

## ЛЕКЦІЯ № 5

### Тема: Обмін речовин (метаболізм) мікроорганізмів

#### План

1. Поняття про метаболізм.
2. Ферменти бактерій.
3. Енергетичний метаболізм.
4. Бродіння, його типи.

#### 1. Поняття про метаболізм прокариот

**Метаболізм** – це сукупність процесів, що протікають у клітині, які забезпечують її життєдіяльність. Клітинний метаболізм складається із двох протилежно спрямованих процесів: енергетичного метаболізму (катаболізму) і конструктивного метаболізму (анаболізму).

**Енергетичний метаболізм (катаболізм)** – це сукупність реакцій окиснення різних відновлених органічних і неорганічних сполук, що супроводжуються виділенням енергії, яка акумулюється клітиною у вигляді фосфатних зв'язків.

**Конструктивний метаболізм (анаболізм)** – це сукупність реакцій біосинтезу, у результаті яких за рахунок речовин, що надходять ззовні, і проміжних продуктів, що утворюються при катаболізмі (амфіболітів), синтезуються речовини клітини. Цей процес пов'язаний зі споживанням вільної енергії, що запасується в молекулах АТФ або інших багатих енергією з'єднаннях.

Метаболізм прокариот, як енергетичний, так і конструктивний, відрізняється надзвичайною різноманітністю. Це є результатом того, що бактерії можуть використовувати в якості джерел енергії й вуглецю досить широкий набір органічних і неорганічних сполук. Така здатність обумовлена відмінностями в наборі ферментів.

#### 2. Ферменти бактерій

Мікроорганізми синтезують різні ферменти – специфічні білкові каталізатори. У бактерій виявлені ферменти 6 основних класів.

1. Оксидоредуктази – каталізують окисно-відновні реакції.
2. Трансферази – здійснюють реакції переносу груп атомів.
3. Гідролази – здійснюють гідролітичне розщеплення різних сполук.
4. Ліази – каталізують реакції відщеплення від субстрату хімічної групи негідролітичним шляхом з утворенням подвійного зв'язку або приєднання хімічної групи до подвійних зв'язків.
5. Лігази або синтетази – забезпечують з'єднання двох молекул, сполучене з розщепленням пірофосфатних зв'язків у молекулі АТФ або аналогічного трифосфату.
6. Ізомерази – визначають просторове розташування груп елементів.

Ферменти відіграють вирішальну роль у всіх реакціях. Склад ферментів визначає геном клітини і є відносно постійним. Відповідно до механізмів генетичного контролю в бактерій виділяють три групи ферментів.

За місцем перебування розрізняють:

**Екзоферменти** – виділяються в зовнішнє середовище, здійснюють процеси розщеплення високомолекулярних органічних сполук. Здатність до утворення екзоферментів багато в чому визначає *інвазивність* бактерій – здатність проникати через слизисті, сполучнотканинні й інші тканинні бар'єри. До цієї ж групи належать *ензими*, що розкладають антибіотики.

**Ендоферменти** – внутрішньоклітинні ферменти.

За часом утворення всі ферменти можна розділити на три групи:

**Конститутивні** – їхній синтез відбувається з постійною швидкістю незалежно від речовини субстрату; у клітині вони перебувають у більш-менш постійній концентрації. Приклад: гліколітичні ферменти – обслуговують процеси гліколізу.

**Індуцибельні** – швидкість їх синтезу в клітині різко зростає у відповідь на появу в середовищі субстрату-індуктора. До індуцибельних ферментів належать більшість гідролаз.

**Алостеричні** ферменти – чутливо реагують на концентрацію кінцевих продуктів метаболізму.

У бактеріології для диференціації мікроорганізмів за *біохімічними властивостями* найчастіше основне значення мають кінцеві продукти й результати дії ферментів. Відповідно до цього існує мікробіологічна (робоча) класифікація ферментів.

1. Сахаролітичні.
2. Протеолітичні.
3. Аутолітичні.
4. Окисно-відновні.
5. Ферменти патогенності (вірулентності).

Ферментний склад клітини визначається геномом і є досить постійною ознакою. Знання біохімічних властивостей мікроорганізмів дозволяє ідентифікувати їх за набором ферментів. Основні продукти ферментації вуглеводів і білків – кислоти, газ, індол, сірководень, хоча реальний спектр для різних мікроорганізмів набагато більший.

Основні *ферменти вірулентності* – гіалуронідаза, плазмокоагулаза, лецитіназа, нейрамінідаза, ДНК-аза. Визначення ферментів патогенності має значення при ідентифікації ряду мікроорганізмів і виявлення їх ролі в патології.

Ряд ферментів мікроорганізмів широко використовується в медицині й біології для одержання різних речовин (аутолітичні, протеолітичні), у генній інженерії (рестриктази, лігази).

### **3. Енергетичний метаболізм**

Як уже було відзначено, усі мікроорганізми стосовно енергетичних джерел підрозділяються на дві групи: **фототрофи й хемотрофи**. Хемотрофні мікроорганізми використовують для синтезу молекул АТФ енергію, що звільняється при хімічних реакціях, фототрофні – сонячну енергію в процесі фотосинтезу.

Утворення молекул АТФ із АДФ може відбуватися двома способами:

– фосфорилування в дихальному або фотосинтетичному електронно-транспортному ланцюгу (пов'язане з мембранами або їх похідними – **мембранне фосфорилування**);

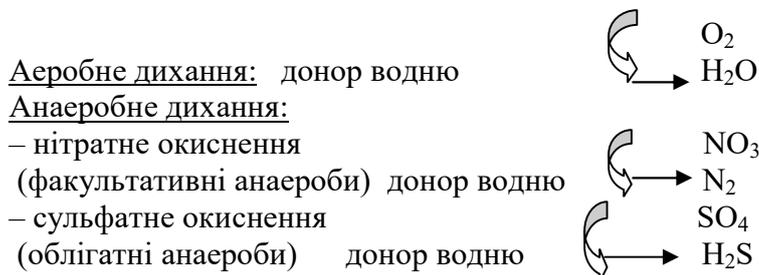
– фосфорилування на рівні субстрату (фосфатна група переноситься на АДФ від речовини-субстрату, більш багатого енергією, ніж АТФ – **субстратне фосфорилування**).

У хемотрофних бактерій генерація енергії в молекулах АТФ зводиться до двох типів біохімічних реакцій: *окиснення й відновлення*. Усі окисно-відновні реакції енергетичного метаболізму хемотрофних бактерій можна розділити на три типи: *аеробне дихання або аеробне окиснення, анаеробне дихання і бродіння*.

**Аеробне дихання** – процес, при якому донором водню або електронів є органічні (рідше неорганічні) речовини, а кінцевим акцептором – молекулярний кисень. Основна кількість енергії при аеробному диханні утворюється в результаті *мембранного фосфорилування*.

**Анаеробне дихання** – ланцюг анаеробних окисно-відновних реакцій, які зводяться до окиснення органічного або неорганічного субстрату з використанням у якості

кінцевого акцептора електронів не молекулярний кисень, а інших неорганічних речовин (нітрату –  $\text{NO}_3^-$ , нітриту –  $\text{NO}_2^-$ , сульфату –  $\text{SO}_4^{2-}$ , сульфїту –  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{CO}_2$ ), а також органічних речовин (фумарату й ін.). Молекули АТФ утворюються в основному в результаті **мембранного фосфорилування**, але в меншій кількості, ніж при аеробному диханні.



У процесі аеробного дихання утворюються токсичні продукти окиснення ( $\text{H}_2\text{O}_2$  – перекис водню,  $\text{O}^\bullet$  – вільні кисневі радикали), від яких захищають специфічні ферменти, насамперед *каталаза*, *пероксидаза*, *пероксиддисмутаза*. В анаеробів ці ферменти відсутні, також як і система регуляції окисно-відновного потенціалу.

**Бродіння** – сукупність анаеробних окисно-відновних реакцій, при яких органічні сполуки слугують як донорами, так і акцепторами електронів. Як правило, донори й акцептори утворюються з того самого субстрату, що піддається бродінню (наприклад, з вуглеводу). АТФ при бродінні синтезується в результаті реакцій **субстратного фосфорилування**.

Найбільш вигідним типом окисно-відновних реакцій у бактерій є *аеробне дихання*, тому що тут відбувається найбільший вихід молекул АТФ. Найменш вигідним типом таких реакцій є *бродіння*, що супроводжується мінімальним енергетичним виходом.

### Шляхи катаболізму глюкози до ПВК

Оскільки більшість мікроорганізмів використовують у якості джерела енергії вуглеводи, і в першу чергу глюкозу, розглянемо основні шляхи її розщеплення або катаболізму. У бактерій можливі три шляхи катаболізму глюкози до піровиноградної кислоти:

1) гліколіз або фруктозодифосфатний шлях – Ембдена–Мейергофа–Парнаса (за ім'ям дослідників, що зробили значний внесок у вивчення цього процесу).

2) окисний пентозофосфатний шлях або гексозомонофосфатний шлях – Варбурга–Дикенса–Хоррекера. Характерний для деяких представників родини *Enterobacteriaceae*, а також для гетероферментативних *молочнокислих бактерій* і деяких *маслянокислих бактерій*.

3) 6-фосфоглюконатний шлях (КДФГ-шлях) або шлях Ентнера–Дудорова. Цей шлях є найкоротшим механізмом розщеплення вуглеводів до піровиноградної кислоти. Зустрічається рідше, ніж інші. Характерний в основному для деяких *псевдомонад* і *оцтовокислих бактерій*.

Усі шляхи катаболізму починаються з того, що глюкоза в клітині спочатку фосфорилується в присутності ферменту гексокінази й АТФ як донора фосфату. Утворюється глюкозо-6-фосфат, який представляє метаболічно активну форму глюкози в клітині й слугує вихідним пунктом для кожного із трьох шляхів катаболізму.

**Гліколіз.** Найпоширеніший шлях катаболізму в бактерій. Глюкозо-6-фосфат піддається ізомеризації за допомогою глюкозофосфатізомерази й фосфорилується далі у фруктозу-1,6-дифосфат, яка потім розщеплюється на 3-фосфогліцеринувий альдегід (3-

ФГА) і фосфодіоксиацетон. Фосфодіоксиацетон під дією ферменту триозофосфатізомерази перетворюється в 3-ФГА. Тобто, з однієї молекули глюкози утворюється 2 молекули 3-ФГА. На ці реакції перетворення глюкози й 3-ФГА витрачається енергія двох молекул АТФ. Далі відбувається окиснення кожної молекули 3-ФГА до 1,3-дифосфогліцеринової кислоти (1,3-ФГК). 1,3-ФГА реагує з АДФ, віддаючи фосфатну групу, у результаті чого синтезується молекула АТФ. Таким чином, енергія, що звільняється при окисненні 3-ФГА, шляхом субстратного фосфорилування виявляється акумульованою в молекулі АТФ. Утворюється 3-ФГК, яка під дією ферменту фосфогліцеромутази перетворюється в 2-ФГК, з якої в результаті відщиплення води утворюється фосфоенолпірвіноградна кислота (ФЕП). Далі багата енергією фосфатна група з ФЕП переноситься пірваткиназою на АДФ, утворюється молекула АТФ і пірвіноградна кислота (ПВК). Це друге фосфорилування на рівні субстрату.

Таким чином, при розпаді однієї молекули глюкози утворюється чотири молекули АТФ, 2 з яких на самому початку процесу активування глюкози були витрачені на 2 молекули АТФ, тому чистий вихід становить 2 молекули АТФ.

**Пентозофосфатний шлях.** У цьому циклі глюкозо-6-фосфат, що утворюється шляхом активування глюкози молекулою АТФ, перетворюється через ряд проміжних реакцій в 6-фосфоглюконову кислоту, яка піддається окисненню й декарбоксілюванню з утворенням рибулозо-5-фосфат,  $\text{CO}_2$  і НАДФН<sub>2</sub>. Рибулозо-5-фосфат включається до складного циклу, що призводить до утворення з його трьох молекул двох молекул глюкозо-6-фосфату й однієї молекули 3-ФГА. Глюкозо-6-фосфат може знову включитися в цикл, а 3-ФГА перетворюється гліколітичним шляхом у ПВК.

З енергетичної точки зору цей шлях у два рази менш ефективний, ніж гліколітичний, тому що на 1 молекулу глюкози утворюється тільки 1 молекула АТФ. Однак, цей шлях забезпечує клітини пентозами (рибулозо-5-фосфат), які є попередниками нуклеотидів і нуклеїнових кислот. Крім того, у цьому циклі утворюються 2 молекули НАДФН<sub>2</sub>, які необхідні клітині для реакцій біосинтезу.

**Шлях Ентнера-Дудорова.** Від пентозо-фосфатного шляху він відрізняється тим, що 6-фосфоглюконова кислота (6-ФГК) перетворюється у ПВК і 3-ФГА. Останній теж перетворюється у ПВК. З однієї молекули глюкози в цьому шляху синтезується 1 молекула АТФ, 1 молекула НАДФН<sub>2</sub> і 1 молекула НАДН<sub>2</sub>.

Таким чином, найважливішим продуктом, що утворювалися при всіх шляхах розщеплення глюкози, є пірвіноградна кислота, яка зазнає подальших перетворень. Пірват займає центральне положення в проміжному метаболізмі й може слугувати попередником багатьох продуктів.

## Шляхи перетворення ПВК

### Аеробне дихання

Пірвіноградна кислота, що утворилася під час розщеплення глюкози, піддається окислювальному декарбоксілюванню і перетворюється на активовану оцтову кислоту, або скорочено – **ацетил-КоА**, який є вихідним субстратом циклу трикарбонових кислот (циклу Кребса). В остаточному підсумку окиснення ацетил-КоА в циклі трикарбонових кислот (ЦТК) дає: 2 молекули  $\text{CO}_2$ , 1 молекулу АТФ і 8 атомів водню. Таким чином, цикл Кребса виконує функцію кінцевого окиснення органічних речовин.

У деяких бактерій ЦТК «розірваний». Найчастіше відсутній ферментативний етап перетворення а-кетоглутарової кислоти в бурштинову. У такому виді він не може функціонувати в системі енергозабезпечуючих механізмів клітини. Основна функція «розірваного» ЦТК – біосинтетична.

НАДФН<sub>2</sub> і НАДН<sub>2</sub>, що утворилися на різних етапах окиснення органічних речовин, надходять у дихальний ланцюг, який у бактерій перебуває в цитоплазматичній мембрані, а в еукаріот у мембрані мітохондрій. У дихальному ланцюзі НАДФН<sub>2</sub> і НАДН<sub>2</sub> знову окиснюються до НАДФ і НАД, а атоми водню, які звільняються внаслідок цих реакцій, переміщуються через низку етапів аж до кінцевого акцептора – молекулярного кисню. Перехід водню по дихальному ланцюгу полягає в ряді окисно-відновних реакцій за яких виділяється достатньо енергії для утворення АТФ. Такий процес має назву **окисного фосфорилування**. У реакціях окисного фосфорилування бере участь спеціальний фермент АТФ-синтетаза, який каталізує перетворення АДФ в АТФ.

Дихальні ланцюги мікроорганізмів складаються з наступних найважливіших локалізованих у мембрані переносників атомів водню або електронів: флавопротеїни, хінони, FeS-білки й цитохроми.

**Флавопротеїни** – коферменти, до складу яких входить вітамін В<sub>2</sub>. Флавопротеїни здійснюють перенос атомів водню, тобто є дегідрогеназами. Стартовим переносником є НАДФН<sub>2</sub>-дегідрогеназа, вона здійснює перенос водню з НАДФН<sub>2</sub> на наступні компоненти дихального ланцюга. Атоми водню від НАДН<sub>2</sub> надходять відразу на **хінон**.

**Хінони** – жиророзчинні сполуки. У грамнегативних бактерій хінони представлені убихіноном (кофермент Q) і менахіноном. Вони ліпофільні й тому локалізуються в ліпідній фазі. Вони переносять атоми водню, передаючи його на цитохроми, функціонують у дихальному ланцюзі на ділянці між флавопротеїнами й цитохромами.

**Залізо-сірчані білки** (FeS-білки) містять залізо-сіркоцентри, у яких атоми заліза пов'язані з одного боку, із сіркою амінокислоти цистеїну, а з іншого – з неорганічною сульфідною сіркою. Дихальні ланцюги містять велику кількість FeS-центрів. Залізо-сіркоцентри входять до складу деяких флавопротеїнів. Вони можуть здійснювати одночасний перенос 1 або 2 електронів, що пов'язане зі зміною валентності атомів заліза.

**Цитохроми** беруть участь на заключному етапі ланцюга переносу електронів, водень вони не транспортують. До цитохромів електрони надходять від хінонів. У якості простетичної групи цитохроми містять **гем**. Цитохроми забарвлені; вони відрізняються один від одного спектрами поглинання й окисно-відновними потенціалами. Розрізняють цитохроми *a*, *a<sub>3</sub>*, *b*, *c*, *o* і інші. Найбільше широко розповсюджений цитохром c. Кінцеві (термінальні) цитохроми дихального ланцюга – це цитохроми *a+a<sub>3</sub>* або цитохромоксидаза. Вони передають електрони на молекулярний кисень, тобто каталізують відновлення молекулярного кисню до води. У реакційному центрі цитохромоксидази містяться крім двох гемів два атоми міді.

Таким чином, дихальний ланцюг побудований так, що флавопротеїни й хінони здійснюють перенос атомів водню, а FeS-білки й цитохроми – електрони.

### **Анаеробне дихання**

При анаеробному диханні кінцевим акцептором електронів є неорганічні або органічні сполуки, але не молекулярний кисень.

Якщо кінцевим акцептором електронів є SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, то процес називають **сульфатним диханням**, а бактерії – сульфатвідновлювальними або сульфатредукуючими.

Якщо кінцевим акцептором електронів слугують NO<sub>3</sub><sup>-</sup> і NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, то процес називається **нітратним диханням** або **денітрифікацією**, а бактерії, що здійснюють цей процес, називаються денітрифікуючими.

Якщо кінцевим акцептором електронів слугує CO<sub>2</sub>, то процес називають **карбонатним диханням**, а бактерії – метаногенами.

Якщо фумарат, то процес називається **фумаратним диханням**.

Бактерії, що здатні до анаеробного дихання мають короткі електронно-транспортні або дихальні ланцюги, тобто вони не містять усіх переносників, характерних для аеробного дихання. У облігатних анаеробів не функціонує цикл Кребса або він розірваний і виконує тільки біосинтетичні функції, але не енергетичні. До **облігатних анаеробних**

належать сульфатвідновлювальні й метанутворювальні бактерії; до факультативних – денітрифікуючі й бактерії, що здійснюють фумаратне дихання.

#### 4. Бродіння і його типи

**Бродіння** – еволюційно найбільш давній і примітивний спосіб одержання енергії.

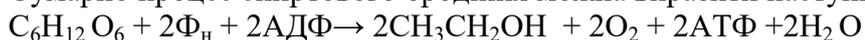
Основні типи бродіння – спиртове, молочнокисле, маслянокисле – відкриті Л. Пастером до 1861 року. Процес бродіння протікає в анаеробних умовах (без участі O<sub>2</sub>) за рахунок окисно-відновних перетворень органічних сполук субстрату й супроводжується виділенням енергії. Для порівняння:

збродження 1 молекули глюкози – 2 АТФ → молочна кислота 196,6 кДж/моль;

окиснення 1 молекули глюкози – 38 АТФ → CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O 2870,2 кДж/моль

**Спиртове бродіння.** Процес спиртового бродіння проходить за гліколітичним шляхом до утворення пірвиноградної кислоти. Далі при участі ключового ферменту спиртового бродіння – пірватдекарбоксілази – пірвиноградна кислота декарбоксілюється до оцтового альдегіду і вуглекислого газу. Ацетальдегід, що утворився, виступає кінцевим акцептором і під дією НАД<sup>+</sup>-залежної алькогольдегідрогенази відновлюється до етиленового спирту. Донором водню слугує 3-фосфогліцериновий альдегід.

Сумарно процес спиртового бродіння можна виразити наступним рівнянням:



Енергетичний вихід процесу становить 2 молекули АТФ на 1 молекулу зброженої глюкози. Відмінність спиртового бродіння від молочнокислого полягає в різній природі кінцевого акцептора водню.

При спиртовому бродінні мікроорганізми зброжують вуглеводи з утворенням етилового спирту, як основного продукту бродіння.

Збудники: дріжджі: *Saccharomyces cerevisiae*, *Sac. globosus*, *Sac. vini*; гриби: *Mucor*, *Fusarium*, *Oidium*; бактерії: *Sarcina ventriculi*, деякі *Clostridium*.

Спиртове бродіння лежить в основі ряду промислових виробництв – виноробства, одержання спирту, пивоваріння, хлібопечення. На Європейському континенті в промисловості використовують різні раси сахароміцетних дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*, *Sacch. vini*), на Американському континенті – різні раси схизосахароміцетів.

Серед прокариот до активного спиртового бродіння здатні *Erwinia amylovora*, *Zytoponas mobilis*, *Sarcina ventriculi*. Остання використовується в промисловому виробництві для одержання етилового спирту в країнах Сходу.

**Ефект Пастера:** при доступі кисню в середовище культивування, дріжджі, що здійснюють бродіння, переходять на аеробний шлях дихання, коефіцієнт використання субстрату збільшується й ріст біомаси зростає. Цим користуються при вирощуванні пекарських дріжджів (середовище культивування піддають аерації). Навпаки, для одержання спирту процес ведеться в анаеробних умовах. Збродження цукрів до етилового спирту йде шляхом Ембдена-Мейергофа-Парнаса, або гліколізу.

Джерелом вуглецю для спиртового бродіння можуть бути: цукри, гліцерин, вуглеводні. Дріжджі не вибагливі до азоту, краще засвоюють азот з амонійних солей. Амінокислоти здатні синтезувати самі. Необхідними є сполуки фосфору, калій, натрій. Мікроелементи Cu, Co, Fe підвищують активність ферментів. Оптимальна рН слабкокисло, ОВП низький, температура культивування 28–30°C. Середовище мешкання дріжджів: ґрунт, поверхня рослин тощо.

Оптимальна концентрація цукру при виробництві спирту в середовищі – 10-18 %. Збільшення кислотності призводить до одержання більшої кількості гліцерину (побічний продукт). Зниження кислотності призводить до синтезу органічних кислот.

### Виробництво вина

Мікроорганізми зброджують глюкозу й фруктозу виноградного й плодово-ягідного соку (сусло) з утворенням етилового спирту й вуглекислого газу. Виноградний сік містить 10–25 % цукру. У виноградному суслі повністю змінюється мікрофлора, наприкінці – тільки дріжджі. Останнім часом використовують чисті культури дріжджів, пригнічуючи розвиток інших мікроорганізмів SO<sub>2</sub>.

Спиртове бродіння може бути завершеним і незавершеним. Залежно від цього вина діляться на 2 види:

1. вина із завершеним бродінням (сухі), коли цукор зброджений «насухо» і в середовищі його не більш 0,1%;
2. вина з перерваним спиртовим бродінням. Це досягається додаванням бісульфіту натрію або спирту.

Сусло – не містить барвників – з нього виготовляють біле вино. Якщо сусло бродить у присутності виноградної шкірки, то виходить червоне вино. Молоде вино освітлюють і дають дозріти (декілька місяців, років).

Ігристі вина (шампанські) – піддають повторному бродінню, додаючи цукор (під тиском) у закритих пляшках, де відбувається насичення розчину вуглекислим газом.

Херес – одержують шляхом додавання до вина 15 % спирту й витриманням його на повітрі. На поверхні починає розвиватись плівка з дріжджів, що надає вину специфічного смаку.

### Виробництво пива

Пиво виготовляють зі злаків, у яких відсутні цукри (ячмінь, рис, кукурудза), але міститься крохмаль, який гідролізується до мальтози й глюкози. Опукрювання здійснюють у результаті пророщення зерна. Солод, який при цьому утворюється, містить амілазу, фермент, що розщеплює крохмаль. Пророслі зерна не містять цукру, їх розмелюють і змішують із водою (гідролізація крохмалю). Екстракт відокремлюють, кип'ятять із хмелем, що забезпечує специфічний запах і зберігання, адже стійкість пиву надають ефірні масла із хмелю. При виробництві пива використовують різні раси пивних дріжджів:

- а) верхові (міцне пиво) – працюють за температури 20°C;
- б) низові (не міцне) – за температури 15°C.

**Молочнокисле бродіння.** Еволюційно молочнокисле бродіння вважається одним з найдавніших і примітивних типів бродіння. За характером самого бродіння й кінцевими продуктами розрізняють: *гомоферментативне* й *гетероферментативне* молочнокисле бродіння.

**Гомоферментативне** молочнокисле бродіння – в основі його лежить гліколітичний цикл зброджування з утворенням 2 молекул піривиноградної кислоти. Остання, виступаючи кінцевим акцептором водню, відновлюється до єдиного продукту – молочної кислоти.

Цей процес можна виразити наступним рівнянням:

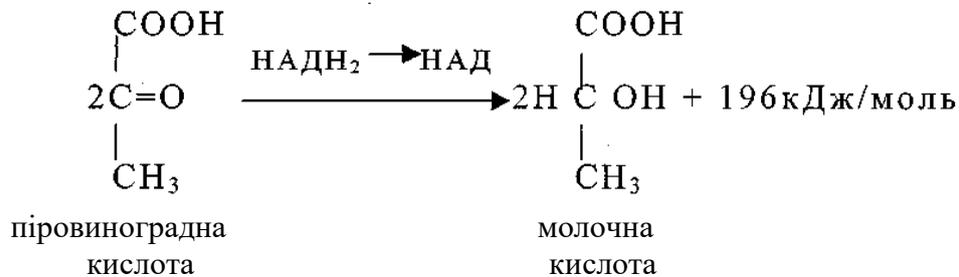


Енергетичний вихід гомоферментативного молочнокислого бродіння невеликий і становить усього 2 молекули АТФ на 1 молекулу збродженої глюкози.

Процес ведуть гомоферментативні молочнокислі бактерії, які здатні зброжувати 85–98% цукру, що міститься в середовищі, до молочної кислоти. Морфологічно молочнокислі бактерії представлені коками, що належать до родів *Streptococcus* і

*Pediococcus*, паличкоподібними формами роду *Lactobacillus*. Усі бактерії цієї групи грампозитивні, неспороносні (за винятком *Lactobacillus inulinus*), переважно нерухливі анаероби або мікроаерофіли. Джерелом вуглецю для них служать молочні або рослинні цукри й рідко деякі пентози, органічні кислоти. Низька біосинтетична здатність цієї групи бактерій свідчать про примітивність їх конструктивного метаболізму.

**Представники:** *Streptococcus lactis*, *St. faecalis*, *St. thermophilus*; *Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*.



**Гетероферментативне** молочнокисле бродіння – у його основі лежить пентозофосфатний шлях зброджування гексоз або пентоз із утворенням молочнокислої кислоти й ряду інших продуктів – оцтової кислоти, етилового спирту, гліцерину й вуглекислого газу:



Облігатні гетеротрофні молочнокислі бактерії позбавлені ключових ферментів гліколітичного шляху – альдолази й триозофосфатізомерази. До цієї групи належать бактерії родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc* і *Bifidobacterium*. Деякі молочнокислі бактерії здатні здійснювати як гомо-, так і гетероферментативне молочнокисле бродіння, зброджуючи гексози за гліколітичним, а пентози за пентозофосфатним шляхом. **Представники:** р. *Leuconostoc*, р. *Bifidobacterium*, р. *Lactobacillus*.

Бродіння, що здійснюють *Bifidobacterium bifidum* – гетероферментативне. Свою назву біфідобактерії одержали через Y, V-форми (*bifidum* – роздвоєний). Переважають у кишечнику немовлят, що годуються материнським молоком. Це пов'язане із потребами бактерій у вуглеводах, що містять N-Ацетилглюкозамін, який є тільки в жіночому молоці. Усі біфідобактерії – **облігатні анаероби**, не переносять присутності кисню й для їхнього росту потрібна атмосфера, що містить 10 % вуглекислого газу. Ці бактерії були виявлені й у кишечнику дорослих людей і в мулі.

Рід *Bifidobacterium* зараз відносять до актиноміцетів, а не до родини *Lactobacillaceae*.

### Поширення молочнокислих бактерій

Молочнокислі бактерії досить широко поширені в природі. У природі місцеперебування молочнокислих бактерій визначається їхніми складними потребами в поживних речовинах і способом одержання енергії – тільки шляхом бродіння. Ці бактерії майже ніколи не зустрічаються у водоймах. Здатні існувати при різних температурах: 40-42°C, 25-30°C. рН=7, але можуть і при рН=5-5,8. У якості буфера застосовують CaCO<sub>3</sub>.

1. У молоці, місцях його переробки й молочних продуктах: *Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *Streptococcus lactis*;

2. На рослинах рослинних рештках, що розкладаються: *L. plantarum*, *L. brevis*, *Str. lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*;

3. У кишечнику й слизистих оболонках людини й тварин: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*, *Str. faecalis*, *Str. pyogenes*.

Гетероферментативні молочнокислі бактерії роду *Bifidobacterium* є мешканцями кишечника тварин і людини, нерідко вони становлять від 50 до 90% мікробного населення у фекаліях людини. *Str. faecalis* – звичайний мешканець кишечника; *Str. bovis* – травного тракту жуйних. Багато стрептококів мешкає на слизистій ротової порожнини, дихальних і сечових шляхів, статевих органів. Однак серед них є паразити крові й дуже небезпечні збудники.

У зв'язку з тим, що молочнокислі бактерії досить стійкі до утвореної ними молочній кислоті, вони можуть швидко витіснити інших бактерій. Тому їх легко культивувати на елективних середовищах і легко виділяти. Природні накопичувальні середовища – молоко, кисле тісто, кисла капуста, силос.

### **Потреба у факторах росту**

Відмінною ознакою молочнокислих бактерій є потреба в ростових факторах. Жоден із представників цієї групи не може рости на середовищі із глюкозою й солями амонію. Більшість потребує ряду вітамінів (тіамін, біотин, пантотенова, нікотинова, фолієва кислоти) і амінокислот, а також пуринах і піримідинах.

Культивують цих бактерій на складних середовищах, що містять дріжджовий екстракт, томатний сік, молочні сироватки й навіть кров. Виявилося, що при рості на середовищах із кров'ю в молочнокислих бактерій утворюються цитохроми й вони здатні здійснювати фосфорилування в дихальному ланцюзі.

Таким чином, молочнокислі бактерії не здатні синтезувати багато метаболітів. З іншого боку, більшість з них здатні використовувати лактозу (приспособлення до середовища). Цим вони близькі до кишкової палички.

Багато молочнокислих бактерій здатні синтезувати речовини, що володіють антибіотичними властивостями (лактолін, бревін, нізин, диплококцин). На цьому заснована їхня дія як антагоністів гнильних й хвороботворних бактерій в кишечнику людини.

### **Одержання кисломолочних продуктів і сиру**

З незапам'ятних часів молочнокислі бактерії знаходять застосування в різних галузях господарської діяльності людину – для виготовлення кисломолочних продуктів, вершкового масла, сиру, квашення овочів, силосування тощо.

Для **виробництва кисломолочних продуктів** у різних географічних широтах використовують різні види молочнокислих бактерій. Так, на півночі до заквасок для кисляку входять в основному кокові форми *Streptococcus lactis* і *S. cremoris*; на півдні в заквасках кисляку переважає болгарська паличка (*Lactobacillus bulgaricus*).

Закваски деяких національних кисломолочних продуктів (кефіру, кумису, йогурту) представлені симбіотичними комплексами молочнокислих бактерій і дріжджів, що історично склалися. Молчнокислі бактерії зброджують лактозу молока з утворенням 0,8-1% молочної кислоти, дріжджі – здійснюють спиртове бродіння й зброджують лактозу з утворенням 1%-го етилового спирту.

Молчнокислі продукти, отримані в результаті *чистого молчнокислого бродіння* – це *кисляк*. Їх виготовляють шляхом спонтанного скисання молока за рахунок присутності в молоці бактерій, або шляхом внесення заквасок у вигляді чистих культур: *Lactobacillus bulgaricum*, *L. acidophilum*. *Pediococcus cerevisiae* – скисання вершків і одержання масла (+ ацетон і діацил – приємний аромат).

Продукти, отримані в результаті *змішаного бродіння* – спиртового й молчнокислого – *кефір* і *кумис*.

Кефір готують на «кефірних грибках», основу яких становлять нитчаста бактерія й *Str. lactis*, дріжджі, оцтовокислі бактерії. Залежно від ступеня дозрівання розрізняють кефір: слабкий – 1-й день скисання; середній – 2-й день; міцний – 3-й день. Незалежно від терміну виготовлення продукт повинен мати молчнокислий смак. Для одержання кефіру

з вираженим спиртовим бродінням квашення ведуть за температури 16-20 °С, а не при 22-28 °С (молочнокисло).

Кумис готують із кобилячого молока (вміст цукру 6%). У ньому енергійно відбувається спиртове бродіння. Основна культура – болгарська паличка (*Lactobacillus bulgaricum*).

Молочнокислі бактерії відіграють важливу роль у **виготовленні сирів**. В основі сироваріння лежить коагуляція казеїну молока під дією сичужного ферменту, одержуваного зі шлунка жуйних тварин. Згустки казеїну, що утворювалися, відокремлюють від молочної сироватки, спресовують, витримують у розчині солі й залишають на дозрівання. Під час дозрівання в сирній масі відбуваються складні процеси перетворення казеїну в амінокислоти під впливом ферментів. У молодому сирі весь азот входить до складу нерозчинного білка, але при дозріванні сиру білок розщеплюється на розчинні пептиди й амінокислоти, жирні кислоти, аміак. Так, наприклад, у швейцарському сирі в розчинні продукти входить 20-30% білка, у латвійському – практично весь. Іде також гідроліз жирів, перетворення молочної кислоти в пропіонову.

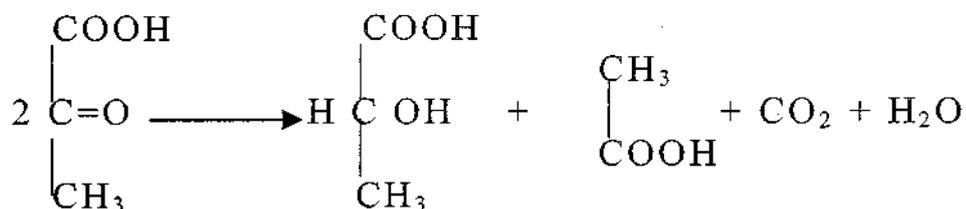
У **процесах квашення овочів і силосування кормів** беруть участь численні дикі раси гомо- і гетеро-ферментативних молочнокислих бактерій.

Для **виробництва молочної кислоти** в промисловості використовують глюкозу, сахарозу, лактозу, а також мелясу – відходи цукрової промисловості. Для зброджування молочної сироватки можна використовувати чисту культуру *L. bulgaricum*, меляси – *L. delbrukii*.

**Пропіоновокисле бродіння.** Пропіоновокислі бактерії (*Propionibacterium freudenreichii*) – грампозитивні, нерухливі, не утворюють спор; для них характерний бінарний поділ. Це **факультативні анаероби**, що виділяють каталазу. За морфологією подібні до корінебактерій. Клітини булавовидної і конусної форми, коковидні, розгалужені у вигляді V або Y, або нагадують китайські ієрогліфи, розташовані парами або в ланцюжках. Для росту потребують середовища з білками й амінокислотами, але можуть рости й на простих джерелах азоту (солі амонію) у присутності вітамінів (біотин, пантотенова кислота). Температура 30–37 °С, оптимальна рН=7,0.

Часто зустрічаються разом з молочнокислими бактеріями, які можуть стимулювати або інгібувати їхній розвиток. Мешкають у кишковому тракті жуйних, на рослинах.

Зброджування глюкози відбувається за гліколітичним шляхом до піровиноградної кислоти. Потім залежно від умов утворюються пропіонова, оцтова, бурштинова, молочна кислоти й вуглекислий газ.



Піровиноградна кислота → ЩУК → яблучна → → фумарова → бурштинова  
→ пропіонова кислота

Пропіонові бактерії використовують у промисловості для одержання ціанкобаламіну (вітамін В<sub>12</sub>), який вони здатні утворювати у значних кількостях.

Пропіоновокисле бродіння має важливе значення при дозріванні сирів. Наявність у сирах пропіонової і оцтової кислот зумовлює своєрідний гострий смак і запах, а завдяки виділенню вуглекислоти в сирній масі утворюються сирні «вічка» (порожнини).

**Маслянокисле бродіння.** Маслянокисле бродіння проходить у строго анаеробних умовах, яке здійснюється облігатними анаеробними бактеріями роду *Clostridium*.

Цей тип бродіння слід розглядати як один з варіантів ускладненого бродіння, в основі якого лежить гликолітичний шлях зброджування вуглеводів до пірвіноградної кислоти. Характерною рисою маслянокислого бродіння є реакція конденсації з утворенням переважно масляної кислоти. У результаті з пірвіноградної кислоти утворюються оцтовий альдегід, мурашина й оцтова кислоти, нерідко етиловий спирт. Мурашина кислота розпадається до CO<sub>2</sub> і H<sub>2</sub>, а реакція конденсації ацетальдегіду призводить до утворення масляної кислоти. Сумарно процес маслянокислого бродіння можна виразити наступним рівнянням:



Енергетичний вихід даного процесу становить 3 молекули АТФ на 1 молекулу збродженої глюкози.

Характер бродіння залежить від умов середовища (рН і температури). Кінцевими продуктами бродіння можуть бути або бутанол і ацетон, або масляна кислота (бутират). Якщо рН середовища зрушується в кислу сторону, то протікає *ацетонобутилове* бродіння. Якщо рН залишається в межах нейтральної – *маслянокисле* бродіння. Для підтримки нейтрального рН середовища в промисловості при одержанні масляної кислоти додають до середовища СаСО<sub>3</sub>.

Процес маслянокислого бродіння дуже лабільним і залежить від складу живильного середовища й стадії розвитку культури мікроорганізму.

Маслянокислі бактерії роду *Clostridium* численні й гетерогенні. Морфологічно вони представлені великими паличками. У молодій культурі палички рухливі, тип утворення джгутиків – перетрихій. Зі старінням клітини утворюють ендоспори. Спорангії перехідного типу – від клостридіального до плектридіального, форма спор сферична або овальна.

За типом використання вуглевмісних речовин маслянокислі бактерії підрозділяються на сахаролітичні й протеолітичні.

Сахаролітичні види (*Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum*) зброджують різні сполуки вуглеводної природи: пектин, целюлозу, крохмаль, хітин тощо.

Протеолітичні види (*Cl. acetobutylicum*, *Cl. nutrificum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. histolyticum*) у якості субстрату, що зброджується, використовують білки, амінокислоти, пурини, пиримідини.

Різні види маслянокислих бактерій у природі здійснюють найрізноманітніші процеси: аеробну амоніфікацію органічних азотовмісних речовин, анаеробне розкладання рослинних решток – пектину й клітковини. Маслянокислі бактерії нерідко викликають псування продуктів – гниття картоплі, овочів, псування сиру, масла, сметани, консервів, квашених овочів, силосу тощо.

**Ацетонобутилове бродіння.** Одним із видів бродіння, близьких до маслянокислого, є *ацетонобутилове* бродіння. Основними кінцевими продуктами перетворення вуглеводів є низка цінних продуктів: бутиловий, етиловий, ізопропіловий спирти, ацетон, масляна кислота, оцтова кислота, а також газу CO<sub>2</sub> і H<sub>2</sub>.

Збудники ацетонобутилового бродіння – рухливі, анаеробні спороносні палички (*Clostridium acetobutylicum*). Вони зброджують крохмаль, вуглеводи (крім клітковини). Вихід продукту обумовлений складом живильного субстрату, умовами культивування (рН середовища, температура), а також видом маслянокислих бактерій.

У промисловості широко використовують одержання ацетону й бутилового спирту з меляси, кукурудзяного борошна або іншої крохмалистої сировини. Ацетон застосовують як розчинник при одержанні шовку, шкіри, фотоплівки. Бутанол використовується у виробництві лаків. Після відгонки ацетону і спиртів *барду*, що залишаються від бражки, використовують для вилучення рибофлавіну, який продукується ацетонобутиловими

бактеріями. Барду також застосовують для вирощування метанових бактерій, які синтезують ціанкобаламін (вітамін B<sub>12</sub>).

### Неповне окиснення органічних сполук

Багато представників різних груп мікроорганізмів, наприклад бактерій р. *Acetobacter*, *Gluconobacter*, грибів р. *Aspergillus* і інших, здатні здійснювати неповне окиснення органічних речовин, зокрема вуглеводів. При цьому в середовищі накопичуються глюконова, лимонна, молочна, оцтова, фумарова й ін. кислоти.

У зв'язку з тим, що продукти, що утворюються під час неповного окиснення органічних речовин, подібні з тими, які утворюються в результаті бродіння, деякі процеси неповного окиснення умовно називають *окиснювальним бродінням*. Прикладом такого типу енергетичних реакцій є окиснення спирту в оцтову кислоту оцтовокислими бактеріями.

#### Окиснення етилового спирту до оцтової кислоти (оцтовокисле бродіння)

Біохімічну природу окиснення етилового спирту до оцтової кислоти, яке донедавна називалось оцтовокислим бродінням, встановив Л. Пастер (1862). За своїм біохімічним механізмом є неповним окисненням. Оцтовокислі бактерії можуть зброджувати тільки ті субстрати, що містять етанол. Оцтовокислі бактерії – грамнегативні, неспороносні, в основному рухливі палички, облігатні аероби. Кислотостійкі, деякі можуть розвиватися при рН=3.2. Зустрічаються в ґрунті, воді, на поверхні рослин.

Збудники оцтовокислого бродіння належать до 2 груп: р. *Acetobacter* і р. *Gluconobacter*.

Бактерії роду *Acetobacter* перетворюють етиловий спирт в оцтову кислоту. Реакція окиснення проходить у дві стадії: спочатку утворюється оцтовий альдегід, а потім оцтова кислота. Оцтовокислі бактерії р. *Acetobacter* можуть окиснювати оцтову кислоту до кінцевих продуктів – CO<sub>2</sub> і H<sub>2</sub>O (у циклі Кребса).

Основні представники р. *Acetobacter*: *Acetobacter acetis*, *Acetobacter pasteurianum*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter orleanense*.

У бактерій з роду *Gluconobacter* (*Gluconobacter suboxydans*), через відсутність циклу Кребса, оцтова кислота є кінцевим продуктом, який накопичується в середовищі культивування.

У промисловості використовують *Acetobacter acetis*, який вирощують у вигляді біоплівки на поверхні тирси або букової стружки. Біомаса оцтовокислих бактерій може накопичуватися в середовищі у вигляді біоплівки, яка використовується в медицині. Такі біоплівки на стружці називаються біофільмами й застосовуються при лікуванні опіків.

Оцтовокислі бактерії можуть завдавати значної шкоди, потрапляючи до продуктів харчування і призводячи до їх псування. Вони є небажаними у спиртовому, пивоварному, дріжджовому, хлібопекарському виробництвах.

**Лимоннокисле бродіння.** Окиснення глюкози грибами до лимонної кислоти дістало назву лимоннокислого бродіння. За біохімічним механізмом є також неповним окисненням цукрів, що відбувається в аеробних умовах.

Лимонна кислота широко поширена в природі (лимони, апельсини, журавлина, шипшина). Раніше її одержували з лимонів – 9 % (с.р.). Найбільш раціональний спосіб одержання лимонної кислоти із глюкози за допомогою цвілевого гриба *Aspergillus niger*.

Субстрат: сахароза, глюкоза, уводять азот і фосфор. Міцелій аерофільний, тому середовище культивування *Aspergillus niger* аерується. При 10% CO<sub>2</sub> у повітрі ріст грибів пригнічується. Оптимальна температура культивування 34-37 °С.

У виробництві лимонної кислоти застосовують два способи культивування: *глибинний* і *поверхневий*. Культуру вирощують у спеціальних кюветах на середовищах із

високою концентрацією цукру (до 20%) і слабкою аерацією стерильним повітрям. Засівають спорами 350–400 тис. на 1м<sup>2</sup>. При 32°C бродіння проходить 14–15 доби. 1м<sup>2</sup> субстрату дає 500–600 г лимонної кислоти.

Мицелій *Aspergillus niger* росте на поверхні живильного середовища у вигляді щільної товстої плівки. Конідії гриба, що утворилися, збирають спеціальним вакуумним насосом, концентрують і спресовують для подальшого застосування в промисловості. Термін зберігання 1-2 роки й більше.

Для виділення лимонної кислоти в чистому виді зброжений субстрат піддають багаторазовому очищенню. Крім лимонної кислоти утворюється близько 3% глютамінової й 1% щавлевої кислот.

### **Бродіння змішаного типу (мурашинокисле й бутандіолове бродіння)**

Бактерії кишкової групи *Enterobacteriaceae* здійснюють змішане мурашинокисле й бутандіолове (2, 3-бутандіол) бродіння, при якому утворюються ряд органічних кислот (мурашина, оцтова, молочна, бурштинова), спирти, CO<sub>2</sub> і H<sub>2</sub>.

Збудниками цього бродіння є *E.coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Aerobacter aerogenes*, збудники дизентерії (*Shigella dysenteriae*), збудник черевного тифу (*Salmonella typhimurium*) і ін.

Ентеробактерії – грамнегативні, неспороносні, рухливі палички, факультативні анаероби: при доступі повітря в них відбувається анаеробне дихання, а в анаеробних умовах вони здійснюють бродіння. Бродіння одержало назву мурашинокислового, тому що характерним, хоча й не головним продуктом бродіння, є мурашина кислота. Оскільки виділяються й інші продукти, таке бродіння ще називають *бродінням змішаного типу*.

При бродінні змішаного типу гексози розщеплюються гліколітичним шляхом (за рідкісним винятком за пентозофосфатним шляхом). Катаболізм глюкози йде шляхом Ентнера-Дудорова.

Залежно від кінцевих продуктів розрізняють 2 типи бродіння:

1). Бродіння характерне для родів *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*. При цьому бродінні утворюються в основному кислоти (мурашина, оцтова, молочна, бурштинова), спирти, CO<sub>2</sub> і H<sub>2</sub> і не утворюється 2, 3-бутандіол.

2). Бродіння характерне для бактерій родів *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*. При цьому бродіння утворюється етанол і CO<sub>2</sub>, крім того, основним продуктом є 2,3-бутандіол.

**Анаеробне розкладання білків.** Розщеплення білків до пептидів здійснюють ферменти протеази. Розщеплення пептидів до амінокислот – пептидази.

Шляхи розщеплення:

1. дезамінування;
2. декарбоксілювання.

Далі відбувається розщеплення до CO<sub>2</sub> і органічних кислот, аміаку, сульфатів, H<sub>2</sub>S і H<sub>2</sub>O. З органічних сполук: меркаптани, індол, скатол – мають неприємний запах.

### **Спряжене зброжування двох амінокислот (реакція Стикленда)**

Пептидолітичні клостридії здатні гідролізу білків до амінокислот, які потім використовують у своєму метаболізмі. Багато амінокислот можуть зброжуватись тільки сумісно з іншими амінокислотами. Як установив Стикленд (1934 р.), *Cl. sporogenes* швидко зброжують суміш аланіну й гліцину, проте не здатні використовувати жодну з цих амінокислот окремо. Наприклад, аланін є донором водню, а гліцин – акцептором.



Джерелом енергії слугує спряжена реакція окиснювання-відновлення.

Донорами є амінокислоти: лейцин, валін, гліцин, метіонін, ізолейцин. Акцепторами: аргінін, триптофан, пролін.