

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙ-  
СКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«Северо-Кавказский федеральный университет»

Невинномысский технологический институт (филиал)

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗА-  
НЯТИЙ**

**ПО ДИСЦИПЛИНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ  
ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ И КОСМЕТИЧЕСКИХ  
СРЕДСТВ**

**ДЛЯ СТУДЕНТОВ ОФО НАПРАВЛЕНИЯ ПОДГОТОВКИ  
18.03.01 ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ**

Невинномысск, 2021г.

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями ФГОС ВО и рабочей программы дисциплины «Биотехнология в производстве химико-фармацевтических и косметических средств». Указания предназначены для студентов очной/заочной формы обучения направления подготовки 18.03.01 Химическая технология.

Содержат основные разделы изучаемого теоретического материала, перечень вопросов необходимых для проработки, а также список рекомендуемой литературы.

*Составители*

*Отв. редактор*

## Введение

Методические указания выполнены на современном научном уровне и рассчитано на студентов, обладающих достаточной подготовкой по разделам общей химии, физики и математики.

Методические указания составлены для проведения лабораторных занятий курса «Биотехнология в производстве химико-фармацевтических и косметических средств» с учетом требований стандарта ФГОС ВО для подготовки бакалавров направления 18.03.01 «Химическая технология».

В результате освоения материала всех разделов пособия по дисциплине «Биотехнология в производстве химико-фармацевтических и косметических средств» ООП студент приобретает следующие компетенции:

| Планируемые результаты обучения по дисциплине (модулю), характеризующие этапы формирования компетенций  | Формируемые компетенции |
|---|-------------------------|
| <b>Знать:</b> мероприятия по оптимизации технологических режимов производства парфюмерно-косметической и фармацевтической продукции   | <b>ПК-1</b>             |
| <b>Знать:</b> контроль качества продукции на всех стадиях производственного процесса биохимического производства  | <b>ПК-2</b>             |
| <b>Уметь:</b> анализировать качество сырья и материалов, полуфабрикатов биохимического производства;  | <b>ПК-1</b>             |
| <b>Уметь:</b> использовать знания о строении вещества, природе химической связи в различных классах химических соединений для понимания свойств материалов и механизма химических процессов, протекающих в окружающем мире. | <b>ПК-2</b>             |
| <b>Владеть:</b> методами разработки мероприятия по оптимизации технологических режимов производства парфюмерно-косметической и фармацевтической продукции;  | <b>ПК-1</b>             |
| <b>Владеть:</b> методами оценки качества сырья и материалов, полуфабрикатов биохимического производства   | <b>ПК-2</b>             |

## **Практическое занятие №1** Характеристика основных объектов биотехнологии

**Цель работы:** ознакомиться с классификацией объектов биотехнологии и дать характеристику основных представителей

### **Теоретическая часть:**

Идея классификации биотехнологий по цветам зародилась в 2003 г. на американо-европейской встрече по биотехнологиям (US-EC Biotech meeting) и была предложена ученым Ритой Колвелл (Dr. R. Colwell), директором Национального американского фонда (Director, US National Foundation).

Было предложено обозначать биотехнологию цветами. Первая классификация состояла всего из трех цветов:

- 1) красная для медицины,
- 2) зеленая для сельского хозяйства,
- 3) белая для промышленности.

Поэтому флаг Италии стал считаться также флагом биотехнологий.

Постепенно количество цветов увеличилось.

"красная" биотехнология – биотехнология, связанная с обеспечением здоровья человека и потенциальной коррекцией его генома, а также с производством биофармацевтических препаратов (протеинов, ферментов, антител);

"зеленая" биотехнология - направлена на разработку и создание генетически модифицированных (ГМ) растений, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам, определяет современные методы ведения сельского и лесного хозяйства;

"белая" - промышленная биотехнология, объединяющая производство биотоплива, биотехнологии в пищевой, химической и нефтеперерабатывающей промышленности;

"серая"- связана с природоохранной деятельностью, биоремедиацией;

"синяя" биотехнология – связана с использованием морских организмов и сырьевых ресурсов.

Самая широкая типология биотехнологий, представленная в большом количестве англоязычных научных работ, содержит десять отраслей, где к традиционным отраслям добавляются следующие:

черная (или темная, dark) биотехнология, связанная с военными целями и терроризмом;

фиолетовая биотехнология, связанная с патентованием биотехнологических открытий и разработок, а именно со всеми вопросами интеллектуальной собственности;

золотая биотехнология, посвященная вопросам биоинформатики и нанобиотехнологиям;

коричневая биотехнология, связанная с биотехнологическим решением проблем пустынных и аридных территорий (пространственная и геомикробиология).

Современные направления развития и использования биотехнологии.

В связи с бурным развитием биологических наук (особенно молекулярной биологии и генетики) в последние десятилетия появились и уже успешно используются на практике новые методы создания усовершенствованных форм растений, животных и микроорганизмов.

К этим современным методам селекции и биотехнологии относятся в первую очередь генная инженерия и клеточная инженерия.

В результате применения методов генной инженерии получены многие бактерии-сверхпродуценты. Они обеспечивают очень высокий уровень синтеза нужного человеку продукта.

В бактериальной клетке содержится множество белков, каждый из которых составляет в среднем 0,04 % от их общей массы. У микроорганизмов-

сверхпродуцентов доля нужного человеку белка может достигать 20 % от их общей массы.

Бактерии-сверхпродуценты используются в настоящее время в промышленности при производстве многих биологически активных веществ (аминокислот, витаминов, антибиотиков), ферментов, биополимеров

Развиваются такие направления как медицина, в том числе молекулярная медицина, сельское хозяйство, охраны окружающей среды, генная инженерия и т.д.

они включают представителей как прокариот, так и эукариот), чрезвычайно разнообразны по своей структурной организации и биологическим характеристикам. К объектам биотехнологии относятся:

— вирусы- препараты соответствующих бактериофагов применяют для лечения бактериальных заболеваний — дизентерии и холеры;

— бактерии и цианобактерии- их применяют при производстве различных веществ: уксуса (*Glucobactersuboxidans*), молочнокислых напитков и продуктов (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*), а также микробных инсектицидов (*Bacillusthuringiensis*) и гербицидов, белков (*Methylomonas*), витаминов (*Clostridium*— рибофлавин); при переработке отходов, получении бактериальных удобрений, растворителей и органических кислот, биогаза и фотоводорода. Широко используется такое свойство некоторых бактерий, как diaзотрофность, т. е. способность к фиксации атмосферного азота, очистка с использованием бактерий почв и водоемов, загрязненных нефтепродуктами или ксенобиотиками, а также обогащение руд с помощью сероокисляющих бактерий;

— водоросли- использовании их в качестве пищевых продуктов или как сырья для получения различных веществ, ценных для человека, съедобные водоросли богаты минеральными веществами, особенно йодом, их исполь-

зуют как витаминную добавку к кормам для сельскохозяйственных животных, Красные водоросли служат источником получения агар-агара;

— лишайники-выделяемые из них лишайниковые кислоты используют в качестве компонента лекарственных средств от ряда заболеваний, например кожных, получают душистые вещества, применяемые в парфюмерии;

— грибы-их используют для получения таких продуктов, как: лимонная кислота (аспергиллус); гиббереллины и цитокинины (физариум и ботритис); каротиноиды (пстаксантин, придающий мякоти лосо-севых рыб красно-оранжевый оттенок, вырабатывают грибы *Rhaffiarhodozima*); белок (*Candida*, *Saccharomyces lipolitica*); *Trichonporoncutaneum*, окисляющий многочисленные органические соединения, включая некоторые токсичные (например, фенол), играет важную роль в системах аэробной переработки стоков.;

— водные растения-водный папоротник азолла ценится как органическое азотное удобрение, поскольку растет в тесном симбиозе с синезеленой водорослью анабена, рясковые высокопродуктивны, неприхотливы в культуре, хорошо очищают воду и обогащают ее кислородом;

— клетки растений и животных

Преимущества использования микроорганизмов в качестве объектов биотехнологии.

Микроорганизмы как основные объекты биотехнологии.

Бактерии, грибы, водоросли, лишайники, вирусы, простейшие в жизни людей играют значительную роль. С давних времен люди использовали их в процессах хлебопечения, приготовления вина и пива, в различных производствах. В настоящее время в связи с проблемами получения ценных белковых веществ, увеличения плодородия почв, очищения окружающей среды от загрязнителей, получения биопрепаратов и другими целями и задачами диапазон изучения и использования микроорганизмов значительно

расширился. Микроорганизмы помогают людям в производстве эффективных питательных белковых веществ и биологического газа. Их используют при применении биотехнических методов очистки воздуха и сточных вод, при использовании биологических методов уничтожения сельскохозяйственных вредителей, при получении лечебных препаратов, при уничтожении утильсырья. Некоторые виды бактерий используются для регенерации ценных метаболитов и лекарств, их используют с целью решения проблем биологического саморегулирования и биосинтеза, очищения водоемов. Создана биотехнологическая промышленность для получения антибиотиков, ферментов, интерферона, органических кислот и других метаболитов, продуктами которых являются многие микроорганизмы.

Простейшие являются продуцентами не только ферментов, но и гистонов, серотонина, липополисахаридов, липополипептидогликанов, аминокислот, метаболитов, применяемых в медицине и ветеринарии, пищевой и текстильной промышленности. Они являются одним из объектов, применяемых в биотехнологии. Возбудитель южноамериканского трипаносомоза *Trypanosoma cruzi* является продуцентом противоопухолевого препарата круцина и его аналога – трипанозы. Эти препараты оказывают цитотоксическое действие на клетки злокачественных образований. Поскольку биомасса простейших содержит до 50% белка, свободноживущие простейшие используются в качестве источника кормового белка для животных. Бактериальные ферменты (*Bac.subtilis*) используются для сохранения свежести кондитерских изделий и там, где нежелателен глубокий распад белковых веществ. Использование ферментных препаратов из *Bac.subtilis* в кондитерском и хлебобулочном производстве способствует улучшению качества и замедлению процесса черствления изделий. Ферменты *Bac. mesentericus* активизируют депелирование кожевенного сырья. Микроорганизмы широко используются в пищевой и бродильной промышленности, микроорга-



низмы широко используются при очистке биологическим методом вод морей от нефтепродуктов и изготавливают микробиологические препараты, уничтожающие многих вредных насекомых.

Преимущества использования микроорганизмов:

- 1) обладают огромным генетическим разнообразием, позволяющим им осуществлять:
  - а) практически неограниченную биосинтетическую деятельность;
  - б) разложение (деградацию) большого количества природных и природных соединений.
- 2) отличаются быстрым ростом, скорость которого намного превышает скорость роста высших организмов (растений и животных). Это позволяет за короткий промежуток времени осуществить синтез больших количеств требуемого продукта в строго контролируемых условиях.

Микроорганизмы можно выращивать на различных питательных средах: на газах, нефти, отходах угольной, химической, пищевой, вино-водочной, деревообрабатывающей промышленности.

- В настоящее время относительно хорошо охарактеризовано (или известно) более 100 тысяч различных видов микроорганизмов.
- Это в первую очередь прокариоты (бактерии, актиномицеты, риккетсии, цианобактерии) и часть эукариот (дрожжи, нитчатые грибы, некоторые простейшие и водоросли).
- Важной проблемой является правильный выбор организма, который способен обеспечить получение требуемого биотехнологического продукта.

### **Контрольные вопросы:**

#### **Базовый уровень**

1. Дайте определение традиционной и новейшей биотехнологии.
2. Охарактеризуйте место и роль биотехнологии как науки, связь ее с другими науками.

3. Какие основные периоды можно выделить в развитии биотехнологии?

4. Охарактеризуйте допастеровский этап в развитии науки.

5. Каковы основные открытия и разработки послепастеровской эры в биотехнологии?

6. Каково значение эры антибиотиков в развитии и становлении биотехнологии?

7. Перечислите основные открытия «Эры управляемого биосинтеза».

8. Каковы основные достижения биотехнологии на современном этапе?

### **Повышенный уровень**

1. Охарактеризуйте перспективы развития биотехнологии в настоящее время?

2. Назовите основные объекты биотехнологии.

3. На каких методах базируется наука биотехнология?

4. Назовите основные составные части биотехнологии и дайте их краткую характеристику.

5. Какие стадии характерны для всех биотехнологических процессов? Укажите назначение каждой и дайте краткую характеристику.

## **Практическое занятие № 2 Экологические аспекты биотехнологии**

**Цель работы:** получить представление о роли и практическом применении биотехнологических процессов в обеспечении безопасности окружающей среды.

### **Теоретическая часть:**

Стремление увеличить ресурсы питания приводит к быстрому ухудшению экологической ситуации в сфере сельскохозяйственного производства.

Происходят истощение почвы (уменьшение гумуса), ее уплотнение и засорение минеральными веществами, ядохимикатами, загрязнение водоемов, продуктов питания. В результате недостатка в почве органических удобрений в последнее время наблюдалось существенное снижение гумуса. Потери гумуса в процессах минерализации при культивировании различных культур приведены ниже. Овощные культуры и картофель  
Зерновые Травы  
однолетние многолетние  
Потери гумуса, кг/га в год 1300—1800 700—900  
500—700 700—900  
Некоторые фермерские хозяйства, издавна широко применяют в качестве органического удобрения навоз. В среднем 1 т навоза дает 40—50 кг гумуса. Ежегодно на 1 га земли вносят 10—20 т навоза, что позволяет возобновить запасы гумуса. Необходимо отметить, что на фоне недостатка гумуса в почвах снижается эффективность применения минеральных удобрений. В 1948 г. в Чехословакии 1 кг минеральных удобрений обеспечивал получение 100 кг пшеницы или 162 кг зерна кукурузы. Двадцать лет спустя (1968 г.) то же количество минеральных удобрений дали лишь 26 кг пшеницы или 34 кг кукурузы (Малек, 1978). Эффективность использования 1 т навоза видна из приведенных ниже данных.

|                |        |      |                            |                               |                 |           |                     |
|----------------|--------|------|----------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|
| Пшеница озимая | яровая | Рожь | Многолетние травы для сена | Зеленая масса для силосования | Сахарная свекла | Картофель | Прибавка урожая, кг |
| 27             | 17     | 24   | 36                         | 153                           | 182             | 101       |                     |

Производство минеральных удобрений связано с большим потреблением энергии. Снижение эффективности минеральных удобрений

наблюдается, в частности, в западных странах. Об этом свидетельствуют средние данные за 1940 и 1985 гг. (табл. 1). В 1940 г. почвы содержали достаточно гумуса. Как видно из таблицы, увеличение количества вносимых в почву минеральных удобрений в 11,5 раза дало рост урожая зерновых всего на 13,5%. Одновременно применение минеральных удобрений на фоне низкого содержания в почве органических веществ вызывает большой унос минеральных веществ с водой, что ухудшает экологическую ситуацию в регионе. Создание больших животноводческих комплексов также привело к загрязнению атмосферы веществами с неприятным запахом и патогенными микроорганизмами, почвы — сорняками, водоемов — патогенными микроорганизмами и гельминтами. В последнее время много пишется о загрязнении ядохимикатами почвы, водоемов и сельскохозяйственной продукции. Российское овощеводство и садоводство имеют в этом смысле очень горький опыт. Но это касается не только России. Развитые сельскохозяйственные страны мира допускают увеличение содержания нитратов в овощах до 900 мг/кг при норме 300 мг/кг, а во фруктах, до 1000 мг/кг и выше. Сами по себе нитраты малотоксичны, но в организме они преобразуются в нитриты, которые могут участвовать в образовании ядовитых веществ — нитрозаминов. Присутствие в среде нитритов сильно замедляет рост хлебопекарных дрожжей, поэтому регулярно определяют присутствие нитритов. Хуже дело обстоит с контролем пищевых продуктов, в частности плодов и овощей. Необходимо отметить, что при больших нагрузках минерального азота в процессах денитрификации возможно образование не только азота, но и его оксида ( $N_2O$ ), который подобно фреону может отрицательно влиять на озоновый слой, окружающий планету. Водоемы и почва представляют собой биологические системы, способные утилизировать отходы. В почву помимо отходов сельского хозяйства (навоз, солома и др.) попадают коммунальные и промышленные отходы.

Как известно, навоз, компосты и солома являются удобрениями для полей. Однако необходимо знать предельные количества внесения удобрений. Вокруг крупных животноводческих комплексов требуются большие земельные площади, чтобы без ущерба для почвы утилизировать образующийся навоз. Жидкий свиной навоз перед вывозом на поле необходимо выдержать 6—8 мес., чтобы инактивировать патогенную микрофлору. При использовании отходов животноводческих ферм для удобрения полей, один из критериев — содержание азота, максимально допустимая доза которого составляет 300 кг/га. Практика показывает, что количество жидких отходов свиноферм, вносимых методом орошения за 1 год на площадь 1 га, не должен превышать 250 м<sup>3</sup>. Но на больших животноводческих комплексах ежедневно образуются сотни тонн жидких отходов, следовательно, под них требуется сотни гектаров земель. На полях можно утилизировать также отходы пищевой промышленности, ил очистных сооружений. Допустимое количество отходов зависит от свойств почвы, химического и биологического состава отходов. В большинстве случаев отходы перед внесением в почву предварительно обрабатывают аэробной или анаэробной ферментации, выдержки, обезвоживания и др. При выборе способа утилизации отходов на полях или при внесении прежде всего требуется учитывать опасность заражения растительной массы, животных и человека вредными химическими веществами или болезнетворными микроорганизмами. В почве происходят физические, химические и биологические изменения отходов, некоторые компоненты трансформируются, другие иммобилизуются. Важно отметить, что почва хорошо задерживает фосфорные соединения, которые могут использовать растения. В среднем на 1 га земли за год можно вернуть в виде растительной массы 20—60 кг фосфора. Способность сорбировать фосфор зависит от содержания в почве гумуса, алюминия, железа, кальция и от рН. Утилизация азота зависит от потребления его

растениями, интенсивности денитрификации и степени перехода азота в аммиак, а также от количества отходов на единицу площади земли. Скорость разрушения органических компонентов в почве различная, поэтому у некоторых веществ период полураспада длится месяцами, а у некоторых продолжительность полураспада измеряется часами и минутами. Скорость разрушения зависит от свойств почвы, температуры, влажности, pH и других факторов. Так, органические вещества в почве трансформируются микроорганизмами и другими биологическими объектами, а неорганические обычно абсорбируются частицами почвы или осаждаются, но не разрушаются. Особую опасность представляют тяжелые металлы, поэтому их количество в почве строго лимитируется. По данным Р. Ц. Лоера (R. C. Loehr, 1984) в почву можно внести (в кг/га): цинк не более 1000, медь и никель не более 500, а кадмий не более 20. Вносить металлы можно в почвы с высокой катионообменной способностью; в почвы с низкой катионообменной способностью допустимые количества цинка, меди, никеля и кадмия соответственно 250, 125, 125 и 5 кг/га.

При необходимости, если отработанный воздух содержит вредную микрофлору или вещества, а также имеет неприятный запах, газовую среду обрабатывают в печах с инфракрасным обогревом. На практике при аэробной очистке разбавленных стоков широко применяют аэробные фильтры, или триклеры. Это вертикальные цилиндры, заполненные щебнем, камнем, углем размером 5—10 см. Высота фильтров может быть 2—3 м. Сверху на наполнитель обычно с помощью вращающегося разбрызгивателя подают очищаемые стоки. Жидкость стекает и покрывает частицы пленкой, в которой затем развивается аэробная микрофлора (в основном гетеротрофные бактерии). В присутствии кислорода происходит окисление органических веществ стоков, стекающая жидкость поступает в осадительные бассейны. Ил не рециркулирует. Аэробные фильтры обеспечивают производител-

ность 1—3 м<sup>3</sup>/(м<sup>2</sup>-сут). Для очистки разбавленных стоков используют также вращающиеся биологические контакторы. Эти аэробные очистительные устройства представляют собой цилиндры, в которых на горизонтальной оси по всей длине цилиндра установлены диски из пластмассы или шифера. На 35—45 % диаметра диски погружены в жидкий субстрат. При вращении оси с частотой 2—5 об/мин субстрат прилипает к поверхности диска и в виде пленки поднимается в воздушное пространство, где обогащается кислородом. Микрофлора преимущественно фиксируется (иммобилизуется) на поверхности дисков. Вращающиеся контакторы успешно применяют для переработки стоков с ВПК 130—200 мг/л и обеспечивают его снижение на 80—85 %. Таким образом, современные аэротенки фактически являются ферментаторами различной мощности, в которых выращивается активный ил. Как правило, в аэротенках реализуется только непрерывный процесс, чаще всего с рециркуляцией активного ила. Аэробную очистку стоков можно интенсифицировать путем создания псевдооживленного слоя с применением в качестве носителя ила инертных частиц, например песка, размером 0,3—0,9 мм. Другой путь интенсификации — повышение концентрации растворенного кислорода до 12 мг/л путем подачи технического кислорода. Анаэробные системы очистки стоков. Для очистки сточных вод в народном хозяйстве при утилизации отходов животноводческих ферм, производстве кормового витамина В12 и в других случаях используют метановое брожение. Этот процесс широко распространен в природе (разложение органических веществ в болотах, водоемах, в почве, у животных в рубце и т.д.). Метановое брожение — строго анаэробный процесс, осуществляется, как правило, в особых аппаратах — метантенках. Биодegradация органических веществ при метановом брожении в метантенках протекает в три последовательные фазы (табл. 8). В первой, гидролитической фазе около 76 % органических веществ переходит в выс-

шие жирные кислоты, до 20 % — в ацетат и 4 % — в водород. Первую фазу можно разбить, в свою очередь, на фазы гидролиза и ацидогенеза (кислотообразования). Во второй фазе главными являются процессы образования из высших жирных кислот ацетата (52 %) и водорода (24%). В третьей фазе (брожение) метаногенные бактерии образуют из ацетата 72 % метана, и СО<sub>2</sub> — 28 % метана. Соотношение промежуточных и конечных продуктов в процессе метанового брожения зависит от состава среды, условий ферментации и присутствующей микрофлоры.

### **Контрольные вопросы:**

#### **Базовый уровень**

1. Дайте определение первичных метаболитов. Назовите наиболее важные для промышленности группы этих соединений.
2. Какие соединения относят ко вторичным метаболитам? Приведите примеры.
3. В чем заключаются преимущества получения аминокислот биотехнологическим методом?
4. Перечислите основные органические кислоты. На чем основано их современное производство?
5. В чем суть получения микробных липидов?
6. Перечислите микроорганизмы, которые используются в качестве продуцентов в-каротина, витаминов В<sub>2</sub>, В<sub>12</sub>.
7. Каковы сферы применения ферментов?

#### **Повышенный уровень**

1. Назовите пути использования биотехнологии в растениеводстве.
2. Какие способы получения экологически чистой энергии Вы знаете?
3. Что такое биоремедиация? В каких случаях ее необходимо применять? Каковы ее преимущества?



### **Практическое занятие № 3** Биотехнологические процессы в фармацевтической промышленности

**Цель работы:** получить представление об использовании биотехнологических методов для получения микробного белка, ферментов, антибиотиков

#### **Теоретическая часть:**

Номенклатура лекарственных препаратов, полученных на основе биообъектов в силу объективных причин имеет тенденцию к своему расширению.

В категорию таких лекарственных препаратов входят:

1. лекарственные средства для лечения, в число которых входят аминокислоты и препараты на их основе, антибиотики, ферменты, коферменты, кровезаменители и плазмозаменители, гормоны стероидной и полипептидной природы, алкалоиды;
2. профилактические средства, в число которых входят вакцины, анатоксины, интерфероны, сыворотки, иммуномодуляторы, нормофлоры;
3. диагностические средства, в число которых входят ферментные и иммунные диагностикумы, препараты на основе моноклональных антител и иммобилизованных клеток.

Это далеко не полный перечень лекарственных препаратов, которые имеются в современной фармации, в основе производства которых используются биообъекты.

Что касается определения самого понятия биотехнологии, то оно следует из понятия самой технологии. Технология – это наука о развитии естественных процессов в искусственных условиях. Если эти процессы относятся к биосинтетическим или биокаталитическим, присущих клеткам прокариот и эукариот, когда в качестве элементной базы используются биообъекты для получения целевого (конечного) продукта, то такое производство называют биотехнологическим. Если же в роли целевого (конечного)

продукта выступает лекарственное средство, то такая биотехнология называется «биотехнология лекарственных средств».

В настоящее время фармацевтику характеризует как минимум третья часть лекарственных средств от общего объема производимых лекарств, которая использует современные биотехнологии. Суммируя все позиции определения биотехнологии, указанные выше, можно сказать, что «Биотехнология – это направление научно-технического прогресса, использующее биологические процессы и агенты для целенаправленного воздействия на природу, а также для промышленного получения полезных для человека продуктов, в том числе лекарственных средств».

Биотехнология – комплексная наука, это и наука и сфера производства со своим специфическим аппаратным оформлением. Биотехнология как сфера производства – это наукоемкая технология.

### **Контрольные вопросы:**

#### **Базовый уровень**

1. Перечислите фазы роста микроорганизмов. Дайте характеристику каждой из них.
2. Каков состав питательных сред для культивирования микроорганизмов?
3. Какое сырье используется в качестве компонентов питательной среды?
4. По каким факторам классифицируются способы культивирования микроорганизмов?
5. В чем заключается периодический способ культивирования?

#### **Повышенный уровень**

1. Как осуществляется непрерывное культивирование?
2. Какие микроорганизмы наиболее широко используются при про-

изводстве пищевых продуктов?

3. Какие продукты называют генетически модифицированными?

4. С какой целью используются методы генетической инженерии в растениеводстве, животноводстве, микробиологии?

5. Охарактеризуйте потенциальные опасности применения методов генетической инженерии.

## **Практическое занятие № 4 Требования, предъявляемые к микроорганизмам-продуцентам**

**Цель работы:** ознакомиться с требованиями, предъявляемыми к микроорганизмам-продуцентам целевого биотехнологического продукта

### **Теоретическая часть:**

Ассортимент продуктов, получаемых в биотехнологических процессах, чрезвычайно широк. По разнообразию и объемам производства на первом месте стоят продукты, получаемые в процессах, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов. Эти продукты подразделяются на три основные группы:

1- я группа - биомасса, которая является целевым продуктом (белок одноклеточных) или используется в качестве биологического агента (биометаногенез, бактериальное выщелачивание металлов);

2- я группа - первичные метаболиты - низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микроорганизмов в качестве строительных блоков макромолекул, коферментов (аминокислоты, витамины, органические кислоты);

3- я группа - вторичные метаболиты (идиолиты) - соединения, не требующиеся для роста микроорганизмов и не связанные с их ростом (антибиотики, алкалоиды, гормоны роста и токсины).

Среди продуктов микробиологического синтеза огромное количество различных биологически активных соединений, в том числе белковых и лекарственных веществ, ферментов, а также энергоносители (биогаз, спирты) и минеральные ресурсы (металлы), средства для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур (биоинсектициды) и биоудобрения. В связи с развитием новейших методов биотехнологии (инженерной энзимологии, клеточной и геной инженерии) спектр целевых продуктов непрерывно дополняется. Среди них все большее место занимают средства

диагностики и лечения (гибридомы, моноклональные антитела, вакцины и сыворотки, гормоны, модифицированные антибиотики).

Основными элементами, слагающими биотехнологические процессы, являются биологический агент, субстрат, аппаратура и продукт. Биологический агент - активное начало в биотехнологических процессах и один из наиболее важных ее элементов. Номенклатура биологических агентов бурно расширяется, но до настоящего времени важнейшее место занимает традиционный объект - микробная клетка. Микробные клетки с различными химико-технологическими свойствами могут быть выделены из природных источников и далее с помощью традиционных (селекция, отбор) и новейших (клеточная и генетическая инженерия) методов существенно модифицированы и улучшены.

При выборе биологического агента и постановке его на производство прежде всего следует соблюдать принцип технологичности штаммов. Это значит, что микробная клетка, популяция или сообщество особей должны сохранять свои основные физиологобиохимические свойства в процессе длительного ведения ферментации. Промышленные продуценты также должны обладать устойчивостью к мутационным воздействиям, фагам, заражению посторонней микрофлорой (контаминации); характеризоваться безвредностью для людей и окружающей среды, не иметь при выращивании побочных токсичных продуктов обмена и отходов, иметь высокие выходы продукта и приемлемые технико-экономические показатели. В настоящее время многие промышленные микробные технологии базируются на использовании гетеротрофных организмов, а в будущем решающее место среди продуцентов займут автотрофные микроорганизмы, не нуждающиеся для роста в дефицитных органических средах, а также экстремофилы - организмы, развивающиеся в экстремальных условиях среды (термофильные, алкало- и ацидофильные).

В промышленной биотехнологии применяют 3 вида штаммов микроорганизмов:

- 1) природные штаммы, улучшенные естественным и искусственным отбором (при производстве микробной биомассы);
- 2) штаммы, полученные в результате индуцированного мутагенеза;
- 3) генно-модифицированные (рекомбинантные) штаммы, обладающие самой высокой генетической нестабильностью.

Промышленные штаммы должны удовлетворять следующим требованиям:

1. Безвредность для потребителя и обслуживающего персонала.
2. Высокая скорость роста биомассы и целевого продукта (БАВ) при экономичном потреблении питательной среды.
3. Направленная биосинтетическая активность при минимальном образовании побочных продуктов.
4. Генетическая однородность и стабильность в отношении к субстратам и условиям культивирования.
5. Отсутствие токсических веществ в целевом продукте и промышленных стоках.
6. Устойчивость к фагам и другой посторонней микрофлоре.
7. Способность расти на дешевых и доступных субстратах, отходах пищевой и химической промышленности при высокой плотности клеток.

Только по совокупности этих и других свойств можно оценить полезность и рентабельность продуцента. Наиболее изучены и чаще применяются в биотехнологии бактерии рода *Clostridium*, *Thermo-anaerobacter*, *Bacillus*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Brefibacterium*. Основные виды микроорганизмов, используемых в промышленности для получения целевых продуктов, представлены в табл. 1.

Одноклеточные организмы характеризуются более высокими скоростями процессов синтеза, чем высшие растения и животные. Они могут перерабатывать в сутки объем биомассы, превышающий массу клетки в 30-40 раз. В действительности действуют разнообразные ограничивающие факторы. Однако возможности бактерий к быстрому размножению намного превосходят возможности других видов организмов, это их свойство является важнейшим при производстве микробного белка и БАВ.

**Микроорганизмы, используемые в промышленности для получения целевых продуктов**

| Организм                               | Тип      | Продукт                           |
|--|----------|-----------------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>        | Дрожжи   | Пекарские дрожжи, вино, эль,      |
| <i>Streptococcus thermophilus</i>      | Бактерии | Йогурт, ряженка                   |
| <i>Propionibacterium shermanii</i>     | Бактерии | Швейцарский сыр                   |
| <i>Gluconobacterium suboxy-</i>        | Бактерии | Уксус                             |
| <i>Penicillium roquefortii</i>         | Плесень  | Сыры типа рокфора                 |
| <i>Aspergillus oryzae</i>              | Плесень  | Саке                              |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>        | Дрожжи   | Этанол                            |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i>      | Бактерии | Ацетон                            |
| <i>Xanthomonas campestris</i>          | Бактерии | Полисахариды                      |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i>      | Бактерии | L-Лизин                           |
| <i>Candida utilis</i>                  | Дрожжи   | Микробный белок                   |
| <i>Propionibacterium shermanii</i>     | Бактерии | Витамин В12                       |
| <i>Aspergillus oryzae</i>              | Плесень  | Амилаза                           |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i>          | Дрожжи   | Лактаза                           |
| <i>Saccharomycopsis lipolytica</i>     | Дрожжи   | Липаза                            |
| <i>Bacillus</i>                        | Бактерии | Протеазы                          |
| <i>Endothia parasitica</i>             | Плесень  | Сычужный фермент                  |
| <i>Leocanostoc mesenteroides</i>       | Бактерии | Декстран                          |
| <i>Xanthomonas campestris</i>          | Бактерии | Ксантан                           |
| <i>Penicillium chrysogenum</i>         | Плесень  | Пенициллины                       |
| <i>Chehalosporium acremonium</i>       | Плесень  | Цефалоспорины                     |
| <i>Rhizopus nigricans</i>              | Плесень  | Трансформация стероидов           |
| <i>Гибридомы</i>                       | -        | Иммуноглобулины и монокло-        |
| <i>E. coli</i> (рекомбинантные штаммы) | Бактерии | Инсулин, гормон роста, интерферон |
| <i>Blakeslea trispora</i>              | Плесень  | Р-Каротин                         |
| <i>Bacillus thuringiensis</i>          | Бактерии | Биоинсектициды                    |
| <i>Bacillus popilliae</i>              | Бактерии | Биоинсектициды                    |

Бактерии биохимически универсальны, могут усваивать самые разнообразные питательные вещества и даже способны выбирать наилучшие органические соединения из смеси, поэтому могут приспосабливаться к самым разнообразным условиям существования.

В последние годы расширяется применение смешанных микробных культур и их природных ассоциаций. По сравнению с монокультурами микробные ас-



социации способны ассимилировать сложные, неоднородные по составу субстраты, минерализуют сложные органические соединения, имея повышенную способность к биотрансформации, имеют повышенную устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов среды и токсических веществ, а также повышенную продуктивность и возможность обмена генетической информацией между отдельными видами сообщества. Основные области применения смешанных культур: охрана окружающей среды, биodeградация и усвоение сложных субстратов, пищевая промышленность.

В любом биотехнологическом процессе ключевую роль играют биологический агент, его природа и физиологотехнологические свойства. Для роста любого биообъекта нужны исходный жизнеспособный посевной материал, источники энергии и углерода, питательные вещества для синтеза биомассы, отсутствие действия ингибиторов роста, соответствующие физико-химические условия ферментации (рН, температура, аэрация и др.).

Процессы культивирования микроорганизмов в биотехнологических производствах направлены на получение целевых продуктов, в качестве которых могут выступать как клетки микроорганизмов, так и продукты их жизнедеятельности. В то же время термин «культивирование» неразрывно связан с ростом и размножением клеток микроорганизмов.

Критериями оценки эффективности биотехнологических процессов являются: скорость роста продуцента, выход продукта, экономический коэффициент, непродуктивные затраты энергии, энергозатраты и затраты на обезвреживание отходов.

**Рост** - необратимое увеличение живой клеточной массы, приводящее к увеличению числа клеток микроорганизмов в результате размножения. Важнейшей количественной характеристикой этого процесса является удельная скорость роста  $\mu$ , выражающая увеличение биомассы клеток в единицу времени.

**Скорость роста продуцента** служит одним из основных показателей, характеризующих адекватность условий ферментации. Скорость роста (увеличение

биомассы) организмов с бинарным делением в хорошо перемешиваемой среде в периодической культуре будет пропорциональна концентрации микробной биомассы:

$$dX/dt = iX,$$

где  $dX/dt$  - скорость роста;  $X$  - биомасса;  $i$  - коэффициент пропорциональности (удельная скорость роста).

Удельная скорость роста  $i$  является одним из основных параметров, определяющих физиологическое состояние продуцента; ряд других параметров может быть выражен через этот показатель. Параметр аналогичен сложным процентам (например, если удельная скорость роста равна  $0,1 \text{ ч}^{-1}$ , то увеличение биомассы равно 10 % в час). Таким образом, ростовые процессы приводят к накоплению биомассы.

**Эффективность биотехнологического процесса** оценивается выходом продукта  $Y$  по субстрату («экономический коэффициент»), определяется как количество продукта, получаемого из данного количества субстрата:

$$Y = X/S_0 - S,$$

где  $S$  и  $S_0$  - конечная и исходная концентрации субстрата.

Данный коэффициент выражает эффективность использования субстрата для получения целевого продукта и является очень важной характеристикой, так как непосредственно связан с продуктивностью и позволяет влиять на себестоимость конечного продукта.

**Кривая роста микроорганизмов в периодических условиях.** В биотехнологии большое значение имеет анализ основных закономерностей роста и развития культивируемых микроорганизмов. В его основу положена кривая роста микроорганизмов в простых периодических условиях (рис. 1).

Живые и погибшие бактерии (общее число клеток)

Фаза тогшождения 5 i /



Время

Рис. 1. Кривая роста микроорганизмов:

- 1 и 2 (лаг-фаза и фаза ускорения роста) - подбор условий культивирования и состава питательной среды; 3 (лог-фаза) - синтез первичных метаболитов, образование биомассы; 4 и 5 (фаза торможения и стабионарная) - синтез вторичных метаболитов, «урожай биомассы»;
- 6 (фаза отмирания) - процессы стерилизации, внутриклеточные метаболиты

Подбор необходимых для культивирования форм микроорганизмов с заданными свойствами включает несколько этапов: выделение микроорганизмов, получение накопительных культур, выделение чистых культур.

**1. Выделение микроорганизмов.** Отбираются пробы из мест обитания микроорганизмов (почва, растительные остатки и т. д.). Применительно к углеводородокисляющим микроорганизмам таким местом может быть почва возле бензоколонок; винные дрожжи обильно встречаются на винограде; анаэробные целлюлозоразлагающие и метанобразующие микроорганизмы в больших количествах обитают в рубце жвачных животных.

**2. Получение накопительных культур.** Образцы вносят в жидкие питательные среды специального состава, создают благоприятные условия для развития продуцента (температура, pH, источники энергии, углерода, азота и т. д.). Для

накопления продуцента холестериноксидазы используют среды с холестерином в качестве единственного источника углерода; углеводород- окисляющих микроорганизмов - среды с парафинами; продуцентов протеолитических или липолитических ферментов - среды, содержащие белки или липиды.

**3. Выделение чистых культур.** На плотные питательные среды засевают образцы проб из накопительных культур. Отдельные клетки микроорганизмов на плотных питательных средах образуют изолированные колонии, или клоны, при их пересеве получают чистые культуры, состоящие из клеток одного вида продуцента. Другой путь подбора микроорганизмов - из имеющихся коллекций. Например, продуцентами антибиотиков чаще являются актиноми- цеты, этанола - дрожжи. Клон - культура, полученная из одной клетки, чистая культура - совокупность особей одного вида микроорганизмов, штаммы - культуры, выделенные из различных природных сред или из одной среды в разное время.

#### **Контрольные вопросы:**

##### **Базовый уровень**

1. Перечислите требования, предъявляемые к микроорганизмам- продуцентам метаболитов в биотехнологическом производстве.

2. Назовите 5-7 видов микроорганизмов, используемых в промышленности для получения целевых продуктов.

##### **Повышенный уровень**

1. Назовите критерии оценки эффективности биотехнологических процессов и охарактеризуйте их.

## Практическое занятие № 5 Изучение строения и свойств микроорганизмов, применяемых в фармацевтической биотехнологии

**Цель работы:** ознакомиться с морфологическим составом и характеристиками микроорганизмов, применяемых в фармацевтической биотехнологии.

### Теоретическая часть:

**Пропионовокислые бактерии.** Пропионовокислые (*Propionibacterium*) бактерии - род грамположительных факультативных анаэробных неподвижных бактерий, синтезирующих в процессе метаболизма пропионовую кислоту. *Propionibacterium* обычно имеют вид палочек размером 0,5-0,8 на 1,0-1,5 мкм; реже, в зависимости от условий и цикла развития, - кокковидной, изогнутой или булаво-видной формы. *Propionibacterium* размножаются бинарным делением и не образуют спор. Пропионовокислые бактерии являются возбудителями пропионовокислого брожения, при котором углеводы ферментируются с образованием главных продуктов брожения - пропионовой кислоты и ее солей - пропионатов. Кроме пропионовой кислоты, пропионовокислые бактерии продуцируют уксусную кислоту, углекислый газ и др. *Propionibacterium* обитают в желудочно-кишечном тракте жвачных животных, часто обнаруживаются в сыром молоке. Микроскопический препарат микроорганизмов представлен на рис. 2.



Рис. 2. Пропионовокислые бактерии

Большинство пропионибактерий не могут развиваться при значениях pH менее 5,0-4,5. *Propionibacterium* переносят лишь низкое парциальное давление

кислорода. Оптимальная температура их развития 30-35 °С. *Propionibacterium* кроме сахаров и молочной кислоты способны сбраживать пировиноградную кислоту, глицерин и другие вещества. Ряд видов *Propionibacterium* способны продуцировать витамин В<sub>12</sub>. В микробиологической промышленности в качестве продуцентов витамина В<sub>12</sub> используют штамм *Propionibacterium Shermanii*.

Пропионовокислые бактерии используют в сыроделии при производстве полутвердых сыров с высокой температурой второго нагревания. После окончания молочнокислого брожения в сырах начинается стадия развития пропионовокислых бактерий, сбраживающих молочную кислоту с образованием уксусной и пропионовой кислот и диоксида углерода. Летучие кислоты придают сырам специфический вкус и запах, а диоксид углерода участвует в формировании рисунка сыра.

**Уксуснокислые бактерии.** Уксуснокислые бактерии - грамотрицательные, палочковидные бесспорные, строго аэробные организмы, развивающиеся в тех же условиях, что и дрожжи. К числу окисляемых соединений относятся одноатомные спирты, содержащие от 2 до 5 углеродных атомов, а также многоатомные спирты - производные сахаров. Окисление первичных спиртов приводит к образованию кислот. Бактерии способны окислять этиловый спирт в уксусную кислоту, пропиловый спирт - в пропионовую кислоту, бутиловый спирт - в масляную кислоту. Некоторые виды бактерий способны окислять также глюкозу в глюконовую кислоту, ксилозу и арабинозу - в ксилоновую и арабановую кислоты. Этиловый спирт является главным источником жизнедеятельности уксуснокислых бактерий. Довольно требовательны к субстратам для роста. Почти все виды нуждаются в отдельных витаминах, в первую очередь в пантотеновой кислоте, но есть формы, способные к синтезу всех факторов роста. Микроскопический препарат микроорганизмов представлен на рис. 4.

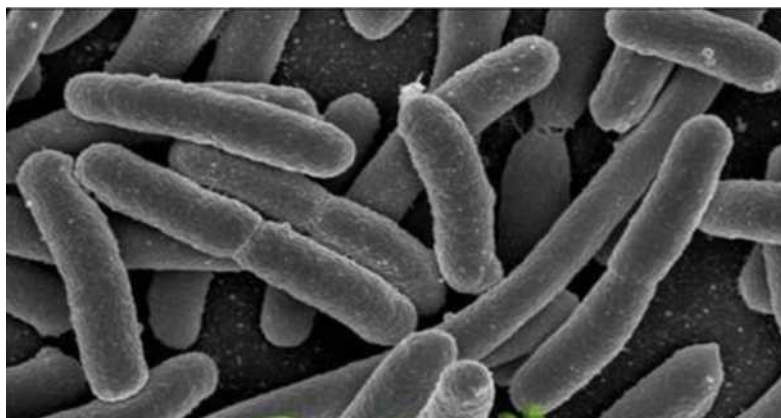


Рис. 3. Уксуснокислые бактерии

Наиболее распространенные виды бактерий - *Acetobacter aceti*, *Acet. Pasteurianium*, *Acet. oxydans*. Они имеют форму палочек длиной 1-3 мкм, часто соединены в цепочки. Оптимальная температура для роста 20-35 °С. *Acetobacter aceti* выдерживает концентрацию спирта 10-11 %. Уксуснокислые бактерии часто развиваются вслед за дрожжами, используя продукт спиртового брожения как субстрат для роста. При накоплении в сбраживаемом сусле 0,01 % уксусной кислоты задерживается жизнедеятельность дрожжей, а при 0,2 % подавляется. Применяются в микробиологической промышленности для получения столового уксуса и в производстве аскорбиновой кислоты (на этапе окисления сорбита в сорбозу).

**Бифидобактерии.** Бифидобактерии (лат. *Bifidobacterium: bifidus* - разделенный надвое и *bacteria* - бактерия) - род грамположительных анаэробных бактерий, представляющих собой слегка изогнутые палочки длиной 2-5 мкм, иногда ветвящиеся на концах, спор и капсул не образуют. Оптимальная температура развития 37-41 °С, оптимальное значение pH 6-7, при pH ниже 4,5 и выше 8,5 рост микроорганизмов прекращается. Для размножения бифидобактерий необходимы значительные количества факторов роста. Многие виды нуждаются в биотине, пантотеновой кислоте, цистеине, рибофлавине, пуриновых и пиримидиновых основаниях, пептидах, аминсахарах, коферменте А, олигосахаридах, некоторых ненасыщенных жирных кислотах и др. Отдельные штаммы нуждаются в углекислом газе, аммиаке, гистидине. Из аминокислот требуются лизин, пролин, серин, ала-

нин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Некоторые штаммы бифидобактерий растут при наличии азотфиксирующих олигосахаридов - N-ацетил-глюкозамина, N-ацетил-галактозамина, N-ацетил-маннозамина и др., которые отсутствуют в коровьем молоке (содержатся в женском молоке).

В синтетических средах бифидобактериям для роста необходимы железо, магний, фосфаты, хлориды калия и натрия, в некоторых случаях - марганец. Бактерии составляют 80-90 % кишечной флоры детей, находящихся на грудном вскармливании, и молодняка млекопитающих в подсосном периоде. Микроскопический препарат микроорганизмов представлен на рис. 5.



Рис. 4. Бифидобактерии

Присутствие бифидобактерий в кишечнике полезно для ребенка и молодых животных, так как бифидобактерии подавляют развитие различных гнилостных и болезнетворных микроорганизмов. По окончании молочного вскармливания бифидофлора сменяется обычной кишечной микрофлорой, характерной для взрослых организмов. Живые бифидобактерии обладают высокой антагонистической активностью против широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов кишечника (включая стафилококки, протей, энтеропатогенную кишечную палочку, шигеллы, некоторые дрожжеподобные грибы); восстанавливают равновесие кишечной микрофлоры; нормализуют пищеварительную и защитную функции кишечника; активизируют обменные процессы; повышают неспецифическую ре-



зистентность организма.

В молоке бифидобактерии развиваются медленно, так как коровье молоко не является естественной средой их обитания. Одной из причин плохого роста бифидобактерий в молоке служит растворенный в нем кислород. Рост бифидобактерий в коровьем молоке стимулируют экстракты дрожжей, гидролизованное молоко, а также увеличение соотношения белок: лактоза. Сильный стимулирующий эффект роста бифидобактерии получают при использовании гидролизатов казеина. Растительными стимуляторами роста бифидобактерий в молоке являются обезжиренная соя, экстракт картофеля, тростниковый сахар, кукурузный экстракт, морковный сок. В качестве стимуляторов роста применяют также соли железа, сорбит, микроэлементы в виде сернокислой меди и лактата железа.

Бифидобактерии в процессе жизнедеятельности вырабатывают ряд органических кислот. В основном это уксусная и молочная кислоты (в молярном отношении 3:2), а также муравьиная и янтарная. Бифидобактерии синтезируют аминокислоты, белки, витамины В1, В2 (рибофлавин), В6 (пиридоксин), В12, викасол, никотиновую и фолиевую кислоты.

Бифидофлора человека представлена пятью видами: *B.bifidum*, *B.longum*, *B.adolescentis*, *B.breve* и *B.infantis*. Первые три вида встречаются в биоценозе кишечника с наибольшей частотой - в 39-75 % случаях. Виды *B.breve* и *B.infantis* обнаруживаются реже - в 16-36 % случаях и только у детей грудного возраста. Поскольку эти виды свойственны детям раннего возраста, то и использование одного из них, *Bifidobacterium breve*, при разработке препаратов-

эубиотиков на его основе весьма перспективно. Положительные эффекты бифидобактерий позволили в свое время рассматривать эти микроорганизмы как эффективный биокорректор и основу для создания препаратов, обладающих многофакторным регулирующим и стимулирующим воздействием на организм, а также как одну из основных категорий [функционального питания](#).

**Маслянокислые бактерии.** Маслянокислые бактерии относятся к сахаролитическим клостридиям; строгие анаэробы, имеющие подвижные крупные спорообразующие, грамположительные палочки длиной до 10 мкм. Споры их цилиндрической или эллипсоидальной формы, похожи на теннисную ракетку. Наряду с масляной кислотой они могут образовывать (в меньших количествах) уксусную, молочную, капроновую, каприловую и другие кислоты, а также этиловый и бутиловый спирты. Возбудители этого брожения развиваются главным образом в трубопроводах, насосах и других скрытых местах. Оптимальная температура для роста бактерий 30-40 °С, при рН ниже 4,9 они не развиваются. Наиболее распространены следующие виды маслянокислых бактерий: Клостридиум бутирикум (*Clostridium butyricum*), Клостридиум ацетобутиликум (*Clostridium acetobutylicum*), *Clostridium pasteurianum*, *Clostr. saccharobutyricum*. Микроскопические препараты микроорганизмов представлены на рис. 5.

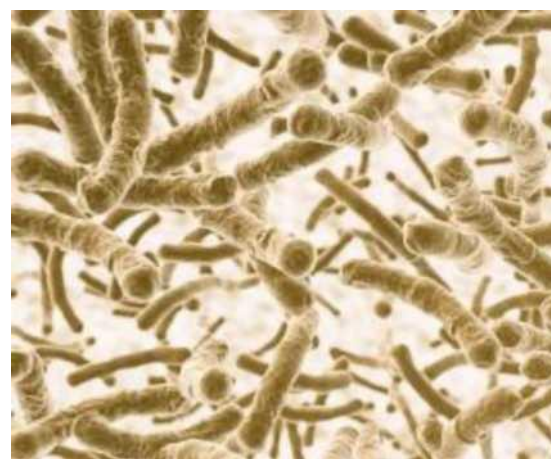


Рис. 5. Маслянокислые бактерии

Маслянокислые бактерии опасны для спиртового производства, так как вырабатываемая ими масляная кислота даже в очень малых концентрациях (0,0005 %) подавляет развитие дрожжей. Особенно опасно маслянокислое брожение в производстве сыра, так как оно вызывает порок «позднее вспучивание» сыров. Борьба с маслянокислыми бактериями затруднена тем, что при тепловой обработке молока не уничтожаются споры маслянокислых бактерий.

Возбудителями порока «позднее вспучивание» в сыроделии являются масляно-кислые бактерии *Clostridium tyrobutyricum*, которые развиваются в созревающем сыре после прекращения молочнокислого процесса и повышения рН сыра вследствие накопления продуктов белкового распада при его созревании.

Маслянокислые бактерии попадают в сыр с молоком при кормлении коров некачественным силосом. Споры полностью выдерживают высокотемпературную кратковременную обработку и при пастеризации молока-сырья не погибают. Они прорастают в сырах и могут расти при температуре выше 7 °С в анаэробных условиях, продуцируя главным образом масляную кислоту, CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub> путем расщепления молочной кислоты. Для позднего вспучивания характерны: неправильный, щелевидный рисунок сыра; размягченная, губчатая консистенция; резкий запах масляной кислоты; неприятный сладковатый и даже салитый вкус. Основной путь предупреждения вспучивания сыров состоит в соблюдении чистоты при получении молока на ферме. Применяют также специально подобранные антагонистические закваски.

### **Контрольные вопросы:**

#### **Базовый уровень**

1. Назовите основные виды бактерий и их использование в фармацевтической биотехнологии.
2. Назовите морфологические особенности культур пропионовокислых бактерий и бифидумбактерий

#### **Повышенный уровень**

1. Как характеризуются исследуемые виды чистых культур микроорганиз-

мов по отношению к краске Грама?

## **Практическое занятие № 6 Изучение биотехнологических характеристик и способов культивирования молочнокислых микроорганизмов**

**Цель работы:** работы - изучить биотехнологические характеристики молочнокислых бактерий и их применение

### **Теоретическая часть:**

Молочнокислые бактерии широко распространены в природе. По морфологическим признакам их делят на стрептококки и палочки. В каждой группе имеются гомо- и гетероферментативные бактерии.

Молочнокислые стрептококки. Молочнокислые стрептококки относятся к семейству *Streptococcaceae*, родам *Lactococcus* и *Leuconostoc*. К гомоферментативным относятся молочный (*Lactococcus lactis*) и сливочный (*Lactococcus cremoris*) стрептококки. Гетероферментативными являются ароматобразующие стрептококки, способные продуцировать ароматические вещества (диацетил, ацетоин) и усваивать соли лимонной кислоты - цитраты. В эту группу входят *Lactococcus diacetyllactis*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc dextranicum*. Промежуточное положение между гомоферментативными и гетероферментативными стрептококками занимает термофильный стрептококк *Str. thermophilus*.

Молочнокислые стрептококки представляют собой шаровидные или овальные клетки размером до 1-2 мкм, располагающиеся в виде коротких цепочек или попарно; неподвижны, спор и капсул не образуют, по Граму красятся положительно. В молодых культурах некоторые штаммы сливочного стрептококка образуют слизистую капсулу. Клетки ароматобразующих стрептококков несколько мельче, чем клетки *Lactococcus lactis* и *Lactococcus cremoris*, а клетки термофильного стрептококка крупнее, чем сливочного.

Молочнокислые стрептококки по отношению к кислороду являются факультативными анаэробами, т. е. растут не только в анаэробных условиях, но и при доступе молекулярного кислорода. Однако в присутствии кислорода у них не изменяется тип дыхания, так как не проявляется аэробное дыхание, а продолжается процесс брожения. Поэтому молочнокислые бактерии можно отнести к категории

аэротолерантных (воздухотерпимых) анаэробов.

Температурные границы жизнедеятельности этих микроорганизмов довольно широки. Для мезофильных видов оптимальная температура составляет 25-30 °С, для термофильных - 38-43 °С. Минимальной температурой развития для мезофильных молочнокислых бактерий являются 10 °С, для термофильных - 20-22 °С. Некоторые молочнокислые бактерии способны расти при очень низких плюсовых температурах (до 3 °С). По потребности в питательных веществах молочнокислые бактерии относятся к наиболее сложным микроорганизмам. В качестве источника углерода они могут использовать моно- и дисахариды, органические кислоты.

Большинству видов молочнокислых бактерий для развития необходимы аминокислоты: аргинин, цистеин, глутаминовая кислота, лейцин, фенилаланин, триптофан, тирозин, валин. Только некоторые виды молочнокислых стрептококков могут расти на средах, содержащих аммонийные соли в качестве единственных источников азота.

Большинству молочнокислых бактерий необходимы витамины - рибофлавин (В<sub>2</sub>), тиамин (В<sub>1</sub>), пантотеновая (В<sub>3</sub>), никотиновая (РР), фолиевая (В<sub>9</sub>) кислоты, пиридоксин (В<sub>6</sub>) и др. Этим объясняется положительное влияние на рост микроорганизмов добавок к питательным средам различных экстрактов (кукурузы, моркови, картофеля), дрожжевого автолизата и других витаминосодержащих соединений. Рост молочнокислых бактерий стимулируют и некоторые пептиды, пурины (аденин, гуанин, гипоксантин), пиримидины (урацил, тимин и др.), жирные кислоты (уксусная, олеиновая), а также лимонная кислота. Молочнокислые бактерии культивируют на обезжиренном стерильном молоке или на плотных и жидких искусственных питательных средах с использованием гидролизованного молока и других питательных веществ, получаемых из молока.

Развитие молочнокислых стрептококков в молоке вызывает его свертывание (за исключением *Leuconostoc demons*) с образованием ровного, без обильного отделения сыворотки плотного сгустка, имеющего приятные кисломолочные вкус

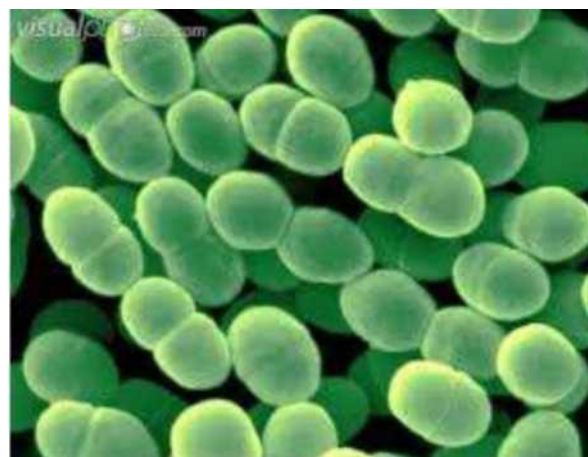
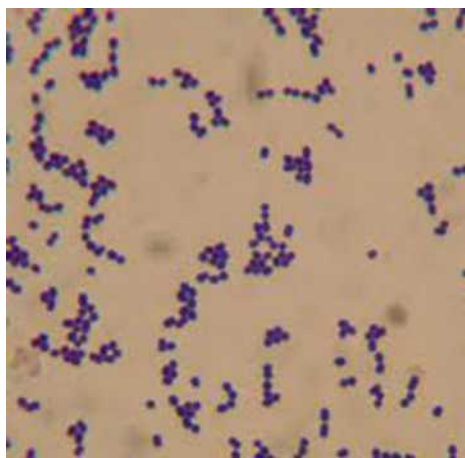
и запах. Ароматобразующие стрептококки образуют сгусток, в котором можно обнаружить в небольшом количестве пузырьки углекислого газа. На питательной среде (агар с гидролизованным молоком и мелом) молочнокислые стрептококки образуют мелкие (0,5-1 мм) каплевидные колонии с ровным краем, с зонами просветления мела. Колонии в толще питательной среды (глубинные колонии) имеют форму лодочки или зерна чечевицы. *Lactococcus diacetylactis* на 3 %-м агаре может образовывать глубинные колонии в виде паучков или комочков ваты, похожих на колонии молочнокислых палочек.

Молочнокислые бактерии растут в средах с низким значением pH - от 5,5 до 8,8. Характерным свойством молочнокислых бактерий является высокая спиртоустойчивость. Они могут развиваться на питательных средах, содержащих 15-18 % этилового спирта, реже - при 24 %. Биохимические свойства молочнокислых бактерий изучают по энергии кислотообразования, предельной кислотности, способности сбразивать соли лимонной кислоты, по качеству сгустка, возможной протеолитической активности бактерий и др. Энергию кислотообразования определяют по времени образования сгустка молока (кислотность около 60 °Т) при внесении 0,5 см<sup>3</sup> молодой (12-20-часовой) культуры в 10 см<sup>3</sup> стерильного обезжиренного молока и выращивании посевов при оптимальной температуре.

Протеолитическую активность бактерий изучают на мясо- пептонном желатине, молоке или определяют с помощью специальных биохимических исследований и судят о ней по общему количеству образовавшихся водорастворимых продуктов распада белка, образованию аммиака, сероводорода, индола, которые характеризуют глубокий распад белковых веществ. Способность сбразивать соли лимонной кислоты (цитраты) определяют посевом бактерий на плотную среду с цитратом кальция. Появление зон просветления вокруг колоний свидетельствует об образовании водорастворимых продуктов брожения при наличии фермента

цитритазы. Активность образования ароматических веществ устанавливают по количеству образовавшихся летучих соединений (методом возгонки) и четырехуглеродных соединений (диацетила и ацетоина). Молочнокислые стрептококки обладают различной активностью.

*Lactococcus lactis* является первым микроорганизмом, который выделен в чистой культуре (в 1873 г. Листером). *Lactococcus lactis* (рис. 7) встречается на растениях, с пылью и растительными частицами попадает на доильное оборудование, а затем в молоко. Он встречается в виде коротких цепочек из двух-шести звеньев. Оптимальная температура развития около 30 °С. Отдельные штаммы *Lactococcus lactis* могут медленно размножаться при низких температурах (ниже 7 °С). При температуре 25 °С за счет образования молочной кислоты показатель pH снижается примерно до 4,5 и молоко свертывается вследствие кислотной коагуляции казеина. *Lactococcus lactis* является активным кислотообразователем.



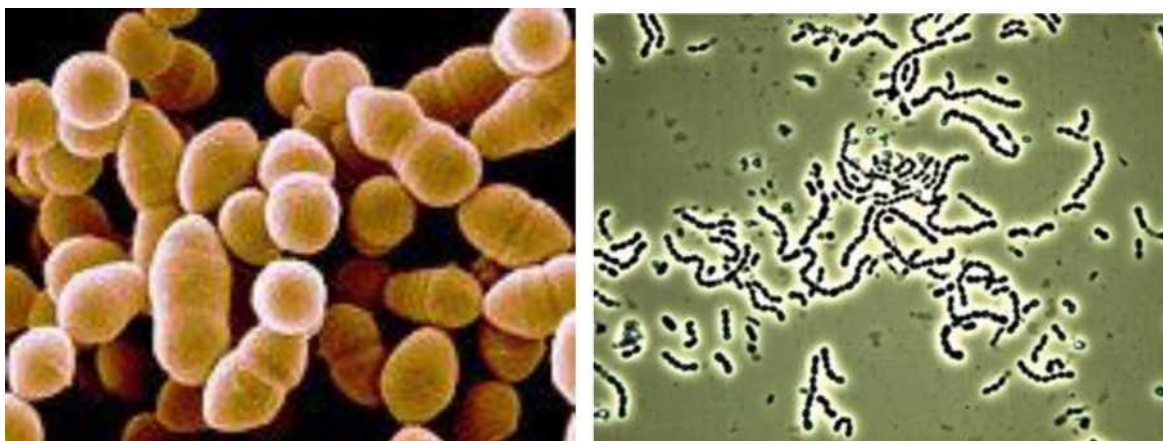
**Рис. 6. *Lactococcus lactis***

Активные штаммы свертывают молоко за 4-7 ч, Предельная кислотность при его развитии достигает 120 °Т. Не развивается в среде, содержащей 6,5 % NaCl, и в щелочной среде при pH 9,5. Многие штаммы продуцируют антибиотик низин, который является полипептидом с молекулярной массой 3500. Он подавляет большинство стрептококков (но не энтерококков), стафилококков, микрококков, некоторые виды бацилл, лактобактерий, клостридий, актиномицетов. При этом в отношении грамотрицательных бактерий низин бактерицидным действием не об-



ладает.

*Lactococcus cremoris* (рис. 7) в отличие от молочного стрептококка не сбраживает мальтозу и декстрин, лишен способности дезаминировать аргинин. Не растет на средах, содержащих 4 % КС1, а также при температуре 39-40 °С. При пониженных температурах культивирования (15-20 °С) некоторые штаммы образуют значительное количество летучих кислот. Имеются слизеобразующие штаммы, формирующие сгустки молока при температуре 10-18°С. Их используют в заквасках для производства сметаны. Энергия кислотообразования у *Lactococcus cremoris* слабее, чем у *Lactococcus lactis*, и составляет 6-8 ч, предельная кислотность 110-115 °Т. образует длинные цепочки. Оптимальная температура развития *Lactococcus cremoris* 20-25 °С. В течение 24 ч при этой температуре наблюдается свертывание молока при значении рН, равном 5,0-5,2.



**Рис. 7. *Lactococcus cremoris***

В заквасках *Lactococcus cremoris* в сочетании с *Lactococcus lactis* способствует образованию более густой консистенции продукта.

Ароматобразующие стрептококки *Lactococcus diacetylactis*, выделяют фермент цитритазу, которая расщепляет цитраты с образованием диоксида углерода и ароматических веществ - ацетоина и диацетила. Сравнительно слабый кислотообразователь, но образует диацетил в значительном количестве. Имеет слабую энергию кислотообразования (более 16 ч), предельная кислотность в молоке достигает 70-100 °Т. Сгусток молока часто содержит пузырьки газа (СО<sub>2</sub>). При созревании

сыров CO<sub>2</sub> участвует в формировании рисунка сыра, в образовании глазков в сырной массе. При развитии *Lactococcus diacetylactis* в молоке сгусток приобретает специфический приятный запах и аромат, обусловленные накоплением диацетила. Ацетоин не обладает выраженным ароматом, но тесно связан с диацетилом. Для образования диацетила необходима лимонная кислота. Поэтому обогащение питательной среды лимонной кислотой способствует продуцированию ароматического вещества. Оптимальной температурой ароматообразования являются 25 °С. Многие штаммы разлагают аргинин с выделением аммиака, устойчивы к содержанию в среде 4 % NaCl. Штаммы *Lactococcus diacetylactis* вводят в состав заквасок для творога, сметаны, простокваши обыкновенной.

*Leuconostoc dextranicum* является также слабым кислотообразователем. Он свертывает молоко при оптимальной температуре через 2-3 суток. Предельная кислотность составляет 70-80 °Т. Оптимальная температура кислотообразования 18-20 °С при низком значении рН (менее 6), т. е. при накоплении молочной кислоты в процессе брожения. Часто входит в состав заквасок для сыров.

*Leuconostoc cremoris* молоко не свертывает, предельная кислотность 40-50 °Т. Входит в состав заквасок для производства кисло-сливочного масла и способствует сохранению аромата при его хранении.

Для развития *Leuconostoc dextranicum* и *Leuconostoc cremoris* большое значение имеет марганец, повышенное содержание которого в молоке в летне-осенний период стимулирует их рост и ароматообразование. Штаммы молочнокислых стрептококков:

*L.lactis*, *L.cremoris*, *Leu. cremoris*, *L.diacetylactis*, *Leu.dextranicum* входят в состав заквасок для производства творога, сметаны, простокваши обыкновенной, кисломолочного масла, сыров.

*Streptococcus thermophilus* (рис. 8) по энергии кислотообразования превосходит все молочнокислые стрептококки, достигая уровня термофильных лактобактерий. Он сквашивает молоко через 3,5-6 ч, предельная кислотность составляет 110-115 °Т. Термофильный стрептококк не растет на средах пенициллина

*S. thermophilus* обладает относительно высокой термоустойчивостью. Он выдерживает температуру 75 °С в течение 15 мин и 65 °С в течение 30 мин, вследствие чего составляет значительную часть остаточной микрофлоры в молоке после пастеризации. В жидкой среде, содержащей глюкозу и 4 % NaCl, термофильный стрептококк кислоту не образует, а при содержании 2 % MgCl<sub>2</sub> молочную кислоту синтезируют отдельные штаммы. При наличии в среде 0,1 % метиленового голубого *S. thermophilus* не развивается. Некоторые штаммы образуют диацетил, в небольшом количестве синтезируют ацетоин.

Молочнокислые палочки. Молочнокислые палочки (лактобактерии) относят к семейству *Lactobacteriaceae*, роду *Lactobacterium*, включающему три подрода:

*Thermobacterium*, *Streptobacterium* и *Betabacterium*. Термобактерии и стрептобактерии являются гомоферментативными, а бета-бактерии - гетероферментативными молочнокислыми палочками.

К *термобактериям* относятся 8 видов палочек, среди которых наиболее часто применяют *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricum*, *L. lactis*. Длинные палочки, не образуют цепочек, при температуре ниже 15 °С не развиваются, оптимальный рост при температуре около 40 °С, гомоферментативные.

Подрод *стрептобактерии* включает 7 видов, среди которых в молочной промышленности используют *L. plantarum* и *L. rhamnosus*.

Образуют длинные цепочки, состоящие из коротких палочек, развиваются и при температуре ниже 15 °С, оптимальный рост при температуре 30 °С, гомоферментативные.

В подрод *бета-бактерий* входят 11 видов палочек, наиболее изученными среди них являются *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*. Гетероферментативные.

Лактобактерии представляют собой палочки, одиночные или соединенные попарно, размером (4...10) x (0,5...0,6) мкм. Они неподвижны, спор и капсул не образуют, по Граму красятся положительно. Клетки стрептобактерии мельче, чем

клетки термобактерий, и часто располагаются в виде цепочек. Бета-бактерии имеют наиболее мелкие и тонкие клетки.

Молочнокислые палочки являются факультативными анаэробами или микроаэрофилами. По отношению к температуре стрептобактерии и бета-бактерии являются мезофилами, термобактерии - термофилами. На обычных средах они не растут, их выращивают на средах с молоком. При развитии в молоке вызывают образование однородного плотного сгустка с приятными кисломолочными запахом и вкусом.

На плотной питательной среде лактобактерии формируют мелкие гладкие блестящие колонии со сферической поверхностью серо-белого цвета. Колонии лактобактерий разных видов почти не различаются. Однако в некоторых случаях наблюдаются волокнистые, врастающие в субстрат колонии R-формы в отличие от гладких колоний, относящихся к S-формам. Глубинные колонии термобактерий могут быть темными, желтовато-бурыми, иногда с короткими отходящими нитями. В отличие от глубинных колоний поверхностные колонии более крупные, локнообразные или зернистые. Глубинные колонии стрептобактерий имеют лодочкообразную форму, иногда с выростом.

Температурные границы роста для термобактерий составляют 20-55 °С, для мезофилов - 15-38 °С. Оптимальной температурой развития для *L. helveticus* являются 40 °С, для *L. bulgaricus*, *L. Lactis* - 45 °С, *L. acidophilus* - 37-38 °С. Для мезофилов оптимальной является температура 30 °С.

Лактобактерии обладают слабой протеолитической активностью, поэтому не растут в субстратах, где единственным источником азота является белок, т. е. где отсутствуют различные аминокислоты. В то же время имеются молочнокислые бактерии, которые могут расщеплять белки.

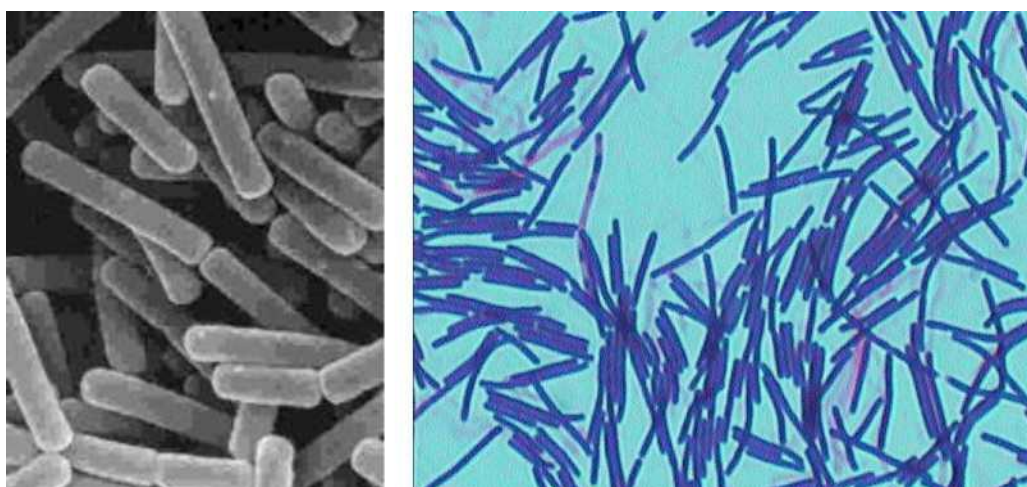
Молочнокислые бактерии не восстанавливают нитраты в нитриты, не образуют пигментов. Цитохромы и пероксидазу не образуют, но некоторые продуцируют каталазу, разлагающую пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Лактобактерии обладают

хорошо выраженными сахаролитическими свойствами. Кроме глюкозы и лактозы они сбраживают и другие сахара. Так, многие гомо- и гетероферментативные виды (*L. plantarum* и *L. brevis* и др.) интенсивно используют пентозы, иногда даже активнее, чем глюкозу.

Гетероферментативные молочнокислые бактерии сбраживают фруктозу, поскольку у них имеется маннитдегидрогеназа, осуществляющая восстановление фруктозы до маннита. Продуктами сбраживания фруктозы также являются лактаты, ацетаты и углекислый газ.

Термофильные молочнокислые палочки являются активными кислотообразователями, они сквашивают молоко через 4-5 ч, предельная кислотность достигает 200-350 °Т,

*Lactobacillus helveticus* (рис. 10) является самым активным кислотообразователем, предельная кислотность молока при его развитии достигает 350 °Т. Эта палочка сбраживает мальтозу и декстрин, не сбраживает сахарозу, раффинозу, салицин. Некоторые штаммы развиваются в субстратах, содержащих до 5 % поваренной соли. Штаммы *L. helveticum* можно выделить из сычуга телят или кислого сырого молока. Используется вместе с *Streptococcus thermophilus* для приготовления эмментальского и грюйерского сыров. Не только образует молочную кислоту, но и участвует, благодаря наличию протеолитического эндофермента, в созревании сыров. Ее использование придает сыру выраженный пряный вкус.



**Рис. 8. *Lactobacillus helveticus***

*Lactobacillus bulgaricus* (рис. 11) образует длинные палочки и является гомоферментативной, доводит предельную кислотность молока до 200-300 °Т. Штаммы болгарской палочки образуют ацетальдегид - ароматическое вещество, придающее специфические вкус и запах, и антибиотические вещества, подавляющие нежелательную микрофлору кишечника. Болгарская палочка чувствительна ко многим антибиотикам, устойчива к бактериофагу. Штаммы *L. bulgaricus* выделяют, как правило, из сырого молока. Совместно с *Streptococcus thermophilus* она применяется для приготовления йогурта.

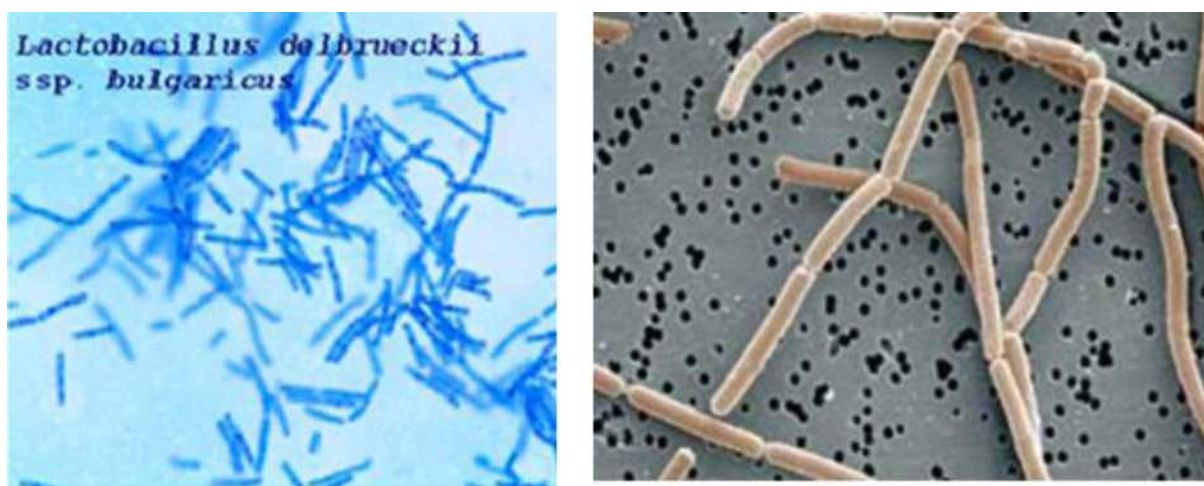


Рис. 9. *Lactobacillus bulgaricus*

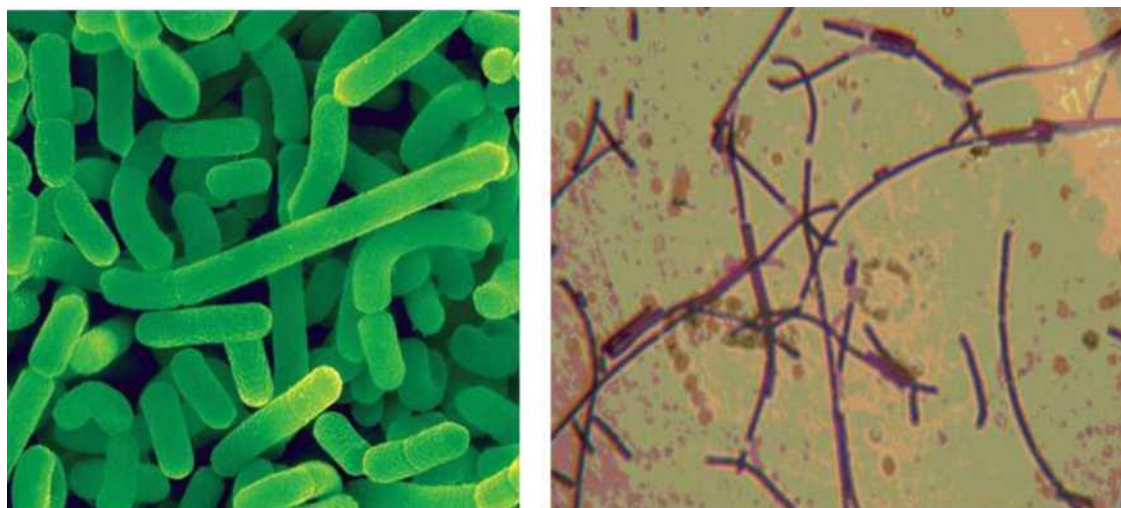
*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* входит в состав заквасок для приготовления многих кисломолочных продуктов, таких как мечниковская простокваша, айран, кумыс, напитки «Снежок» и «Южный». Ее используют также в составе специально разработанных заквасок для производства итальянских мягких сыров (Горгонзола Дольче и Горгонзола Пиканта), итальянских вытяжных сыров семейства Паста Филата (Моцарелла, Качокавалло, Проволоне, Сулугуни), для производства швейцарского сыра Грюйер с высокой температурой второго нагревания.

*L. acidophylus* (рис. 12) является кишечным микробом, который можно выделить из содержимого пищеварительного тракта человека и различных животных. Ацидофильная палочка способна после культивирования в молоке вновь прижи-



ваться в кишечнике человека и подавлять там развитие патогенных и нежелательных микроорганизмов (сальмонеллы, шигеллы, стафилококки, эшерихии и др.). Антагонистическое действие *L. acidophilus* обусловлено продуцируемыми антибиотиками — ацидофилином и лактоцидином.

Ацидофильные бактерии устойчивы к щелочной реакции (рН 8,3), наличию в среде фенола (0,25-0,4 %), желчи (20 %), КС1 (2 %). Предельная кислотность ацидофильной палочки достигает 200-250 °Т. *L. acidophilus* сбраживает сахарозу, мальтозу, салицин, часто раффинозу, декстрин. Имеются слизеобразующие штаммы ацидофильной палочки.



*Рис. 10. Lactobacillus acidophilus*

*Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis (L. Lactis)* по своим свойствам и поведению в закваске проявляют большое сходство с *L.bulgaricus*. Сбраживают глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, галактозу, раффинозу, декстрин и салицин. Предельная кислотность молока, сквашенного *L.lactis*, достигает 120-180 °Т. В результате жизнедеятельности палочек происходит интенсивное кислотообразование, обуславливающее порок творога, сметаны, обыкновенной простокваши, - излишне кислотный вкус. Могут вызывать тягучесть и нечистый, неприятный вкус.

Стрептобактерии (рис. 13) обладают хорошо выраженными сахаролитическими свойствами. Они сбраживают фруктозу, галактозу, маннит, маннозу, раффинозу, рибозу, салицин, сорбит, трегалозу, эскулин и др. Глюкозу сбраживают

без образования газа.

Лактобактерии продуцируют ряд гидролитических ферментов, в частности лактазу, расщепляющую лактозу (молочный сахар) и препятствующую развитию лактазной недостаточности. Лактобактерии поддерживают кислотность толстой кишки на уровне 5,5-5,6 рН.

Лактобактерии казеи (*Lactobacillus casei*) - вид грамположительных палочкообразных анаэробных неспорообразующих бактерий. *Lactobacillus casei* - нормальный резидент ротовой полости, кишечника.

а

б

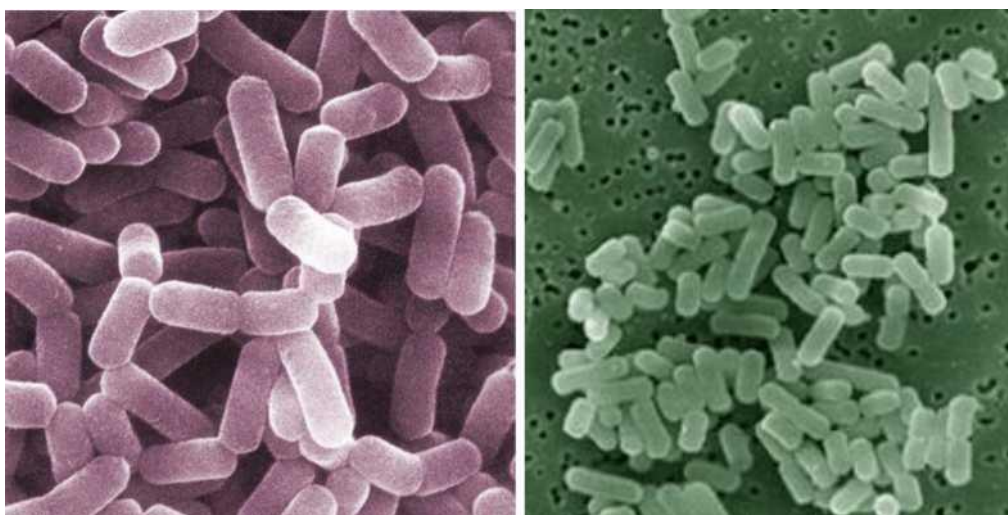


Рис. 11. Стрептобактерии:

*а - Lactobacillus plantarum; б - Lactobacillus casei*

Бактерии видов *Lactobacillus casei* и *plantarum* являются гомоферментативными и сбраживают лактозу с преимущественным образованием молочной кислоты. В молоке развиваются медленно, предельная титруемая кислотность 80-180 °Т. Мезофильные лактобациллы обладают сравнительно низкой терморезистентностью: они не выдерживают нагревания при 60 °С в течение 10 мин. Однако часть популяции выдерживает кратковременную пастеризацию при 72 °С и немного выше. *Lactobacillus casei subsp. casei* (сырная палочка) постоянно обнаруживается в различных сырах, особенно на поздних стадиях созревания последних. В молочной культуре популяция этого вида представлена слегка изогнутыми палочками



толщиной 0,3-0,9 мкм и длиной 0,8-4,0 мкм, расположенными одиночно, парами или в виде цепочек. Характерной особенностью *Lactobacillus casei subsp. casei* является способность образовывать цепочки с разным количеством клеток. *Lactobacillus casei* отличается от *Lactobacillus plantarum* способностью образовывать газ из цитрата натрия. Оптимальная температура роста 30-32 °С, минимальная - 10 °С, максимальная - 45 °С.

*Lactobacillus plantarum* используется в составе микрофлоры антагонистических заквасок и для производства пробиотических напитков, так как является представителем резидентной микрофлоры кишечника. В морфологическом плане микроорганизмы этого вида чрезвычайно изменчивы. Они представляют собой палочки с закругленными концами толщиной от 0,5 до 1,0 мкм и длиной от 0,6 до 8 мкм; располагаются поодиночке, парами или в виде коротких цепочек. Размер палочек и расположение зависят от индивидуальных свойств штаммов, фазы развития культуры, состава питательных сред, условий выращивания.

Штаммы, используемые в составе заквасок и концентратов для сыров с низкими температурами второго нагревания, обычно состоят из клеток, по форме приближающихся к коккам (длиной 0,8-3,0 мкм; толщиной 0,5-0,6 мкм). При развитии в молоке значительным изменениям подвержена длина клеток. В частности, в благоприятных условиях роста популяции клетки *Lactobacillus plantarum* представлены в основном короткими палочками, нередко располагающимися парами и реже в цепочках по три клетки; при ухудшении условий (например, в кислых средах, что наблюдается при длительной выдержке заквасок) в микропрепарате преобладают длинные клетки. Оптимальная температура роста 30-32 °С, минимальная - 10 °С, максимальная - 45 °С. *Lactobacillus plantarum* обладает специфической антагонистической активностью к маслянокислым бактериям. Исследования природы антагонизма показали, что данные культуры образуют в средах перекись водорода в концентрациях, ингибирующих или подавляющих развитие споровых анаэробных бактерий. В нашей стране закваски, содержащие *Lactobacillus plantarum* со специфической антагонистической активностью к маслянокислым и энтеробак-

териям, широко применяются в промышленности с начала 1970-х годов и получили высокую оценку производителей. В настоящее время биологические методы борьбы с вредной для сыроделия микрофлорой появились и за рубежом (так называемые защитные культуры). Мезофильные гомоферментативные лактобациллы нечувствительны к бактериофагам лактококков. Они стимулируют развитие лактококков в совместных культурах, поэтому включение в концентраты специально отобранных штаммов мезофильных лактобацилл, заведомо не образующих пороки в сырах, может в определенной степени повысить стабильность молочно-кислого брожения при выработке сыра, что является необходимым условием получения сыров высокого качества.

*Lactobacillus rhamnosus* (Лактобактерии рамнозус) - вид грамположительных анаэробных неспорообразующих бактерий. Раньше *Lactobacillus rhamnosus* как подвид относился к виду *Lactobacillus casei*, однако по современной систематике *Lactobacillus rhamnosus* считается отдельным видом рода Лактобактерии.

Стрептобактерии обладают менее выраженной кислотообразующей способностью. Они сквашивают молоко через 2-3 суток, предельная кислотность составляет 180 °Т.

Стрептобактерии *L. plantarum*, *L. rhamnosus* способны усваивать кроме лактозы также соли молочной кислоты, т. е. лактаты. Они растут в гидролизованном молоке, содержащем 6 %  $\text{NaCl}$  и 20-40 % желчи, восстанавливают и свертывают лакмусовое молоко и не образуют аммиак из аргинина. Обладают высокой протеолитической активностью (в 2 раза выше, чем у мезофильных молочнокислых стрептококков), содержание свободных аминокислот в молоке повышают с 10 до 60 мг %. *L. rhamnosum* в отличие от *L. plantarum* образует  $\text{CO}_2$  из цитрата натрия. *L. plantarum* продуцирует пероксид водорода и синтезирует бактериоцин плантарицин, действующий угнетающе на кишечную микрофлору и маслянокислые бактерии. Бактериоцины - вещества белковой природы, продуцируемые бактериями многих видов, угнетающие развитие родственных микроорганизмов. *Lactobacillus plantarum* используется в составе заквасок для приготовления силоса,

квашеной капусты, сыров с низкой температурой второго нагревания.

*Lactobacillus casei* используются в различных БАДах и продуктах для придания им пробиотических свойств. На российском рынке кисломолочных продуктов наиболее известны Actimel компании Данон, содержащие штамм *Lactobacillus casei Imunitass* (или штамм DN-11400) и *Imunele* компании Вимм-Билль-Данн. За рубежом широко применяется штамм *Lactobacillus casei Shirota* (кисломолочный напиток Yakult), штаммы F19 (продукт Cultura фирмы Arla Foods), CRL431 (продукты фирмы Chr. Hansen).

К группе бета-бактерий (рис. 14) относятся *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri* и *L. fermenti*. В молочных продуктах чаще встречается *L. brevis*. По виду и расположению клеток эти микроорганизмы не различаются. Клетки их представляют собой мелкие палочки. На поверхности плотных питательных сред они образуют круглые по форме колонии. Бета-бактерии являются очень слабыми кислотообразователями, они не свертывают молоко. Температурный оптимум их роста составляет 30°C. При добавлении дрожжевого автолизата рост бактерий значительно усиливается и кислотность достигает 150-160 °Т. По своим свойствам они близки к ароматообразующим стрептококкам. Бета-бактерии растут при 15 °С и не растут при 48 °С, некоторые виды бета-бактерий не растут даже при 45 °С. Бета-бактерии образуют аммиак из аргинина и углекислый газ из глюкозы. Этими свойствами они отличаются от других молочнокислых палочек. Бета-бактерии не свертывают лакмусовое молоко и лишь частично его восстанавливают (порозовение). Они могут развиваться в среде, содержащей 4 % NaCl. Бета-бактерии имеют низкую терморезистентность. Входят в состав микрофлоры кефирных грибков.

*Lactobacillus fermentum* является грамположительным видом бактерий в роду *Lactobacillus*. Отличительная особенность этого вида заключается в том, что температурный оптимум роста у него значительно выше - в пределах 37-40 °С. При 15 °С рост не наблюдается. Вид *L. fermenti* часто встречается в заквасках и, по-видимому, является специфичным для хлебопекарного производства.

Исследование антиоксидантных свойств штамма показало, что он может

предотвратить порчу мягких сырных продуктов. Эксперименты, проведенные путем введения штамма *Lactobacillus fermentum* в молочные продукты как пробиотического компонента, показали, что он был в состоянии подавить предполагаемых загрязнителей пищевых продуктов, таких как патогенные *Salmonella* SPP, *Shigella* SPP.

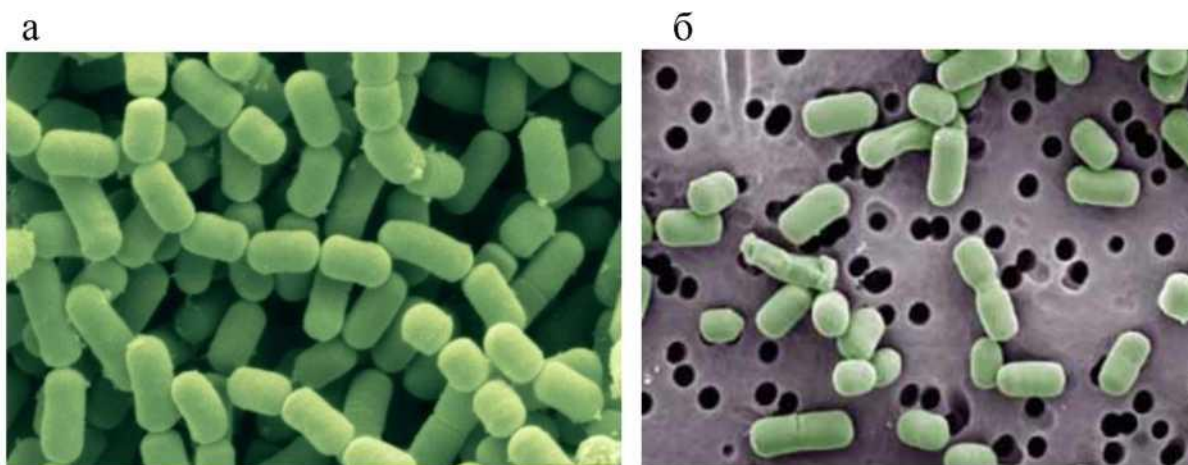


Рис. 12. Бета-бактерии:

*а - Lactobacillus fermentum; б - Lactobacillus brevis*

*Lactobacillus buchneri* - грамположительные, неспорообразующие, анаэробные. *L.buchneri* являются гетероферментативными бактериями, обладающими наибольшей антагонистической активностью против дрожжей и плесневых грибов. Они способны наряду с молочной продуцировать значительное количество уксусной кислоты в процессе ферментации, что улучшает аэробную стабильность силоса. Исследованиями выявлено, что *Lactobacillus buchneri* подавляют нежелательную микрофлору и эффективно борются с накоплением микотоксинов.

Общие методы идентификации молочнокислых бактерий

Для идентификации молочнокислых бактерий используют морфологические, культуральные и биохимические методы. Существуют также общие методы, которые учитывают биохимические отличия в обмене веществ и химическом составе клеток. В частности, молочнокислые бактерии можно идентифицировать по способности к сбраживанию углеводов и спиртов, а также по потребности в витаминах, необходимых для роста бактерий. *S. thermophilus* в отличие от других го-

моферментативных молочнокислых стрептококков сбраживает, как правило, сахарозу. Более широким спектром сбраживания углеводов обладают гетероферментативные молочнокислые стрептококки, лейконостоки и мезофильные молочнокислые палочки, стрептобактерии и бета-бактерии. Имеются различия в сбраживании углеводов и у термофильных молочнокислых палочек. Считается, что *L. bulgaricus* сбраживают мальтозу. Однако отмечена способность сбраживать мальтозу и у штаммов *L. acidophilus*, которая зависит от активности их кислотообразования: она более выражена у слабых по кислотообразованию штаммов. Способность молочнокислых бактерий к сбраживанию углеводов сильно варьирует при изменении условий культивирования. Поэтому данный признак рассматривают как вспомогательный. При идентификации молочнокислых бактерий учитывается также их потребность в витаминах. Этот признак тоже может быть полезным лишь при очень тщательном проведении экспериментов на строго определенных питательных средах и при стандартных условиях. Для идентификации молочнокислых бактерий в качестве таксономического признака используется специфичное для каждого вида содержание гуанина и цитозина (Г+Ц), которое измеряется в процентах от общего содержания оснований в ДНК клетки.

### **Контрольные вопросы:**

#### **Базовый уровень**

1. Назовите основные группы молочнокислых микроорганизмов и примеры их применения в биотехнологическом производстве.
2. Назовите основные свойства молочнокислых микроорганизмов.

#### **Повышенный уровень**

1. Какими биотехнологическими характеристиками обладают молочнокислые микроорганизмы?
2. Каковы основные методы идентификации молочнокислых бактерий?

**Практическое занятие № 7** Препараты на основе биомассы растений, полученные методом *in vitro*

**Цель работы:** освоение технологии получения растительного сырья *in vitro* и методы его идентификации

**Теоретическая часть:**

Использование культур клеток и тканей растений помогает спасти от уничтожения ставших уже редкими тысячи дикорастущих растений, которые синтезируют необходимые для жизнедеятельности человека вещества. Рост городов, вырубка лесов, ухудшение экологии, усиленная эксплуатация дикорастущих и плантационных растений — традиционного источника лекарственных средств - приводят к растущему дефициту сырья.

Культивирование растительных клеток и тканей на искусственной питательной среде в биореакторах помимо решения ряда экономических, экологических и технологических задач позволяет, в частности, преодолеть ряд проблем:

- свести к минимуму влияние климатических, сезонных и географических условий;
- сократить посевные площади в хозяйственном обороте страны;
- получать уже известные, присущие интактному растению, вещества, например никотин, кодеин, хинин, и синтезировать новые биологически активные соединения;
- использовать культуры растительных клеток для биотрансформации конечных продуктов.

Использование новых технологий получения биомассы лекарственных растений (содержащих то или иное активное начало) в виде каллусных и суспензионных культур имеет ряд преимуществ:

- стандартность накапливаемого сырья;
- высокий выход активного начала;
- сокращение сроков культивирования для накопления растительной биомассы;
- возможность промышленного производства биомассы экзотических растений,

малодоступных для нашей страны, например, таких как раувольфия, диоскорея, унгерея и др.;

- использование разных технологических режимов;

использование методов иммобилизации и биотрансформации для повышения выхода продуктов вторичного метаболизма применительно к растительным клеткам.

Однако растительные клетки и ткани имеют свои особенности, затрудняющие работу с их культурами (по сравнению с клетками микроорганизмов):

- размеры клеток растений (15 — 1 000 мкм) в 50— 100 раз больше, чем клеток бактерий;

- в результате роста клеток растений у них появляется большая вакуоль, при этом все физические и химические константы клеток изменяются;

- суспензионные культуры состоят из клеток-агрегатов разного размера;

- культуры клеток растений имеют целлюлозную стенку, что весьма затрудняет работу биотехнолога с такими культурами.

Промышленный способ выращивания изолированных культур дает возможность за сравнительно короткий срок (30 — 45 сут) получить значительный объем ценного лекарственного сырья, используя каллусные и суспензионные культуры.

Метод получения лекарственных средств на основе культур клеток растений начинается с процесса получения культуры каллусной ткани, образующейся в местах повреждения органов растения в результате процесса дедифференцировки, и основан на свойстве клеток, называемом тотипотентностью. Затем при добавлении ростовых факторов ауксинов и цитокинов происходит вторичная дифференцировка клеток, направленная на процессы морфогенеза, гистогенеза, органогенеза и соматического эмбриогенеза. Биотехнолог останавливает процесс вторичной дифференцировки на стадии, максимально обеспечивающей выход целевого продукта. Существенную роль в дифференцировке клеток играют как генотип растения продуцента, так и условия культивирования (асептика, физические факторы, состав питательной среды, подбор и соотношение ауксинов и цитокинов, влажность, соответствующий вид биореакторов для глубинного культивирования).

В настоящее время промышленный синтез вторичных метаболитов — очень перспективное направление. Синтез вторичных метаболитов происходит главным образом в суспензионной культуре клеток в регулируемых условиях, поэтому он не зависит от климатических факторов, от повреждения насекомыми. Культуры выращивают на малых площадях в отличие от больших массивов плантаций с необходимыми растениями. Культуры клеток растений могут синтезировать практически все классы соединений вторичного обмена, причем довольно часто в количествах, в несколько раз превышающих их синтез в целых растениях. Например, выход аймалина и серпентина в культуре клеток *Catharanthus roseus* составляет 1,3 % сухой массы, а в целом растении — 0,26 %. В культуре клеток *Dioscorea deltoidea* диосгенин синтезируется в количестве 26 мг на 1 г сухой массы, а в клубнях растений его содержание составляет 20 мг на 1 г сухой массы. Кроме того, в культурах клеток может начаться синтез веществ, не характерных для исходного растения, либо расширяется набор синтезируемых соединений. В ряде случаев в клеточной культуре образуются вещества, которые синтезировались интактным растением на ювенильной фазе развития, либо вещества, содержащиеся в клетках филогенетически более ранних групп растений. Так, в культуре клеток *Paraver bracteatum* содержится сангвирин, характерный для ювенильных растений, и отсутствует тебаин, синтезируемый взрослыми растениями.

### **Контрольные вопросы:**

#### **Базовый уровень**

1. Определение и задачи клеточной инженерии.
2. Типы растительных тканей. Способы их выращивания.
3. Особенности строения растительных клеток.
4. Методы культивирования культур растительных клеток.
5. Основные характеристики культур растительных тканей: гормоннезависимость, физиологическая асинхронность, генетическая гетерогенность.

#### **Повышенный уровень**

1. Понятие тотипотентности, дедифференцировки и вторичной дифференцировки.



2. Методы выращивания одиночных клеток.
3. Определение соматической гибридизации, гибридов и цибридов.
4. Определение протопластов. Актуальность их использования.

## **Практическое занятие № 8** Аспекты получения видоспецифических белков человека с помощью рекомбинантных штаммов

**Цель работы:** изучить деятельности генных инженеров, занятых как в области фундаментальных исследований биотехнологии, так и в производственной практике.

### **Теоретическая часть:**

Отличие клеточной инженерии от генной инженерии в том, что в генной инженерии имеют дело с изолированными ДНК, с которыми работают *in vitro*.

Суть технологии: производят соединение фрагментов ДНК *in vitro* (в пробирке) с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку. Чистая генная инженерия

- это техника обмена изолированными фрагментами ДНК. Это происходит с помощью ферментов, которые относятся к эндонуклеазам (например, рестриктазы).

Цели генной инженерии: создание новых продуцентов для выработки новых целевых продуктов (новые лекарственные средства, диагностические и профилактические препараты).

Необходимые условия для осуществления генной инженерии:

1. Наличие биообъекта, который способен синтезировать чужеродный белок, воспринимать и передавать генетическую информацию.
2. Организм человека не должен отторгать продукт, синтезированный продуцентом.
3. Клетка должна делиться, необходимо, чтобы гены, продуцирующие целевой продукт у клеток, образующихся после деления, экспрессировались (работали).
4. Необходимо иметь транспортное устройство для внесения ДНК в клетку.

Терапевтические рекомбинантные (rDNA) белки представлены основным продуктом компаний в биотехнологической промышленности в течение последних 20 лет. Клиническая эффективность генно-инженерных цитокинов доказана на основании результатов международных многоцентровых рандомизированных научных исследований. Для некоторых цитокиновых препаратов (преимущественно

для интерферонов) имеются международные стандарты назначения и российские методические рекомендации по лечению конкретных инфекционных заболеваний, а также сопутствующих иммунных нарушений.

Постоянно возвращаясь к термину «технология рекомбинантных ДНК», следует помнить, что это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала из одного организма в другой.

Данная технология создала предпосылки для возникновения биотехнологии и явила собой быстродействующий, эффективный, мощный инструмент, обеспечивающий создание микроорганизмов, растений и животных с заранее заданными генетическими характеристиками.

Основные современные иммунобиотехнологические платформы:

1. Улучшенные новые типы интерлейкинов для онкологии.

Увеличивающиеся инвестирования направлены на понимание роли интерлейкинов в онкологии и при воспалении. В настоящее время исследуется роль IL-12 как потенциального кандидата для лечения рака почки и меланомы. В стадии доклинических испытаний находится рекомбинантный агонист IL-7 и одновременно работают над продвижением интерлейкина-6 в качестве потенциального лекарства от рака.

2. Технология лекарств следующего поколения на основе белков путем слияния гена, который экспрессирует человеческий альбумин с геном, который экспрессирует терапевтический белок. Такая новая противоопухолевая форма интерлейкина-2 способна проявлять удлиненное распределение в тканях и остается в циркуляционном пути дольше, чем рекомбинантный интерлейкин-2, потенциально претендуя на улучшенный клинический эффект и менее частое применение (Albiject).

2. Сочетание гликозилирования и ПЕГилирования для улучшения новых колониестимулирующих факторов.

3. Разработка двух новых интраназальных форм интерферона альфа и интерферона бета-1a для лечения гепатита и рассеянного склероза, соответственно. Все больше доказательств, что назальная форма доставки лекарства повышает его

эффективность и имеет меньше побочных эффектов, чем инъекционная форма.

#### 4. Система доставки гена интерферона.

Biogen-IDEC разрабатывает генотерапию, основанную на терапевтическом продукте, который доставляет гены бета-интерферона внутрь опухоли, как потенциальный способ лечения определенных типов рака. Ген бета-интерферона запускает механизм действия, который может помочь ингибировать рост клеток опухоли и убить опухолевые клетки.

Методами генетической инженерии получают антибиотики, моноклональные антитела и цитокиновые препараты. Технологии рекомбинантных ДНК широко применяются в сельском хозяйстве и медицине (диагностика, генотерапия и т.д.)

### **Контрольные вопросы:**

#### **Базовый уровень**

1. Определение и задачи клеточной инженерии.
2. Типы растительных тканей. Способы их выращивания.
3. Особенности строения растительных клеток.
4. Методы культивирования культур растительных клеток.
5. Основные характеристики культур растительных тканей: гормоннезависимость, физиологическая ассинхронность, генетическая гетерогенность.
6. Понятие тотипотентности, дедифференцировки и вторичной дифференцировки.

#### **Повышенный уровень**

1. Методы выращивания одиночных клеток.
2. Определение соматической гибридизации, гибридов и цибридов.
3. Определение протопластов. Актуальность их использования.

## **Практическое занятие № 9** Биотехнологическое использование микроорганизмов при получении витамина С

**Цель работы:** изучить основы эффективности использования биотехнологических методов в промышленном производстве витамином и коферментов

### **Теоретическая часть:**

Витамины и коферменты являются профилактическими и лечебными препаратами, обладающими широким спектром фармакотерапевтического действия в различных областях медицинской практики. В последнее время достигнуты большие успехи в их промышленном получении с помощью биотехнологических методов.

Один из классических примеров промышленного использования микроорганизмов в получении витамина С — превращение D-сорбита в L-сорбозу бактериями *Gluconobacter oxydans*. L-сорбоза является промежуточным продуктом синтеза аскорбиновой кислоты, проводимого обычно по методу Рейхштейна. Процесс получения L-сорбозы биотехнологическим способом основан на способности различных штаммов уксуснокислых бактерий к селективному окислению сорбита. В отличие от химического процесса, где в результате окисления сорбита получается смесь продуктов, окислительная трансформация уксуснокислых бактерий характеризуется необычайно точным воздействием на определенные группы в молекулах этих веществ. Данные бактерии превращают многоатомные спирты в сахара, дегидрируя вторичную спиртовую группу полиола в соответствии с правилом Бертрана-Хадсона: «Из двух вторичных спиртовых групп, находящихся в цис-положении, дегидрируется та, которая примыкает первичной спиртовой группе.

Наиболее сильной окислительной способностью обладают штаммы (*Gluconobacter oxydans* и *Acetobacter melanogenum*). Для получения сорбозы *G. oxydans* выращивают в питательных средах, содержащих высокие концентрации сорбита и дрожжевой или кукурузный экстракт, которые служат источниками азота, витаминов и других веществ, обеспечивающих рост бактерий. Для роста продуцента и окисления сорбита в сорбозу необходимо постоянное поступление кислорода в культуральную жидкость. При высоких концентрациях сорбита лишь небольшая

его часть затрачивается на синтез биомассы бактерий. Основное количество сорбита трансформируется в сорбозу, степень конверсии составляет 96—98%. В ходе процесса происходит снижение рН культуральной жидкости. По окончании трансформации фильтрат концентрируют в вакуум-аппаратах при 60 °С. При охлаждении сорбоза выпадает в осадок в виде кристаллов.

### **Контрольные вопросы:**

#### **Базовый уровень**

1. Биологические свойства витаминов
2. Классификация: жирорастворимые, водорастворимые витамины.
3. Зависимость выработки от стадии роста клеток первичных метаболитов в процессе ферментации биообъекта.
4. Технологические условия синтеза витамина В2. Продуценты.
5. Технологические условия синтеза витамина В12 для медицинских целей.

#### **Продуценты**

6. Технологические условия синтеза витамина В12 в качестве кормовых добавок. Продуценты.

#### **Повышенный уровень**

1. Технологические условия синтеза витамина D, продуценты.
2. Технологические условия синтеза витамина А. Продуценты.
3. Особенности применения генно-модифицированных микроорганизмов в процессе производства витаминов.
4. Препараты витаминов, показания к применению.

## **Литература:**

### Основная литература:

1. Барышева, Е. С. Биохимия Электронный ресурс : Учебное пособие / Е. С. Барышева. - Оренбург : Оренбургский государственный университет, ЭБС АСВ, 2017. - 142 с. - Книга находится в премиум-версии ЭБС IPR BOOKS. - ISBN 978-5-7410-1888-0, экземпляров неограничено
2. Емельянов, В.В.; Биохимия Электронный ресурс : учебное пособие / Н.Н. Мочульская / Н.Е. Максимова / В.В. Емельянов. - Биохимия, 2022-08-31. - Екатеринбург : Уральский федеральный университет, ЭБС АСВ, 2016. - 132 с. - Книга находится в базовой версии ЭБС IPRbooks. - ISBN 978-5-7996-1893-3, экземпляров неограничено

### Дополнительная литература:

1. Глинка, Н. Л. Общая химия / Н. Г. Глинка ; Под ред. А. И. Ермакова. - Изд. 30-е, испр. - М. : Интеграл-Пресс, 2003. - 728с. - Библиогр.: с. 704. - Предм. указ.: с. 706. - ISBN 5-89602-017-1
2. Димитриев, А.Д.; Биохимия Электронный ресурс : учебное пособие / А.Д. Димитриев. - Саратов : Вузовское образование, 2018. - 111 с. - Книга находится в базовой версии ЭБС IPRbooks. - ISBN 978-5-4487-0165-8, экземпляров неограничено