

ЛЕКЦІЯ №6

Бродіння

Ферменти грають вирішальну роль у всіх реакціях. Склад ферментів визначає геном клітини і є відносно постійним.

По місцю знаходження розрізняють:

Екзоферменти – ферменти, що виділяються в навколишнє середовище. Приклад: гідролази – руйнують крупні молекули субстрату і грають виключно важливу роль в живленні прокаріотів.

Ендоферменти – ферменти всередині клітини.

За часом утворення всі ферменти можна розділити на дві групи:

Конститутивні – їх синтез йде з постійною швидкістю незалежно від речовини субстрату; у клітині вони знаходяться в більш менш постійній концентрації. Приклад: гліколітичні ферменти – обслуговують гліколіз.

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

Алостеричні ферменти – чуйно (тонко) реагують на концентрацію кінцевих продуктів метаболізму.

Бродіння – еволюційно найбільш стародавній і примітивний спосіб отримання енергії.

Основні типи бродінь – спиртне, молочнокисле, маслянокисле – відкриті Пастером до 1861 року.

Процес бродіння протікає в анаеробних умовах без участі O_2 , за рахунок окислювально-відновних перетворень органічних сполук субстрату і супроводжується виділенням енергії. Бродіння 1 молекули глюкози – $2ATP \rightarrow$ молочна кислота $196,6 \text{ кДж/моль}$. Окислення 1 молекули глюкози – $38ATP \rightarrow CO_2 + H_2O$ $2870,2 \text{ кДж/моль}$

Існує три шляхи перетворення глюкози до піровиноградної кислоти. Найпоширеніший серед бактерій (цей же шлях зброджування) – гліколіз – Ембдена-Мейєргофа-Парнаса. Другий – характерний тільки для деяких бактерій – Ентнера-Дудорова. Третій – пентозофосфатний шлях – характерний також для багатьох бактерій.

Приклад: Гліколіз – 11 продуктів, 10 з них – це продукти шляху молочнокислого бродіння.

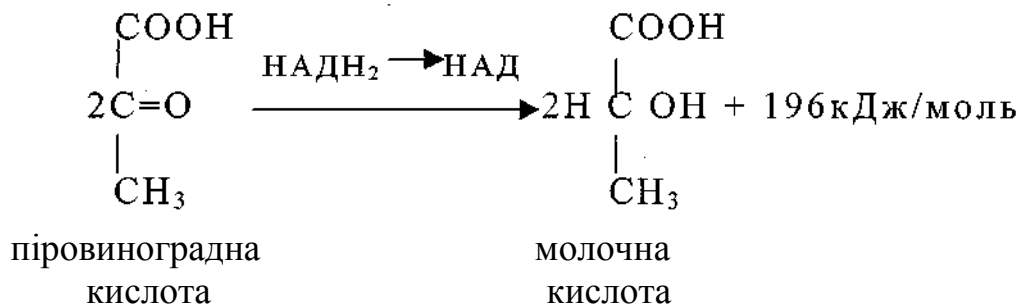
Початкові продукти: моносахариди, дисахариди.

Молочнокисле бродіння

Еволюційно молочнокисле бродіння вважається одним з найстародавніших і найпримітивніших типів бродіння.

По характеру самого бродіння і кінцевим продуктам розрізняють: гомоферментативне і гетероферментативне молочнокисле бродіння.

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



Зброджують тільки моно- і дицукри (глюкозу, лактозу).

Зброджують до 98% цукру, що знаходяться в середовищі, до молочної кислоти.

Морфологічно вони представлені коками *Streptococcus* і *Pediococcus*, і паличкоподібними *Lactobacillus*.

Приклади: *Streptococcus lactis*

faecalis

thermophilus

Lactobacillus lactis (40°C)

bulgaricus

Lactobacillus casei (30–37°C)

plantarum

Гетероферментативне – в основі його лежить пентозофосфатний шлях, і кінцевими продуктами є: молочна кислота, оцтова кислота, етиловий спирт, гліцерин і вуглекислий газ.

При зброджуванні глюкози по цьому шляху утворюються: молочна кислота, етанол, вуглекислий газ;

при зброджуванні фруктози – молочна і оцтова кислоти, вуглекислий газ, маніт.

Можуть зброджувати пентози і глюконову кислоту.

Приклад: Облігатні гетероферментативні бактерії позбавлені ключових ферментів гліколітичного шляху – альдолази і тріозофосфатізомерази.

Приклади: р. *Leuconostoc*

р. *Bifidobacterium*

р. *Lactobacillus*.

Є бактерії, які можуть здійснювати як гомо-, так і гетеро ферментативне бродіння, зброджуючи гексози по гліколітичному шляху, а пентози по пентозофосфатному.

Бродіння, яке відбувається завдяки *Bifidobacterium bifidum* – гетероферментативна, отримала таку назву за Y, V-форму (*bifidum* – роздвоєний), переважає в кишечнику грудних дітей, що вигодовуються груддю. Це розповсюдження походить з відношення до потреби у вуглеводах, N-ацетилглюкозаміні, який міститься тільки в молоці людини.

Всі вони строгі анаероби, не переносять присутності кисню і для їх зростання потрібна атмосфера, що містить 10% вуглекислого газу. Були виявлені і в кишечнику дорослих людей, і в мулі.

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

Розповсюдження молочнокислих бактерій.

У природі їх розповсюдження визначається їх складними потребами в живильних речовинах і способом отримання енергії – тільки бродіння. Ці бактерії майже ніколи не зустрічаються в ґрунті і водоймищах.

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

2. на рослинах і рослинних залишках, що розкладаються: *L. plantarum*, *L. brevis*, *Str. lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*;

3. у кишечнику і слизистих оболонках людини і тварин: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*, *Str. faecalis*, *Str. pyogenes*, *Str. pneumoniae*.

Багато стрептококів живуть на слизових оболонках рота, дихальних і сечових шляхів, статевих органів. Проте, серед них є паразити крові і дуже небезпечні збудники.

Str. faecalis – звичайний мешканець кишечника;

Str. bovis – травний тракт жуйних.

Через те, що молочнокислі бактерії утворюють дуже багато молочної кислоти, вони самі до неї дуже стійкі і можуть швидко витіснити інші бактерії. Тому їх легко культивувати на елективних середовищах і легко виділяти. Природні накопичувальні середовища – молоко, кисле тісто, кисла капуста, силос.

Потреба в чинниках росту.

Характерна ознака молочнокислих бактерій – потреба в ростових чинниках. Жоден з представників цієї групи не може рости на середовищі з глюкозою і солями амонія. Більшість має потребу у ряді вітамінів (тіамін, біотин, пантотеновій, нікотиновій, фолієвій кислотах) і амінокислот, а також пуринах та піримідинах.

Культивують ці бактерії на складних середовищах, що містять велику кількість дріжджового екстракту, томатного соку, молочної сироватки і навіть крові. Виявилось, що при зростанні на середовищах з кров'ю у молочнокислих бактерій утворюються цитохроми і вони здатні здійснювати фосфорилування в дихальному ланцюзі.

Таким чином, молочнокислі бактерії не здатні синтезувати багато метаболитов – «інваліди». З іншого боку більшість з них здатні використовувати лактозу. Цим вони близькі до кишкової палички. Це як пристосування до середовища.

Багато молочнокислих бактерій здатні синтезувати речовини, що володіють антибіотичними властивостями (лактолін, бревін, низін, диплококцин). На цьому заснована їх дія антагоністів на гнильні і хвороботворні бактерії в кишечнику людини.

Живуть при різних температурах: 40–42°C, 25–30°C. pH=7, але можуть і при pH=5–5,8. Як буфер застосовують CaCO₃.

Отримання кисломолочних продуктів

1. Молочнокислі продукти, отримані в результаті чистого молочнокислого бродіння, – це кисляк.

Їх готують шляхом спонтанного скисання молока за рахунок присутності в молоці бактерій, або шляхом внесення заквасок у вигляді чистих культур: *Lactobacillus bulgaricum*

Lactobacillus acidophilum

Pediococcus cerevisiae – скисання сливков і отримання масла (+ ацетон і диацил – гарний запах).

2. Продукти, отримані в результаті змішаного бродіння, – спиртного і молочного.

Таким шляхом отримують кефір і кумис. Кефір готують на «кефірних грибках», основу яких складають нитчаста бактерія і *Str. lactis*, дріжджі, оцтовокислі бактерії. Залежно від ступеня дозрівання розрізняють:

слабкий – 1 день;

середній – 2 день;

міцний – 3 день.

Незалежно від дня він повинен мати молочнокислий смак.

Для отримання кефіру з вираженим спиртним бродінням квашення ведуть при температурі 16–20 °C, а не при 22–28 °C (молочнокисле).

Кумис – готують з кобилячого молока (в ньому 6% цукру). В ньому енергійно йде спиртне бродіння. Основна культура – типу болгарської палички.

Отримання сичужних сирів

Виробництво сирів складається з двох етапів:

1. звурджування білків молока (коагуляція), які утворюють твердий осад, з якого видаляється рідина;
2. дозрівання сирів – дуже складний ферментативний процес, в якому беруть участь безліч мікроорганізмів.

У молодому сирі весь азот входить до складу нерозчинного білка, але у міру дозрівання сиру білок розщеплюється на розчинні пептиди і амінокислоти, жирні кислоти, аміак.

Приклад: У швейцарському сирі у розчинні продукти входить 20–30% білка, в латвійському – практично весь.

Йде також гідроліз жирів, перетворення молочної кислоти в пропіонову.

Для виробництва молочної кислоти в промисловості використовують глюкозу, сахарозу, лактозу, а також мелясу – відходи цукрової промисловості. Для зброджування молочної сироватки можна користуватися чистою культурою *L. bulgaricum*, мелясу – краще *L. delbrukii*.

Пропіоновокисле бродіння

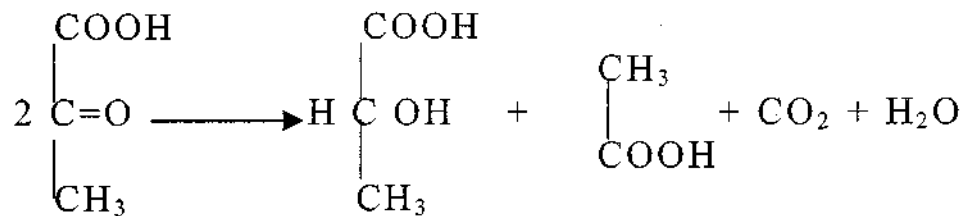
Пропіоновокислі бактерії (*Propionibacterium freudenreichii*) – грам-позитивні, нерухомі, не утворюють спор, для них характерне бінарне дроблення. Це факультативні анаероби, що виділяють каталазу. По морфології схожі з коринобактеріями. Розташовуються парами, ланцюжками. Часто зустрічаються разом з молочнокислими бактеріями, які можуть стимулювати та інгібувати їх розвиток.

Клітини булавоподібної та конусної форми, коковидні, розгалужені у вигляді V або Y, або у вигляді китайських ієрогліфів.

Аеротолерантні анаероби, або факультативні аероби. Мешкають в кишковому тракті жуйних, в рослинах.

Середовище: для росту вимагають середовище з білками і амінокислотами, але можуть розвиватися і на простих джерелах азоту (амонія) у присутності вітамінів (біотин, пантотенової кислоти). Температура 30–37°C, оптимальна рН=7.

Зброджування глюкози йде по гліколітичному шляху до піровиноградної кислоти. Потім залежно від умов утворюються пропіонова, оцтова, янтарна, молочна кислоти і вуглекислий газ.



Піровиноградна кислота → ЩОК → яблучна → фумарова →
 → янтарна → пропіонова кислота.

Пропіонові бактерії використовують в промисловості для отримання вітаміну B₁₂, який вони утворюють у великих кількостях.

Спиртове бродіння.

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

Збудники: дріжджі: *Saccharomyces cerevisiae*
globosus
vini

гриби (деякі): *Mucor*
Fusarium
Oidium

бактерії: *Sarcina ventriculi*
 деякі *Clostridium*

Ефект Пастера: при проникненні в середовище кисню, дріжджі, які виконували процес бродіння, переходять на аеробне дихання, коефіцієнт використання субстрату збільшується і ріст біомаси зростає. Це використовують при вирощуванні пекарських дріжджів (середовище піддають аерації). Навпаки, при отриманні спирту процес ведеться в анаеробних умовах.

Зброджування цукрі до етилового спирту відбувається по шляху Емдема-Мейергофа-Парнаса.

Джерела вуглеводів для спиртового бродіння:

1. цукри;
2. гліцерин;
3. вуглеводні.

До азоту не вибагливі. Краще засвоюють азот з амонійних солей. Амінокислоти синтезують самі. Необхідні з'єднання фосфору, калій, натрій. Мікроелементи Cu, Co, Fe підвищують активність ферментів. Оптимальна рН слабо кисла, ОВП низький, температура 28–30 °С.

Середовище існування: ґрунт, поверхня рослин і т. ін.

Виробництво спирту: оптимальна концентрація цукру в середовищі 10–18%. Збільшення кислотності веде до отримання більшої кількості гліцерину (вторинний продукт). Зниження кислотності призводить до синтезу органічних кислот.

Виробництво вина.

Мікроорганізми зброджують глюкозу та фруктозу виноградного та плодово-ягідного соку з утворенням етилового спирту та вуглекислого газу. У виноградному соку 10–25% цукру.

У виноградному суслі повністю змінюється мікрофлора, в кінці – залишаються тільки дріжджі.

Останнім часом використовують лише чисті культури дріжджів, знищуючи мікроорганізми SO_2 .

Спиртове бродіння може бути завершеним та незавершеним. В залежності від цього вина діляться на два види:

1. Вина з завершеним бродінням (сухі), коли цукор зброджен «насухо» і в середовищі його не більше 0,1%.

2. Вина з перерваним спиртовим бродінням. Це досягається додаванням бісульфіту натрію або спирту.

Сушло – не забарвлене – з нього виготовлюють біле вино. Якщо сушло бродить в присутності шкірки, то утворюється червоне вино.

Молоде вино освітлюють і дають йому дозріти (місяці, роки).

Гристі вина (шампанське) – піддають повторному бродінню, додаючи цукор (під тиском) в закритий посуд, де відбувається насичення розчину вуглекислим газом.

Херес – отримують шляхом додавання до вина 15% спирту та витримують його на повітрі. На поверхні розвиваються плівчасті дріжджі, які надають вину специфічний смак.

Виробництво пива.

Пиво готують із злаків, в яких не має цукрів (ячмінь, рис, кукурудза). В них є крохмаль і його гідролізують до мальтози та глюкози.

Оцукрення здійснюють через пророщування – амілази розщеплюють крохмаль.

Зерна, які проросли не мають цукру, їх розмелюють та змішують з водою – це гідролізує крохмаль. Екстракт видаляють, кип'ятять з хмелем, що забезпечує специфічний запах та зберігання, так як стійкість дають ефірні масла із хмелю.

Раши пивних дріжджів:

а) верхові (міцне пиво) – 20 °С.

б) низові (слабке пиво) – 15 °С.