

ЛЕКЦІЯ №7

Бродіння (продовження)

Характеристика роду *Clostridium*

Анаероби роду *Clostridium* відкриті Пастером в 1861 році. Всі *Clostridium* відносять до родини *Bacillaceae*. Рід *Clostridium* – 60 видів (перітрихії). Грам-позитивні, облігатні анаероби, хемоорганогетеротрофи. Зброджують цукру, спирти, амінокислоти, органічні кислоти, пурини і піримідини. Ряд видів фіксує азот з атмосфери.

Середовище існування: ґрунт, водоймища, травний тракт тварин і людини.

Всі види об'єднані в групи залежно від їх здатності зброджувати ті або інші органічні сполуки.

1. Перша група.

Цукролітичні види – зброджують: крохмаль, пектин, розчинні вуглеводи з утворенням масляної і оцтової кислот, вуглекислого газу і водню. Деякі утворюють з цукрів бутанол, ацетон, етанол, ізопропіловий спирт. До цієї групи входять бактерії що викликають маслянокисле і ацетобутиловоє бродіння: *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. acetobutyricum*, *Cl. butylicum*. Палички 1–10 мкм. Рухомі на ранніх етапах розвитку. Потім втрачають джгутики і накопичують запасну речовину – гранульозу. Спори веретеноподібні або у формі барабанної палички.



Можливо, до цієї групи можна віднести частину *Clostridium*, що руйнують целюлозу з кінцевими продуктами: етиловий спирт, оцтова кислота, янтарна кислота.

2. Друга група.

Протеолітичні види. Зброджують амінокислоти, оскільки володіють сильними протеолітичними ферментами. Здібні до інтенсивного гідролізу білків з подальшим зброджуванням амінокислот.

Ріст в середовищах супроводжується утворенням аміаку, вуглекислого газу, водню, жирних кислот та інших летючих з'єднань, що мають неприємний запах.

До цієї групи відносять: *Cl. sporogenes*, *Cl. perfringens*, *Cl. histolyticum*, *Cl. botulinum*. Багато з цих видів можуть зброджувати і вуглеводи. Патогенні: *Cl. perfringens*, *Cl. septicum* – гангрена, *Cl. tetani* – правець (стовбняк [русс. столбняк]), *Cl. botulinum* (ґрунт) – ботулізм (ковбаса – botulus).

3. Третя група.

Зброджують циклічні з'єднання, що містять азот – пуріни, піримідини.

Cl. cylindrosporum зброджують пуріни до аміаку, оцтової кислоти і вуглекислого газу. Піримідини зброджують *Cl. uracilicum*, *Cl. oroticum*.

Урацил → β-аланін, CO₂, NH₃, а оротова кислота → оцтова кислота, CO₂, NH₃.

4. Четверта група.

Належить єдиний вигляд – *Cl. Kluyveri*, що зброджує суміш етилового спирту і оцтової кислоти з утворенням масляної і капронової кислот, а також невеликої кількості водню.

Маслянокисле бродіння

Cl. butyricum. Джерела вуглецю: моно- і дисахариди, деякі полісахариди (декстрин, крохмаль), молочна, піровиноградна кислоти, маніт, гліцерин та інші з'єднання.

На білкових середовищах без вуглеводів не ростуть. Джерела азоту – амінокислоти, NH₃, N₂.

Маслянокисле бродіння починається з трансформації гексоз по гліколітичному шляху до піровиноградної кислоти, а далі йде ланцюг реакцій, що каталізується декількома ферментами.

Cl. acetobutylicum – значно вимогливіші до середовища. Вони потребують готових амінокислот і вітамінів.

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 ацетобутилове бродіння. Якщо рН залишається в межах нейтрального – маслянокисле бродіння. Для підтримки нейтрального рН середовища в промисловості при отриманні масляної кислоти додають в середовище CaCO₃.

У промисловості широко використовують отримання ацетону і бутилового спирту з кукурудзяної муки або іншої крохмалистої сировини.

Ацетон застосовують як розчинник при отриманні шовку, шкіри, фотоплівок. Бутанол використовується у виробництві лаків.

Кисле і бутандіолове бродіння

Бактерії кишкової групи *Enterobacteriaceae* здійснюють змішане кисле і бутандіолове (2,3-бутиленгліколь) бродіння, при якому утворюються: ряд органічних кислот, спирти, CO_2 і H_2 .

Ентеробактерії – факультативні анаероби, рухомі, не утворюють спор.

E. coli – існує в ґрунті, воді, кишечнику людини і тварин.

Salmonella typhimurium – кишкова патогенна паличка. Збудник кишкових інфекцій і харчових отруєнь. Мешкає в ґрунті, воді.

Shigella sonnei – збудник кишкових інфекцій, дизентерія.

E. coli, *Salmonella typhimurium*, *Shigella* зброджують цукру з утворенням молочної, оцтової, янтарної, мурашиної кислот і CO_2 .

Enterobacter, *Erwinia*, *Serratia* – з утворенням CO_2 , етанолу, 2,3-бутандіола.

Лимоннокисле бродіння

По біохімічному механізму є неповним окисленням, що протікає в аеробних умовах.

Лимонна кислота широко поширена в природі (лимони, апельсини, журавлина, шипшина). Раніше її отримували з лимонів – 9% (сух. речовини). Найбільш раціональний спосіб отримання лимонної кислоти з глюкози за допомогою цвілевого гриба *Aspergillus niger*.

Субстрат: сахароза, глюкоза, вводять азот і фосфор. Міцелій аерофільний. Середовище аерується. При 10% CO_2 в повітрі рост припиняється. Температура 34–37 °С.

Два способи культивування: глибинний і поверхневий. Засівають спорами 350–400 тис. на 1мл. При 32 °С бродіння йде 14–15 діб. 1 м² субстрату дає 500–600 г лимонної кислоти.

У промисловості найчастіше гриби вирощують в спеціальних кюветах на середовищах з високою концентрацією цукру (до 20%) і слабкою аерацією стерильним повітрям. Росте на поверхні у вигляді щільної товстої плівки. Конідії створюють пухнастість білого кольору. Їх збирають спеціальним вакуумним насосом, концентрують і пресують для подальшого застосування в промисловості. Термін зберігання 1–2 роки і більше.

Для виділення лимонної кислоти в чистому вигляді, зброджуваний субстрат піддають багатократному очищенню. Окрім лимонної кислоти утворюється близько 3% глутамінової і 1% щавлевої кислот.

Оцтовокисле бродіння

Здійснюється оцтовокислими бактеріями роду *Acetobacter* і по своєму біохімічному механізму також є неповним окисленням. Оцтовокислі бактерії можуть розвиватися тільки в субстраті, в якому є етанол. Процес скисання вина це процес утворення оцтової кислоти в субстраті, який став аеробним.

У промисловості використовують *Acetobacter acetis*, який вирощують у вигляді біоплівки на поверхні деревної тирси або стружки. Найкращий носій – деревина буку.

Біомаса оцтовокислих бактерій може накопичуватися в середовищі у вигляді біоплівки і володіє рядом цінних якостей, які використовуються в медицині. Такі біоплівки на стружці називаються біофільмами і застосовуються при лікуванні опіків.

Анаеробне розкладання целюлози

Бактерії р. *Clostridium* мешкають в ґрунті, компостах, гної, річковому мулі, стічних водах. Вони стійкі до кислоти і живуть в кислих ґрунтах. Типовий представник, який розкладає целюлозу при температурі 30–40 °С, *Cl. omelianski* – відкритий в 1902 році Омелянським. Це паличка, 4–8 мкм, рухома, має товсті спори, схожа на барабанну паличку.

Розкладати целюлозу може і інший мікроорганізм – *Cl. cellobioparum* (мезофільний).

Є і термофіли: *Cl. thermocellum*, оптимальна температура 60 °С, максимальна, – 70 °С, при 40–45 °С росте погано. Добре ростуть на целюлозі і погано на цукрах.

У рубці жуйних є специфічні мікроорганізми, які руйнують целюлозу.

Від целюлози до глюкози: оцтова, пропіонова, масляна, мурашина, янтарна кислоти, CO₂ і H₂.

Коки і палички: *Ruminococcus albus*
Ruminobacter parvum
р. *Butyrovibrio*

Целюлоза – полімер з нерозгалуженим ланцюгом.

1 етап – целюлаза (фермент) – переводить целюлозу в дисахарид – целобіозу;

2 етап – β-глюкозидаза – переводить целобіозу в глюкозу.

Кінцеві продукти, що утворюються деякими культурами:

Cl. omelianski: етиловий спирт, оцтова кислота, молочна кислота, мурашина кислота, CO₂ і H₂.

Cl. cellobioparum: етиловий спирт, оцтова кислота, мурашина кислота, CO₂ і H₂.

Термофіли:

Cl. thermocellum: етиловий спирт, оцтова кислота, молочна кислота, мурашина кислота, CO₂ і H₂. CH₄ не утворюють.

Розкладення геміцелюлози

Геміцелюлози – входять до складу міжклітинної речовини рослинних тканин. Це гетерополіцукриди: складаються з пентоз (ксилози, арабінози) або гексоз (глюкози, манози, галактози).

Ксилан – полімер ксилози – другий після целюлози.

Розкладаються неспецифічними мікроорганізмами: *Bacillus*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Rhizopus*, *Streptomyces*.

Ферменти – гемицелюлази.

Розкладання лігніну

Лігнін – міжклітинний компонент деревини (складає 3–6% від сухої речовини, а деревина 15–30%). Не зустрічається у вільному вигляді. Молекулярна маса лігніну 1000–10000, не розчинний у воді і в органічних розчинниках.

Є тривимірним полімером фенольної природи. Дуже стійкий до дії мікроорганізмів. Розкладається дуже поволі. Окислюється до альдегідів.

Розкладають: гриби – *Fusarium lactis*

Pseudomonas (термофіли)

Clostridium

У ґрунті лігнін розкладається поволі до ваніліну. Є основою утворення гумусових речовин.

Розкладання пектинових речовин

Пектини – міжклітинні речовини рослинних тканин. Це поліцукриди – полігалактуроніди, що складаються з α-D-галактуронових кислот, сполучених 1,4-св'язями.

Є три види пектинів:

1. пропектин – водонерозчинна частина клітинної стінки;

2. пектин – водорозчинний полімер галактуронової кислоти з метилефірними зв'язками;

3. пектинова кислота – водорозчинний полімер галактуронової кислоти без метилефірних зв'язків.

Великою активністю в розкладанні пектинів володіють *Bacillus polymyxa*, *Clostridium pectinovorum*, гриби.

Ферменти: пектиназа, пектинестераза (гідролізує метилефірні зв'язки), пропектиназа.

Продукти розкладання пектинових речовин: ксилоза, арабіноза, галактоза, метиловий спирт, оцтова кислота, галактуронова кислота.

Бродіння пектину спостерігається при розмочуванні лубоволокнистих рослин – льону, конопель, джуту. Замочують в чанах при 32–38 °С протягом 3–5 діб.

Анаеробне розкладання білків

Розщеплювання білків до пептидів здійснюють ферменти протеази. Розщеплювання пептидів до амінокислот – пептидази.

Шляхи розщеплювання:

1. дезамінування;
2. декарбоксілювання.

Далі відбувається розщеплювання до CO_2 і органічних кислот, аміаку, сульфатів, H_2S і H_2O .

З органічних сполук: меркаптани, індол, скатол – володіють неприємним запахом.

Спряжене зброджування двох амінокислот (реакція Стікленда)

Пептидолітичені клостридії гідролізують білки і потім використовують амінокислоти.

Багато амінокислот зброджуються тільки разом з якими-небудь іншими. Як встановив Стікленд (1934р.), *Cl. sporogenes* швидко

зброджує суміш аланіну і гліцину, але не може використовувати ні ту, ні іншу з цих амінокислот окремо.

Приклад: аланін – донор водню
 / гліцин – акцептор

Ацетат + CO₂ + NH₃

Джерелом енергії служить спряжена реакція окислення-відновлення.

Донори: лейцин, валін, гліцин, метіонін, ізолейцин. Акцептори: аргінін, триптофан, пролін.

Розкладання хітину

Хітин – поліцукрид, який містить азот, полімер ацетилглюкозоаміну. Він міститься в зовнішньому скелеті безхребетних тварин, панцирних покривах комах, в клітинній стінці грибів.

Здатністю розкладати хітин володіють бактерії родів: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Nocardia*. Гриби: мукові, аспергіли.

Фермент – хітиназа.

Хітин за допомогою хітинази перетворюється на хітобіозу, яка розщеплюється хітобіазою до оцтової кислоти, аміаку і глюкози.