизма.

Ликвидация токсичных и опасных отходов на свалке, отдельно или вместе с твёрдыми отходами, требует тщательного выбора места свалки и материала для ограждения. Часто токсичные и опасные жидкие отходы и илы подвергаются стабилизации или отверждению перед их ликвидацией на свалке.

Ликвидация токсичных и опасных твёрдых отходов вместе с обычными требует учёта следующих факторов: типа отходов (твёрдые, ил, жидкие), совместимости видов

микроорганизмов, нагрузки, испарения, скорости вымывания, характеристик твёрдых отходов, температуры и водного баланса в данном месте.

Механизм ослабления вредных воздействий может быть как микробиологическим, так и физико-химическим. Радиоактивные отходы также могут быть подвергнуты микробной трансформации.

Компостирование – это экзотермический процесс биологического окисления, в котором органический субстрат подвергается аэробной биодegradации смешанной популяцией микроорганизмов в условиях повышенной температуры и влажности. В процессе биодegradации органический субстрат претерпевает физические и химические превращения с образованием стабильного гумифицированного конечного продукта. Этот продукт представляет ценность для сельского хозяйства и как органическое удобрение, и как средство, улучшающее структуру почвы.

Отходы, поддающиеся компостированию, варьируют от городского мусора, представляющего собой смесь органических и неорганических компонентов, до более гомогенных субстратов, таких как навоз, отходы растениеводства, сырой активный ил и нечистоты. В процессе компостирования удовлетворяется в основном потребность в кислороде, органические вещества переходят в более стабильную форму, выделяются диоксид углерода и вода и возрастает температура. В естественных условиях процесс биодegradации протекает медленно, на поверхности земли, при температуре окружающей среды и в основном в анаэробных условиях.

Важными параметрами являются соотношение углерода и азота и мультидисперсность субстрата, необходимая для нормальной аэрации. Навоз, сырой активный ил и многие растительные отходы имеют низкое отношение углерода к азоту, высокую влажность и плохо поддаются аэрации. Их необходимо смешивать с твёрдым материалом, собирающим влагу, который обеспечит дополнительный углерод и нужную для аэрации структуру смеси.

В процессе компостирования принимает участие множество видов бактерий – более 2000 и не менее 50 видов грибов. Эти виды можно подразделить на группы по температурным интервалам, в которых каждая из них активна. Для психрофилов предпочтительна температура ниже 20°C, для мезофилов – от 20 до 40°C и термофилов – свыше 40°C. Микроорганизмы, которые преобладают на последней стадии компостирования, являются, как правило, мезофилами.

В большинстве случаев при исследовании биодegradации использовался традиционный подход, основанный на выделении и анализе свойств чистых изолятов из окружающей среды. С другой стороны, из-за гетерогенности среды в ней формируются местообитания для множества разных микроорганизмов с самыми разнообразными метаболическими свойствами. Эти местообитания не могут не быть взаимосвязанными друг с другом. Ксенобиотики подвергаются действию смешанных популяций микроорганизмов, т.е. сообществ, для которых характерны отношения кооперации, комменсализма и взаимопомощи.

Сточные воды нефтяной промышленности обычно очищают биологическим способом после удаления большей части нефти физическими способами или с помощью коагулянтов. Токсическое воздействие компонентов таких сточных вод на системы активного ила можно свести к минимуму путем постепенной «акклиматизации» очистной системы к повышенной скорости поступления стоков и последующего поддержания скорости потока и его состава на одном уровне. Однако загрузка этих систем может значительно варьировать и, видимо, лучше использовать

более совершенные технологии, например системы с илом, аэрированным чистым кислородом, или же колонные биореакторы.

Самые большие утечки нефти в окружающую среду происходят в море, где она затем подвергается различным физическим превращениям, известным как выветривание. В ходе этих абиотических процессов, включающих растворение, испарение и фотоокисление, разлагается (в зависимости от качества нефти и от метеорологических условий) 25 - 40% нефти. На этой стадии разрушаются многие низкомолекулярные алканы. Степень микробиологической деградации выветрившихся нефтяных разливов определяется рядом факторов. Весьма важен состав нефти: относительное содержание насыщенных, ароматических, содержащих азот, серу и кислород соединений, а также асфальтенов в различных типах нефти различно. Определенную устойчивость нефти придают разветвленные алканы, серосодержащие ароматические соединения и асфальтены. Кроме того, скорость роста бактерий, а, следовательно, и скорость биодegradации определяются доступностью питательных веществ, в частности азота и фосфора. Оказалось, что добавление таких веществ увеличивает скорость биодegradации. Количество разных организмов, способных расти на компонентах нефти, зависит от степени загрязненности углеводородами. Например, больше всего их находят поблизости от крупных портов или нефтяных платформ, где среда постоянно загрязнена нефтью. Полная деградация нефти зачастую не происходит даже при участии богатых по видовому составу микробных сообществ. Наиболее биологически инертные компоненты, например асфальтены, содержатся в осадочных породах и нефтяных залежах. Основные физические факторы, влияющие на скорость разложения нефти, - это температура, концентрация кислорода, гидростатическое давление и степень дисперсности нефти. Наиболее эффективная биодegradация осуществляется тогда, когда нефть эмульгирована в воде.

Особую проблему представляют выбросы или случайные разливы нефти на поверхности почвы, поскольку они могут привести к загрязнению почвенных вод и источников питьевой воды. В почве содержится очень много микроорганизмов, способных разрушать углеводороды. Однако даже их активность не всегда достаточна, если образуются растворимые производные или поверхностно-активные соединения, увеличивающие распространение остаточной нефти.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Какие биологически активные вещества получают с помощью микробиологического синтеза?
- 2) Каковы могут быть результаты биодegradации органических соединений?
- 3) Что такое компостирование?
- 4) Что такое биоочистка и детоксикация?
- 5) Какой бывает биоремедиация?
- 6) Что такое биовыщелачивание и где его применяют?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Сазонова, И.А. Экологическая биотехнология: учебное пособие / И.А. Сазонова. Саратов, 2012 г. – 106 с. – (ЭБС IPR-books <http://www.iprbookshop.ru/>)

2. Техника и технология утилизации нефтяных отходов [монография] / Н. С. Миниغازимов [и др.]; Акад. наук Респ. Башкортостан, ГУП НИИ безопасности жизнедеятельности. - Уфа: Гилем, 2010. – 313с.

Дополнительная

3. Биотехнология: Теория и практика / Н.В. Загоскина, [и др.]. – М.: Изд-во: Оникс. - 2009. – 496 с.

4. Биотехнология микробного синтеза / Под ред. М.Е. Беккера. – Рига: Зинатне, 1980. – 350 с.

5. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. - СПб.: Наука, 1995. – 600с.

6. **Волова, Т.Г.** Экологическая биотехнология: уч. пособие для университетов / Т.Г. Волова. - Новосибирск: Хронограф, 2007. – 141с.

Лекция 11

ПУТИ ПОИСКА И СОЗДАНИЯ НОВЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

11.1 Сверхпродуценты антибиотиков

Фактически ни один продуцент, выделенный из почвы или другого природного источника, непосредственно в производстве использован быть не может. Природный штамм образует лишь незначительные количества антибиотиков. Обработкой мутагенами и многоступенчатым отбором (селекцией) активных вариантов обычно удается повысить активность штамма, так как количество образуемого им антибиотика увеличивается в тысячи и даже десятки тысяч раз. Например, у продуцента пенициллина в результате десятков лет селекционной работы во многих лабораториях разных стран мира активность повысилась от десятков микрограммов до десятых долей грамма антибиотика в миллилитре среды.

У промышленных мутантных штаммов (рабочий термин «суперпродуценты») антибиотик, образуемый в огромном количестве, не должен влиять:

- на собственный биосинтез;
- жизнедеятельность своего продуцента.

Как известно, избыточное образование метаболита ведет к прекращению его биосинтеза по принципу обратной связи. В случае суперпродуцентов механизм обратной связи исключен.

Жизнедеятельность суперпродуцентов сохраняется в результате разных причин:

- максимум концентрации антибиотика достигается, когда рост культуры либо завершается, либо практически уже завершен;
- антибиотик синтезируется в местах клетки, отделенных от мест локализации жизненно важных метаболических процессов;
- после выхода антибиотика из мицелия в среду вновь в мицелий он не проникает, т.е. транспорт антибиотика через оболочку продуцента имеет одностороннее направление.

Однако свойство образовывать избыточные количества антибиотиков нестойко. Оно легко теряется полностью или частично, поэтому промышленные продуценты хранят в особых условиях, периодически проверяя их активность. При необходимости их рассеивают на отдельные колонии, из которых затем отбираются наиболее активные.

11.2 Биотехнология антибиотиков

Продуценты большинства антибиотиков, в том числе важнейших для медицинской практики, являются аэробами или (реже) факультативными анаэробами. В связи с этим в первые годы после получения пенициллина, грамицидина С и некоторых других веществ их продуценты выращивали на поверхности жидкой питательной среды в стационарных условиях в микробиологических матрасах или колбах, помещаемых в термостат или термостатные комнаты. Культура продуцента росла только на поверхности среды. Этот способ был трудоемок, не экономичен и не позволял нарабатывать антибиотик в больших количествах. Очень скоро поверхностная ферментация была заменена на глубинную. Через питательную среду

пропускали воздух и среду непрерывно перемешивали. Это позволило использовать для роста продуцента весь объем среды.

Только глубинная ферментация создала возможность современного биотехнологического производства с выпуском конечного продукта в большом количестве.

Вопросы для самоконтроля

1. Сверхпродуценты и их свойства
2. Питательные среды для культивирования антибиотиков

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Мудрецова-Висс, К.А. Микробиология, санитария и гигиена / К. А. Мудрецова-Висс, В. П. Дедюхина. - 4-е изд., испр. и доп.– М. : ИД ФОРУМ : Инфра-М, 2010.–400 с.
2. Санитарная микробиология [Электронный ресурс] / Р. Г. Госманов.–1-е изд. - Электрон. текстовые дан. – СПб.: Лань, 2010. – 240 с.
3. Нетрусов, А.И. Микробиология / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М. : Издательский центр «Академия», 2012. – 384 с.

Дополнительная

1. Асонов, Н. Р. Микробиология : Учебник / Н. Р. Асонов. – М. : Колос, 1980. – 310 с.

Лекция 12

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

12.1 Виды биореакторов и их применение

На смену минеральным материалам в биофильтрах с начала 80-х годов пришли пластмассы, обеспечивающие при высоких значениях удельной поверхности фильтрующего слоя большую пористость и лучшие гидродинамические свойства слоя. Это позволило строить высокие, не занимающие много места биореакторы и очищать промышленные стоки с высокой концентрацией загрязняющих веществ. Удельная поверхность пластмассовых насадок, используемых для быстрого фильтрования, выше, чем у щебеночных биофильтров.

Щебеночные биофильтры, имея более низкую объемную плотность, могут достигать высоты до 8–10 м. Этот тип биореактора при быстром режиме фильтрации стоков обеспечивает степень удаления 50–60 % БПК.

Для более высокой степени очистки применяют каскад биофильтров. В 1973 году в Великобритании был создан вращающийся биологический реактор, представляющий собой вращающиеся диски – «соты» из пластиковых полос, попеременно погружаемые в сточные воды и поднимаемые на поверхность. При этом площадь поверхности контакта с биослоем существенно возрастает и улучшается аэрация.

Более совершенным типом биореактора с неподвижной биопленкой является реактор с псевдоожиженным слоем, характеризующийся наличием носителя, покрытого микробной пленкой, достаточного для создания псевдоожиженного слоя восходящего потока жидкости. Реактор имеет систему подачи кислорода и устройство, обеспечивающее практически горизонтальное распределение потока жидкости в слое носителя. В качестве носителя в таких биореакторах может быть использован песок, через который пропускается кислород (система «Окситрон»). Применяют также волокнистые пористые подушечки с системой подачи кислорода в самом аппарате (установка «Кептор»).

Эксплуатация биофильтров – достаточно несложный процесс. Важное условие для эффективной работы биофильтров – тщательная предварительная очистка стоков от взвешенных частиц, способных засорить распределительное устройство. Неблагоприятными моментами в эксплуатации биофильтров является вероятность заливания, размножение мух на поверхности, дурной запах, как вследствие избыточного образования микробной биомассы.

В настоящее время около 70 % очистных сооружений Европы и Америки представляют собой капельные биофильтры. Срок службы таких биореакторов исчисляется десятками лет (до 50). Основной недостаток конструкции – избыточный рост микробной биомассы. Это приводит к засорению биофильтра и вызывает сбой в системе очистки. Предложенная недавно модификация представляет собой установку с чередующимся двойным фильтрованием. Система рециркуляции позволяет исключить негативные моменты, характерные для биофильтров.

12.2 Процессы биоочистки в аэротенке

Аэротенк относится к гомогенным биореакторам. Типовая конструкция биореактора представляет собой железобетонный герметичный сосуд прямоугольного сечения, связанный с отстойником. Аэротенк разделяется продольными перегородками на несколько коридоров, обычно 3–4. Конструкционные различных ряда типов аэротенков связаны, в основном, с конфигурацией биореактора, методом подачи кислорода, величиной нагрузки.

Процесс биоочистки в аэротенке состоит из двух этапов. Первый этап заключается во взаимодействии отстоявшихся сточных вод, содержащих около 150–200 мг/л взвешенных частиц и до 200–300 мг/л органических веществ, с воздухом и частицами активного ила в аэротенке в течение некоторого времени (от 4 до 24 ч и выше в зависимости от типа стоков, требований к глубине очистки и пр.). На втором – происходит разделение вод и частиц активного ила во вторичном отстойнике.

Биохимическое окисление органических веществ стоков в аэротенке на первом этапе реализуется в две стадии: на первой микроорганизмы активного ила адсорбируют загрязняющие вещества стоков, на второй – окисляют их и восстанавливают свою окислительную способность.

Подача воздуха в «коридоры» аэротенка осуществляется через пористые железобетонные плиты или через систему пористых керамических труб. Обычно воздухораспределительное устройство располагают не по центру, а около одной из стен коридора. В результате этого в аэротенке происходит турбулизация потока, и сточные воды не только продвигаются вдоль коридора, но и закручиваются по спирали внутри него. Это улучшает режим аэрации и условия очистки.

Процесс очистки в аэротенке представляет собой непрерывную ферментацию. Частицы активного ила, образованные бактериями и простейшими, являются флокулирующей смесью. По сравнению с биопленкой, функционирующей в биофильтрах, активный ил аэротенков представляет собой меньшее экологическое разнообразие видов.

Основные группы бактериальной компоненты активного ила флокулирующие бактерии, нитчатые бактерии и бактерии-нитрификаторы. Первая группа бактерий не только принимает участие в деградации органических компонентов стоков, но и формирует стабильные флокулы, быстро осаждающиеся в отстойнике с образованием плотного ила. Нитрификаторы (*Nitrosomonas* и *Nitrobacter*) превращают восстановленные формы азота в окисленные.

Нитчатые бактерии, с одной стороны, образуют скелет, вокруг которого образуются флокулы, с другой, – стимулируют неблагоприятные процессы (образование пены и плохое осаждение). Простейшие потребляют бактерии и снижают мутность стоков, наибольшее значение среди них имеют инфузории (*Vorticella*, *Opercularia*).

Активный ил является совокупностью микроорганизмов и простейших, обладающих набором ферментов для удаления загрязнений из стоков. Активный ил имеет также поверхность с сильной адсорбционной способностью. Концентрация активного ила в аэротенке обычно составляет 1.5–5.0 г/л. Эта величина зависит от уровня загрязнений стоков, от возраста ила и его продуктивности. Возраст ила вычисляют по уравнению

$$T = MV / (m\mu + G_{\text{свых}}),$$

где M – взвешенные частицы иловой смеси, $\text{кг}/\text{м}^3$; V – объем аэротенка, м^3 ; mu – количество удаляемого ила, $\text{кг}/\text{сут}$; G – расход воды, $\text{м}^3/\text{сут}$; свх. – концентрация ила в выходном стоке, $\text{кг}/\text{м}^3$.

Например, для достижения нитрификации с участием медленно растущих нитрификаторов используют ил большого возраста (12 суток), а для окисления органики возраст ила существенно ниже.

Рабочая концентрация растворенного кислорода вычисляется на основе расчетной потребности установки. Для полной нитрификации она составляет не менее 2 мг/л; для окисления углерода и денитрификации – менее 1 мг/л.

На практике в зависимости от типа аэрации применяют несколько типов режимов очистки стоков: быструю, стандартную и продленную. Быстрые процессы применяют при частичной очистке стоков. Наиболее распространенный тип очистки – это процесс, средний между стандартной и быстрой аэрацией. Степень аэрации определяет допустимую нагрузку по органическому веществу во входных стоках и качество очистки.

Следующим важным параметром для расчета процесса биоочистки в гомогенных проточных биореакторах служит режим перемешивания. Известны системы полного смешения и идеального вытеснения. Первый тип обеспечивает мгновенное разбавление входного потока в аэротенке. Это защищает микрофлору активного ила от ингибирующего воздействия загрязнителей стоков. Активный ил в такой системе, однако, имеет худшую способность к оседанию в отличие от систем идеального вытеснения. В последних активный ил поступает в первый коридор, где в ходе аэрации восстанавливает свою окислительную способность. Сточные воды поступают во второй коридор вместе с регенерированным активным илом. Концентрация загрязняющих веществ снижается постепенно, по мере прохождения стоков по системе коридоров аэротенка. В таких системах концентрация загрязняющих веществ во входном потоке не должна превышать предельно допустимую для биологических компонентов, образующих активный ил.

Опыт эксплуатации различных типов аэротенков показывает, что содержание органических веществ в стоках, подаваемых на очистку, не должно превышать 1000 мг/л. Оптимальная величина рН обычно лежит в диапазоне 6.5–8.5. Количество биогенных элементов в очищаемых стоках корректируется добавками необходимых солей. Так, при БПК около $0.5 \text{ кг } \text{O}_2/\text{м}^3$ содержание усвояемого азота в стоках должно быть не ниже 10, фосфатов – 3 мг/л. Лучшие результаты очистки вод в аэротенках получают при величине входного БПК до $0.2 \text{ кг } \text{O}_2/\text{м}^3$. Если уровень аэрации при таком БПК составляет до $5 \text{ м}^3/\text{м}^2 \times \text{ч}$, БПК очищенной воды может упасть до $0.015 \text{ кг } \text{O}_2/\text{м}^3$.

Прирост биомассы активного ила в ходе очистки приводит к его «старению» и снижению биокаталитической активности. Поэтому большая часть активного ила после вторичного отстойника выводится из системы, и только часть ила возвращается в реактор. Аэротенки технологически связаны с вторичными отстойниками, в которых происходит осветление выходящих вод и отделение активного ила. Отстойники выполняют также функцию контактных резервуаров. В них сточную воду хлорируют. Дезинфицирующая доза хлора после биологической очистки в зависимости от качества очистки составляет 10–15 мг/л при продолжительности контакта хлора с жидкостью не менее 30 минут.

Биологические (очистные) пруды используются в качестве самостоятельного очистного сооружения или конечного пункта очистки стоков, прошедших стадию биоочистки в биофильтре или аэротенке. Если очистные пруды функционируют как

самостоятельные системы водоочистки, сточные воды перед поступлением в них разбавляются трех-, пятикратными объемами технической или хозяйственно-питьевой воды. Срок «созревания» прудов в зонах умеренного климата – не менее одного месяца.

12.3. Прогрессивные технологии биоочистки

Методы аэробной биологической очистки сточных вод непрерывно совершенствуются. В последние годы стали внедряться более эффективные системы биоочистки. Это процессы в шахтных реакторах, процессы с использованием для аэрирования кислорода. Такие биореакторы называют окситенками. Концентрация растворенного кислорода в окситенках достигает 10–12 мг/л. Это в несколько раз превосходит уровень аэрации в аэротенках. В результате повышенной аэрации стоков концентрация активного ила в них возрастает до 15 г/л и их окислительная мощность в 4–5 раз превосходит аэротенки.

Шахтные биореакторы позволяют реализовать процесс очистки стоков аналогично протеканию его в окислительном канале, но расположенном вертикально. Такие реакторы занимают небольшие площади и большей частью заглублены в грунт. Высота шахтных аппаратов достигает 50–150 м при диаметре 0.5–10.0 м. Внутри аппарата вмонтирован полый стержень или специальное устройство, обеспечивающее образование зон восходящего и нисходящего потоков для циркуляции потоков очищаемой воды. Направление циркуляции задается вдуванием воздуха в секцию с восходящим потоком на относительно небольшой глубине. Аппараты компактны, обеспечивают хороший массоперенос кислорода, (до 4.5 кг/м³ ч). При этом уровень нагрузки на ил может достигать 0.9 кг БПК/кг×сут.

Основной проблемой, возникающей при эксплуатации окситенков, является проблема отделения твердых частиц от иловой смеси. Микропузырьки воздуха прилипают к твердым частицам и ухудшают осаждение. Для улучшения осаждения применяют вакуумную дегазацию, флотацию, отдувку воздуха. После стадии дегазации иловая смесь направляется в аэротенк, где после удаления микропузырьков происходит доокисление оставшейся органики. Далее стоки поступают по обычной схеме в отстойник.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Какими бывают биореакторы для очистки сточных вод?
- 2) Этапы процесса биоочистки в аэротенке?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Сазонова, И.А.** Экологическая биотехнология: учебное пособие / И.А. Сазонова. Саратов, 2012 г. – 106 с. – (ЭБС IPR-books <http://www.iprbookshop.ru/>)
2. **Колесников, С.И.** Экологические основы природопользования / С.И. Колесников. - М.: Издательско-торговая корпорация «Дашков и К», 2010. – 156с.

Дополнительная

3. **Волова, Т.Г.** Экологическая биотехнология: уч. пособие для университетов / Т.Г. Волова. - Новосибирск: Хронограф, 2007. – 141с.
4. Елинов, Н.П. Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. - СПб.: Наука, 1995. - 600с.
5. Биотехнология /Под ред. А. А. Баева. – М: Наука, 1984. – 309с.
6. Экологическая биотехнология / Под редакцией К.Ф. Форстера и Дж. Вейза Л.: Химия, 1990. – 384с.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. **Баадер, В.** Биогаз – теория и практика / В. Баадер, Е. Доне, М. Брендерфельд. – М.: 1982.
2. Биотехнология / Под ред. Баева А.А. – М.: Наука, 1988 г. – 309с.
3. Биотехнология. Принципы и применение: Пер с англ /Под. ред. И. Хиггинса, Д. Беста и Дж. Джонса. — М: Мир, 1988. —480 с.
4. Биотехнология: свершения и надежды: Пер. с англ./Под ред В. Г. Дебабова.— М.: Мир, 1987.—411 с.
5. Биотехнология: Теория и практика / Н.В. Загоскина, [и др.]. – М.: Изд-во: Оникс. - 2009. – 496 с.
6. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с.
7. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии)/В.А.Блинов – Саратов: ОГУП РИК «Полиграфия Поволжья», 2003. – 196с.
8. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1./В.А.Блинов – Саратов:СГАУ, 2003. – 161 с.
9. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 2./В.А.Блинов – Саратов:СГАУ, 2004. – 144 с.
10. **Волова, Т.Г.** Экологическая биотехнология: уч. пособие для университетов / Т.Г. Волова. - Новосибирск: Хронограф, 2007. – 141с.
11. **Гальченко, В.Ф.** Метанотрофные бактерии / В.Ф. Гальченко. – М.: ГЕОС, 2001. – 500с.
12. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение/Б.Глик, Дж.Пастернак. – М, 2002. — 720 с.
13. **Егорова, Т. А.** Основы биотехнологии/Т.А. Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. — М.: Издательский центр «Академия», 2003. — 208 с.
14. *Журналы: «Биотехнология»*
15. Ильяшенко, Н.Г. Микробиология пищевых производств / Н.Г. Ильяшенко, Е.А. Бетева, Т.В. Пичугина, А.В. Ильяшенко. – М.: КолосС, 2008. – 412 с.
16. Кислухина, О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов / О.В. Кислухина. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 336 с.
17. **Колесников, С.И.** Экологические основы природопользования / С.И. Колесников. - М.: Издательско-торговая корпорация «Дашков и К», 2010. – 156с.
18. **Корте, Ф.** Экологическая химия / Ф. Корте, М. Бахадир, В. Клайн и др. М.: Мир, 1996. – 396с.
19. **Кретович, В.Л.** Биохимия азота воздуха растениями / В.Л. Кретович. – М.: Наука, 1994.
20. **Минеев, В.М.** Химизация земледелия и природная среда, М.: Агропромиздат, 1990. - С.5.
21. **Мягков, М.И.** Твердые бытовые отходы города / М.И. Мягков, Г.М. Алексеев, В.А. Ольшанецкий. - Л.: Стройиздат, 1978. - С.51-69.
22. **Нетрусов, А.И.** Микробиология: учебник для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, И.Б.Котова. – 2-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 352 с.
23. **Никольский, К.С.** Биомасса из отходов производства / К.С. Никольский, В.В. Соколов //Химия в сельском хозяйстве. - № 3-4. – 1993. - С.20-21.
24. Пищевая биотехнология. Кн. 2. Переработка растительного сырья/ Под ред. И.М. Грачевой. – М.: КолосС, 2008.-472 с.
25. Рогов, И.А. Пищевая биотехнология / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Г.П. Шуваева. Кн. 1. – М.: КолосС, 2004. – 440 с.
26. **Рыбчин, В.Н.** Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб.: Изд-во СПбГТУ, 1999.
27. **Сазонова, И.А.** Экологическая биотехнология: учебное пособие / И.А. Сазонова. Саратов, 2012 г. – 106 с. – (ЭБС IPR-books <http://www.iprbookshop.ru/>)
28. Санитарная микробиология [Электронный ресурс] / Р. Г. Госманов. – 1-е изд. – Электрон. текстовые дан. – СПб.: Лань, 2010. – 240 с.

29. Сельскохозяйственная биотехнология / Под. ред. В.С. Шевелухи. – М.: Высшая школа 2003. – 469 с.
30. **Тихонович, И.А.** Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции/ И.А. Тихонович, Н.А. Проворов. – СПб.: Наука, 1998.
31. **Черных, Н.А.** Негативное воздействие тяжелых металлов на почвы // Химизация сельского хозяйства. - №1. – 1991. - С.40-42.
32. **Шевелуха, В.С.** Сельскохозяйственная биотехнология/В.С. Шевелуха, Е.А.Калашникова, Е.С.Воронин. – М., 2003. – 469 с.
33. Экологическая биотехнология / Под редакцией К.Ф. Форстера и Дж. Вейза Л.: Химия, 1990. – 384с.
34. Экология микроорганизмов: Учеб. для студ. вузов / А.И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко и др. / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 272 с.
35. **Эмануэль, Н.М.** Курс химической кинетики / Н.М. Эмануэль, Д.Г. Кнорре. - Изд. 4-е, М.: Высшая школа, 1984. – 234с.
36. **Эрнст, Л.К.** Биотехнология сельскохозяйственных животных / Л.К. Эрнст, М.И. Прокофьев. – М.: Колос, 1995.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Лекция 1 Применение бактерий в народном хозяйстве	4
Лекция 2. Ферментативные и микробиологические процессы в бродильных производствах.	16
Лекция 3. Микробиологические процессы, протекающие при производстве спирта.	19
Лекция 4. Микробы-контаминанты бродильных производств.	23
Лекция 5. Лектины и их классификация. Биотехнологические аспекты получения и применения лектинов.	27
Лекция 6. Полисахариды и их применение в народном хозяйстве.	30
Лекция 7. Получение кормовых белков.	33
Лекция 8. Антибиотики как вторичные метаболиты и их продуценты. Механизм действия антибиотиков.	36
Лекция 9. Микробиологическая трансформация металлов.	39
Лекция 10. Биodeградация токсичных веществ, компостирование.	42
Лекция 11. Пути поиска и создания новых антимикробных препаратов.	46
Лекция 12. Применение микроорганизмов в технологии очистки сточных вод.	48
Библиографический список	53