

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ГОРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

---

П.В. АЛБОРОВА

## МИКРОБНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

учебно-методическое пособие  
для лабораторных занятий  
для студентов факультета технологический  
менеджмент по направлению подготовки  
36.03.02 «Зоотехния»

Владикавказ, 2022

УДК 573.6 (07)  
ББК 28 я7  
Б 43

*Составитель:* **Алборова П.В.**

*Рецензент:* **П.З. Козаев**, ФГБОУ ВО ГГАУ, доцент кафедры земледелия, растениеводства, селекции и семеноводства, кандидат сельскохозяйственных наук.

**Алборова П.В.** Микробная биотехнология: учебно-методическое пособие для лабораторных занятий. П.В.Алборова /– Владикавказ: Издательство ФГБОУ ВО «Горский госагроуниверситет». 2022. – 48с.

Учебно-методическое пособие по микробной биотехнологии составлено в соответствии с действующей программой и содержит теоретический материал для лабораторных занятий. Каждая тема снабжена конкретными заданиями и вопросами для самоконтроля. Учебно-методическое пособие предназначено для студентов, обучающихся по направлению подготовки 36.03.02 «Зоотехния». Данное издание подготовлено по дисциплине «Микробная биотехнология» в соответствии с Федеральным государственным стандартом высшего образования по направлению подготовки 36.03.02 «Зоотехния» от 22 сентября 2017 г. № 972.

*Рекомендовано Центральным учебно-методическим советом ФГБОУ ВО Горский ГАУ в качестве учебно-методического пособия для лабораторных занятий по микробной биотехнологии 30 декабря 2022 г., протокол №4.*

---

## ВВЕДЕНИЕ

Микробная биотехнология – одна из ведущих естественных наук, определяющая фундамент знаний специалистов сельского хозяйства, приобретающая на современном этапе научно-технического прогресса все большее значение. Она изучает промышленное получение веществ с помощью микроорганизмов.

Микробная биотехнология является в настоящее время одним из приоритетных направлений науки, с которым связывают благосостояние всего человечества в обозримом будущем. Однако, достижения биотехнологии становятся реальной помощью народному хозяйству и отдельным людям лишь тогда, когда на их основе создаются промышленные производства, функционирование которых направлено на разработку практически ценных продуктов.

Решение таких проблем, как нехватка питания и дефицит белка в животноводстве, будет найдено с помощью биотехнологии за счет снижения стоимости производства аминокислот – необходимого компонента корма домашних животных, благодаря разработке методов получения белка одноклеточных (кормового белка), переработкой парафинов или другого доступного сырья (целлюлозы, агропромышленных или сельскохозяйственных отходов, сточных вод).

С помощью современной биотехнологии в настоящее время получают такие пищевые продукты, как пиво, вино, спирт, хлеб, уксус, кисломолочные продукты, сырокопченые и сыровяленые мясные продукты и многие другие. Кроме того, пищевая биотехнология используется для получения веществ и соединений, используемых в пищевой промышленности: это лимонная, молочная и другие органические кислоты; ферментные препараты различного действия – протеолитические, амилолитические, целлюлолитические; аминокислоты и другие пищевые и биологически активные добавки.

Современные специалисты, работающие в сельском хозяйстве, в сфере АПК и других отраслях народного хозяйства должны в совершенстве владеть методами биотехнологии и биоинженерии, уметь использовать их для увеличения производства сельскохозяйственной

продукции, улучшения ее качества, защиты природы от загрязнения и повышения устойчивости всего агропромышленного производства.

Цель методического пособия – ознакомить студентов факультета технологического менеджмента по направлению 36.03.02 - Зоотехния с наиболее важными вопросами современной биотехнологии, выработать у них научный подход к экспериментам в области сельскохозяйственной биотехнологии, научить их сопоставлять биотехнологические процессы, моделируемые в лабораторных условиях с теми, которые используются в промышленности.

## ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 1.

### Технология приготовления питательных сред для культивирования микроорганизмов

Цели занятия: познакомиться с методами приготовления питательных сред на примере МПА.

**Материалы и оборудование:** стерильные чашки Петри, стеклографы, теххимические весы с разновесами, плитка, дистиллированная вода, стеклянные палочки, сушильный шкаф, термостат, химический стакан, полусинтетический МПА.

Микроорганизмы способны ассимилировать любые органические соединения. Однако каждый конкретный вид микроорганизмов, используемый в биотехнологии, весьма избирателен к питательным веществам.

Традиционным сырьем микробного синтеза является углеродсодержащее сырье: глюкоза, сахароза, лактоза, гидрол, крахмал, уксусная кислота, спирты, n-алканы, некоторые фракции нефти, каменный уголь, природный газ и другие. Многие побочные продукты производства являются сырьем для биотехнологической промышленности (сульфитные щелока, смеси карбоновых кислот, меласса, зерновая и картофельная барда, соапсток, солодовое сусло, молочная сыворотка, депротеинизированный сок растений и картофеля, гидролизат древесных отходов, упаренный гидролизат торфа, пшеничные отруби).

Минеральным сырьем служат азотсодержащие соли:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ , соли фосфорной кислоты, другие минеральные макроэлементы, а также микроэлементы. Естественно, что для роста биомассы необходимы кислород и вода. Кроме того, культивирование микроорганизмов окажется успешным, если в питательной среде будут находиться витамины, аминокислоты, цитокинины и другие биологически активные вещества.

Подсчитано, что в микробиологической промышленности основная доля сырья (более 90%) расходуется на производство этанола. Производство хлебопекарных дрожжей требует 5% сырья, антибио-

тики – 1,7%, органические кислоты и аминокислоты – 1,65%. На сырье в биотехнологических производствах затрачивается 40-50% общей стоимости продукции.

#### *Обычные среды.*

К обычным относятся среды, применяемые для выращивания большинства микроорганизмов – мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар и др.

*Приготовление мясной воды.* Свежее говяжье или конское мясо освобождают от костей, сухожилий, жира и фасций, измельчают в мясорубке или нарезают ножом мелкими кусочками. Навеску измельченного мяса (50 г) заливают двумя объемами дистиллированной или водопроводной воды и оставляют для экстрагирования в холодильнике при температуре +4...+6 °С на 18-24 часа или помещают в термостат с температурой 37 °С на 2 часа. Настой кипятят до просветления (5-7 мин), охлаждают при комнатной температуре и фильтруют через ватный или бумажный фильтр. Фильтрат измеряют и доливают до первоначального объема дистиллированной водой, разливают по флаконам, стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С (1 атм.) в течение 30-40 мин. и используют по назначению.

Правильно приготовленная мясная вода представляет слабокислую (рН 6,2), прозрачную, соломенно-желтоватую жидкость, не содержащую белков. В ней присутствует небольшое количество аминокислот, солей, углеводов, факторов роста и экстрактивных веществ.

*Приготовление мясо-пептонного бульона (МПБ).* К приготовленной мясной воде (100 мл) прибавляют 1 % пептона и 0,5 % хлористого натрия, кипятят 1-2 мин. при помешивании, затем охлаждают и определяют рН. Добавлением щелочи (1 н раствора гидроксида натрия) или кислоты (1 н раствор соляной кислоты) устанавливают рН 12.

Среды 7,4-7,6. Для стабилизации рН рекомендуется к бульону добавлять фосфатные буферные смеси. Кипятят 30-45 мин. для выпадения осадка, затем охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр и доливают водой до первоначального объема. Проверяют и доводят рН до 7,4-7,6, разливают по пробиркам, флаконам и

стерилизуют в автоклаве при 120 °С (1 атм.) в течение 15-20 мин. Такой мясо-пептонный бульон пригоден для выращивания большинства бактерий. Из него легко приготовить ряд сред специального назначения.

*Приготовление мясо-пептонного агара (МПА).* К приготовленному мясо-пептонному бульону добавляют 2-3% мелко нарезанного хорошо промытого агара. Смесь кипятят или прогревают в автоклаве до полного растворения агара. Охлаждают до 50 °С и для просветления добавляют белок куриного яйца, тщательно взбитого в двойном количестве холодной воды (белок одного яйца на 1 л среды). Среду прогревают в автоклаве при 0,5 атм. в течение 45 мин. Белок адсорбирует взвешенные в среде частицы, свертывается при высокой температуре и оседает хлопьями на дно.

Агар фильтруют через слой ваты или фильтровальной бумаги в горячем автоклаве или в специальной металлической воронке с подогревом. Проверяют и корректируют рН. Разливают через стеклянную воронку с резинкой и зажимом в пробирки, флаконы, колбы и т.д., следя за тем, чтобы не смочить их края. Стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С (1 атм.) в течение 15-20 мин. Пробирки с горячим жидким агаром извлекают из автоклава и раскладывают на столе в наклонном положении. Агар растекается по стенке пробирки и при застывании получается «скошенным». Для получения агара «столбиком» пробирки охлаждают в вертикальном положении.

Мясо-пептонный агар является основной плотной средой и служит для получения изолированных колоний микроорганизмов на питательной среде. Он употребляется в виде «простого» агара или после прибавления к нему питательных веществ и индикаторов в виде сложных дифференциально-диагностических или так называемых элективных сред.

#### *Специальные среды.*

Специальные среды применяют для выделения и культивирования определенных групп или видов микроорганизмов. Например, среда Омелянского используется для выделения возбудителей анаэробного разложения клетчатки, среда Чапека – для культивирования грибов и т.д.

### *Дифференциально-диагностические среды.*

Дифференциально-диагностические среды применяют для изучения биохимических свойств и для выделения чистых культур некоторых микроорганизмов. Они позволяют выявить выделяемые микробами энзимы, одни из которых расщепляют в различной степени белки и углеводы, а другие вызывают реакции окисления и восстановления. Сюда относятся жидкие среды с углеводами Гиса, плотные среды с индикаторами Эндо, Левина, Плоскирева и другие.

Также используются среды Гиса, Эндо и Левина.

### **Контрольные вопросы**

1. Для каких целей нужны питательные среды?
2. Что в составе углеродного и минерального сырья?
3. Какие среды относятся к обычным, а что к специальным средам?
4. Что значит дифференциально-диагностические среды?

## **ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 2.**

### **Подготовка биореактора к посеву и технология культивирования микроорганизмов**

**Цель занятия:** изучить схему биореактора и технологии культивирования микроорганизмов.

**Приборы и материалы:** методические указания, плакаты, биореактор.

Современные биореакторы изготавливаются из нержавеющей стали и представляют собой довольно сложный аппарат, в который осуществляют закачку соответствующей для культивируемого микроба питательной среды.

Реактор имеет рубашку для нагревания паром и охлаждения водой с соответствующей запорной фурнитурой. Внутри реактора имеется турбинная механическая или электромагнитная мешалка со скоростью 150-200 об/мин и трубка для подачи воздуха. На крышке реактора имеются отверстия для подающей и отводящей трубок, смотровое окно, окно для освещения и отверстие для вставления четырёх сифонов, служащих для внесения посевного материала, взятия проб, внесения пеногасителя, глюкозы и других питательных веществ, а при необходимости и факторов роста. Современные реакторы оснащены различными измерительными приборами.

Регулирование температуры осуществляется автоматически. Регистрация её, а также измерения рН, осуществляется с помощью электронного потенциометра.

При первичной установке реакторов в цехах и при их последующей эксплуатации важной инженерно-технической проблемой является технологическая обвязка биореакторов трубопроводами. К комплексу наиболее важных проблем технологической обвязки относятся:

1. Стерилизация внутренней полости реактора текучим паром.
2. Подача стерильного воздуха во внутреннюю полость реактора при культивировании, либо при удалении готового продукта из неё на последующую обработку.

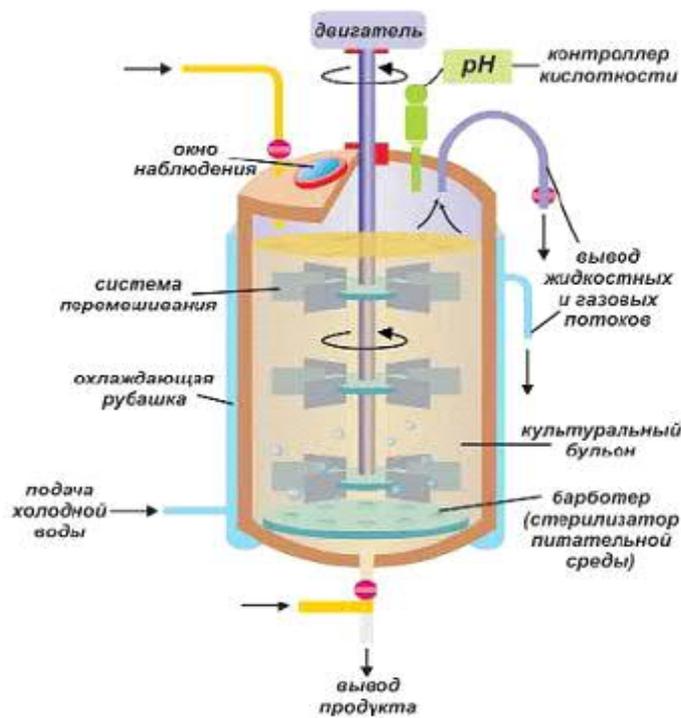


Рисунок - Схема биореактора (ферментера)

Решение этих проблем позволяет получать более стабильные результаты по стерильности и накоплению микробной массы при реакторном способе культивирования микроорганизмов.

*Промышленное культивирование микроорганизмов с применением активной аэрации.*

Процесс осуществляют в реакторах объёмом от 0,01 до 100 м<sup>3</sup>, как правило, в асептических условиях. Пустой аппарат тщательно моют, проверяют герметичность стерильность и стерилизуют острым паром. Одновременно стерилизуют все коммуникации. Затем в реактор подают простерилизованную в УНСи охлажденную до 25-35°С питательную среду, вносят посевной материал в количестве 5-10% объёма питательной среды (0,2-0,4 млрд. живых микробных клеток в 1 мл по оптической концентрации), включают систему аэрации и

перемешивающее устройство. Так, например, для листерий и сальмонелл скорость вращения механической мешалки составляет 150-180 об/мин, а культура микробов аэрируется подогретым до 37°С очищенным, стерильным воздухом с коэффициентом подачи 1,5 л воздуха на 1 л среды в одну минуту. Коэффициент заполнения реактора обычно 0,5-0,8.

Превышение этой величины может привести к значительному уносу пены с отходящим воздухом и нарушению асептических условий.

Температуру культивирования поддерживают путём подачи охлаждающей воды в рубашку и другие теплообменные устройства аппарата.

Оптимальная температура для разных микроорганизмов различна, обычно от 25 до 37°С.

Для регулирования pH культуральной жидкости в ходе культивирования добавляют соответствующие титрующие агенты (щёлочи, кислоты, раствор аммиака и др.). Продолжительность выращивания микроорганизмов в культиваторе 18-24 ч, спорообразующих - 40-48 ч и 200-250 ч - для актиномицетов и микроскопических грибов.

Процесс культивирования контролируют по показателям приборов - изменение температуры, pH, расход воздуха, частота вращения мешалки, а также путём периодического отбора проб (через 1-12 ч в зависимости от длительности процесса).

В отобранных пробах определяют содержание углеводов, общего и аммонийного азота, фосфора, биомассы, целевого продукта метаболизма, морфологию микробных клеток, наличие посторонней микрофлоры.

*Технология культивирования микроорганизмов в покоящемся состоянии без аэрации.*

Некоторые микроорганизмы относятся к группе микроаэрофильных (возбудители бруцеллёза, лептоспироза, кампилобактериоза и др.), которые не требуют принудительной аэрации питательной среды, в которой они выращиваются.

Применяют баллонный и реакторный способы культивирования.

Баллонный способ, в частности для культивирования лептоспир, заключается в том, что микробные культуры лептоспир каждого серологического варианта выращиваются в 16-литровых стеклянных баллонах с 10-12 л сывороточной или альбуминно-сывороточной (произ-

водственной) средами при температуре 27-28°C в течение 5-7 суток.

При реакторном способе культивирование проводят в ферментерах, которые могут быть объединены в единую технологическую цепочку.

*Технология промышленного культивирования анаэробных микроорганизмов.*

К анаэробным микроорганизмам относятся такие, которые способны жить и размножаться при отсутствии атмосферного кислорода.

В силу биологических особенностей анаэробов методы культивирования их в промышленности имеют свои особенности.

1. При культивировании анаэробных микроорганизмов нужно в реакторах создать условия полного вытеснения из питательной среды свободного кислорода. Это достигается путём заполнения анаэро(бо)статов газовой смесью водорода и двуокиси углерода, а остаточный кислород может быть удалён путём каталитического связывания с воздухом.

Анаэробные условия могут быть достигнуты также добавлением в среду восстанавливающих агентов, таких как цистина и сульфида натрия, аскорбиновой кислоты.

2. Степень анаэробноза определяется окислительно-восстановительным потенциалом (Eh). Для этих целей в среду вводят окислительно-восстановительные индикаторы, чаще всего используют резазурин (диазорезоурин) -  $10^{-4}$  г л<sup>-1</sup>, меняющий цвет от сине-розового до бесцветного. Бесцветное состояние достигается при Eh около 100 мВ и указывает на наличие анаэробных условий.

3. При культивировании анаэробов необходимо постоянно корректировать рН среды, поддерживая её в пределах 7,2-7,8. В процессе роста анаэробов рН среды очень быстро снижается в кислую сторону, что приводит к ингибированию их роста.

*Периодические и хемостатные системы культивирования микроорганизмов.*

При глубинном выращивании микроорганизмов их культуры могут находиться в периодических, или «закрытых», и хемостатных (непрерывных) – «открытых» системах.

Закрытой называют такую систему (культуру), когда хотя бы один из компонентов питательной среды или она вся не может ни посту-

пать в систему, ни покидать её. В такой системе скорость роста микроорганизмов должна после ускорения стремиться к нулю из-за недостатка субстрата или из-за гибели микробных клеток вследствие накопления продуктов метаболизма. Следовательно, периодические культуры микроорганизмов находятся в неустойчивом состоянии.

Открытая (хемостатная) система – это система, когда все питательные компоненты могут поступать в реактор, в котором выращивается тот или иной микроорганизм, и удаляться из реактора в виде продуктов синтеза микроорганизмов (антибиотики, витамины, ферменты и т.д.) или биомасса самих микроорганизмов. При этом скорость поступления питательной среды в реактор и удаление из него продуктов синтеза или биомассы можно регулировать в нужной нам среде размножения микроорганизмов.

*Периодическое культивирование микроорганизмов*

В периодическом состоянии динамика роста и размножения микроорганизмов в жидкой питательной среде обладает рядом особенностей, общих для бактерий, актиномицетов, микроскопических грибов, микоплазм и других про- и эукариот. При индивидуальном развитии им свойственна высокая скорость размножения. Развитие происходит в виде последовательных фаз, характер и продолжительность которых зависят от физиологического состояния клеток, определяемого в свою очередь условиями разнообразных факторов среды, в которой развиваются популяция того или иного организма.

Другими словами, фазы роста микроорганизма отражают количественные и качественные изменения в их биомассе и окружающей среде.

### **Контрольные вопросы**

1. Принцип работы биореактора.
2. Культивирование микроорганизмов с применением активной аэрации.
3. Культивирование микроорганизмов в покоящемся состоянии без аэрации.
4. Технология промышленного культивирования анаэробных микроорганизмов.
5. Что означает открытая (хемостатная) и закрытая система выращивания микроорганизмов?

### ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 3.

#### Биотехнология в получении пищевых компонентов микробного происхождения.

**Цель занятия:** получить представление о биотехнологическом синтезе органических кислот, аминокислот, витаминов, полисахаридов, ароматизаторов.

**Приборы и материалы:** методические указания, плакаты.

В современной пищевой промышленности все более значительную роль играет микробиологический синтез, особенно в промышленном производстве отдельных пищевых ингредиентов, которые во многих странах мира активно применяются для создания полноценных рецептов. Для получения ингредиентов микробного происхождения используются как традиционные, так и новейшие достижения биотехнологии.

Культивирование является основной стадией технологического процесса.

Процесс глубинного культивирования начинают с отбора штаммов микроорганизмов. Обычно производственное культивирование микроорганизмов осуществляется в больших объемах. Поэтому вначале из имеющегося эталонного штамма микроорганизма, делают посеvy в небольшие емкости, например, во флаконе емкостью 100-200 см<sup>3</sup>, заполненные по 50-150 мл производственной средой. Затем из флаконов делают высевы в большие емкости (бутыли объемом 18-20 л). При хорошем накоплении микроорганизмов такую культуру вносят в реактор и называют посевной (маточной) культурой. При этом нужно предварительно рассчитать необходимое количество посевной культуры для производственного культивирования микроорганизмов исходя из посевной дозы, которая обычно составляет от 1 до 10% по объему. Затем осуществляют подготовку питательной среды. Питательная среда служит источником питания для микроорганизмов. Важный элемент подготовки питательных сред – стерилизация с целью уничтожения всех посторонних микроорганизмов. Ее проводят термическим, радиационным, фильтрационным или химическим методами.

**Ферментация – основной этап биотехнологического процесса.**

Ферментация – это вся совокупность операций от внесения микробов в подготовленную и нагретую до необходимой температуры среду до завершения биосинтеза целевого продукта или роста клеток. Весь процесс протекает в специальной установке – ферментере. Обычный ферментер представляет собой закрытый цилиндр, в котором механически перемешиваются среда вместе с микроорганизмами.

Через него прокачивают воздух, иногда насыщенный кислородом. Температура регулируется с помощью воды или пара, пропускаемых по трубкам теплообменника. Конструкция ферментера должна позволять регулировать условия роста: постоянную температуру, pH (кислотность или щелочность) и концентрацию растворенного в среде кислорода.

По окончании ферментации образуется смесь рабочих микроорганизмов, раствора непотребленных питательных компонентов и продуктов биосинтеза. Ее называют культуральной жидкостью или бульоном.

По завершении ферментации продукт, который желали получить, очищают от других составляющих культуральной жидкости. Для этого используют различные технологические приемы: фильтрацию, сепарирование (осаждение частиц взвеси под действием центробежной силы), химическое осаждение и др.

Последней стадией биотехнологического цикла является получение товарных форм продукта. Они представляют собой либо смесь, либо очищенный продукт (особенно если он предназначен для использования в медицинских целях).

#### *Производство аминокислот:*

Производство аминокислот относится к одной из наиболее передовых областей биотехнологии

*Аминокислоты* – это структурные единицы, из которых рибосомы строят все необходимые белки организма. Природные аминокислоты вовлечены в биосинтез ферментов, гормонов, витаминов, антибиотиков, токсинов и других азотсодержащих соединений. Белки, в свою очередь, способны синтезировать различные аминокислоты из органического сырья. Но все же половина из необходимых

аминокислот не синтезируются в организме человека и животных. Они называются незаменимыми аминокислотами. Недостаток этих аминокислот в питании приводит к нарушению обмена веществ, замедлению роста и развития.

Многие белки растительного происхождения имеют дефицит некоторых незаменимых аминокислот. Так, белки пшеницы и риса обеднены лизином и треонином, а белки кукурузы – лизином и триптофаном.

Внесение промышленных аминокислот в кормовые концентраты позволяет балансировать корма сельскохозяйственных животных по уровню белка. При добавлении 2-4 кг дефицитных аминокислот к 1 т комбикорма общий расход кормов уменьшается на 15-20%, а выход мяса и молока увеличивается на 20%. Это позволило перевести животноводство на промышленную основу.

Помимо применения в качестве пищевых добавок, приправ и усилителей вкуса аминокислоты используют как сырье в химической, парфюмерной, фармацевтической промышленности и т. п. Промышленное производство аминокислот стало возможным после открытия у некоторых микроорганизмов способности вырабатывать их во внешнюю среду.

Так, штамм *Corynebacterium glutamicum* является продуцентом глутамата. Его использовали при организации первого в мире крупномасштабного биотехнологического производства самой популярной пищевой добавки, глутаминовой кислоты, в Японии в 1956 году.

Натриевая соль (глутамат натрия) является эффективным усилителем вкуса мясных и овощных блюд. Данную аминокислоту добавляют во многие продукты при консервировании, замораживании и длительном хранении.

Растет спрос на глицин и аланин, которые также применяют в качестве приправ.

Для улучшения органолептических показателей мясных продуктов, придания им специфического приятного вкуса и аромата используют цистин, лизин, гистидин. Цистеин и цистин с глутаматом натрия создают имитацию запаха и вкуса мяса, что используется при приготовлении приправ. Цистеин, кроме того, используется для создания пористой структуры хлеба. Добавка к порошковому молоку гистидина и триптофана снимает неприятный «окисленный» привкус.

Промышленными продуцентами лизина являются штаммы бактерий вида *Corynebacterium glutamicum*. Лизин относится к числу незаменимых аминокислот. Также предложены способы биотехнологического получения изолейцина, треонина при использовании *E. coli*. Большинство исследованных штаммов микроорганизмов независимо от их систематического положения преимущественно накапливают L-аланин и глутаминовую кислоту. Значительно меньше штаммов и в меньшем количестве выделяют аспарагиновую кислоту, лейцин, валин, изолейцин.

#### *Получение пищевых органических кислот.*

С помощью микроорганизмов можно получить до 60 органических кислот. Многие из них получают в промышленном масштабе – итаконовая, молочная, уксусная, лимонная, яблочная, янтарная. Эти пищевые кислоты используются как регуляторы кислотности и консерванты. Лимонную кислоту получают с помощью *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus niger*, молочную *Endomycopsis fibuligera*, *Rhizopus oryzae*, *Lactobacillus casei*, янтарную – *Anaerobiospirillum succiniproducens*. Уксусную кислоту получают путем микробиологической конверсии водорода и углекислого газа бактериями *Acetobacterium woodii* и *Clostridium aceticum*.

*Лимонная кислота.* Лимонная кислота ( $C_6H_8O_7$ ) – трехосновная оксикислота, широко распространена в природе, относительно много ее содержится в некоторых ягодах, фруктах, особенно в цитрусовых (в лимоне 5-10%), в листьях и стеблях некоторых растений.

Ранее лимонную кислоту выделяли в виде лимоннокислого кальция из продуктов переработки листьев хлопчатника, стеблей махорки, хвои ели и в значительных количествах из плодов лимонов. Однако это производство является крайне дорогим и небольшим по объему. Поэтому лимонная кислота была дефицитным и дорогим продуктом.

В настоящее время лимонная кислота по объему производства является одним из главных продуктов микробного синтеза, ее общий выпуск в разных странах достигает до 400 тыс. тонн в год.

*Общая технологическая схема производства лимонной кислоты включает следующие этапы:*

Подготовка питательной среды. Мелассу загружают в варочный котел, разбавляют водой до определенной концентрации углеводов

(16 %), добавляют источники азота, фосфора и микроэлементы. Устанавливают необходимое значение pH среды (6,8-7,2) добавлением кислоты или щелочи. Для осаждения солей тяжелых металлов (железа, магния и т.д.), находящихся в мелассе, ее раствор обрабатывают желтой кровяной солью. Затем среду стерилизуют и охлаждают до температуры ферментации.

В отдельном цехе выращивают посевной материал в виде спор (конидий) *Aspergillus niger*. Затем размножают его в три стадии: в пробирках, колбах и алюминиевых кюветах. Длительность каждой стадии – 2-4 сут при 32 °С. Для выращивания в пробирках используют твердую агаризованную питательную среду, а в колбах и кюветах – жидкую.

Ферментация может осуществляться поверхностным или глубинным способом. Заводы небольшой или средней мощности используют поверхностный способ. Глубинный способ экономически выгоден тогда, когда мощность завода превышает 2500 т лимонной кислоты в год.

При поверхностном способе ферментация проводится на открытых металлических кислотоустойчивых кюветах высотой 7-20 см, в которых мицелий продуцента развивается на поверхности среды. Кюветы размещаются на многоярусных стеллажах в специальных камерах при температуре 34-36 °С. В камеры подают стерильный кондиционированный воздух. Цикл брожения заканчивается через 8-9 сут.

При глубинном способе мицелий гриба погружен в питательную среду в ферментаторах, туда же подается стерильный воздух. Длительность культивирования – 5-9 суток.

По окончании ферментации мицелий отделяют от культуральной жидкости. При глубинной ферментации – фильтрованием на фильтрах, при поверхностной – вручную, предварительно слив жидкость с кювет.

Мицелий промывают, высушивают и направляют для использования в качестве добавки к животным кормам. Фильтрованная культуральная жидкость (фильтрат) представляет собой водный раствор лимонной кислоты. В 1 литре фильтрата содержится 40-50 г лимонной кислоты.

Лимонную кислоту выделяют из культуральной жидкости в виде

плохо растворимой соли – цитрата кальция, которая образуется при добавлении мела. Перевод лимонной кислоты в свободное состояние достигается при добавлении строго определенного количества серной кислоты.

Гипс удаляют фильтрованием. Раствор лимонной кислоты осветляют активным углем, упаривают, сливают в кристаллизаторы, в которых постепенно снижают температуру. Выделившиеся кристаллы центрифугируют, промывают водой, сушат, фасуют.

Лимонная кислота используется в кондитерской промышленности для подкисления карамели, пастилы, вафель, так как она хорошо подчеркивает фруктовый вкус. Данную органическую кислоту в целях подкисления добавляют в мороженое, пищевые концентраты, маргарин, некоторые сорта колбас и сыра.

Лимонную кислоту применяют для торможения образования меланоидинов в сгущенном молоке с сахаром, раствором ее промывают и дезодорируют жировое сырье, обрабатывают перед холодным хранением свежее мясо, рыбу, фрукты с целью стабилизации их цвета, вкуса и запаха. Соли лимонной кислоты используют для изготовления шампуней и других моющих средств, так как они стимулируют вспенивание и обеспечивают механическую устойчивость пен.

*Уксусная кислота.* Продуцентами уксусной кислоты являются уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter*. Эти бактерии приспособлены к сахаристым и спиртовым субстратам, растут при сильнокислых условиях (pH = 4,0). К быстроокисляющим бактериям относят высокопроизводительный штамм *Acetobacter curvum* (курвум). Недостатком этого продуцента является то, что он может терять свойство образовывать уксусную кислоту, поэтому его постоянно поддерживают в среде с высокой концентрацией спирта и уксусной кислоты и низкой концентрацией питательных веществ.

В качестве сырья для получения пищевого уксуса используют виноградное вино, пивное сусло, мед, соки различных фруктов и ягод после спиртового брожения или водный раствор этилового спирта для получения белого уксуса. Кроме спирта среда содержит уксусную кислоту и минеральные соли N, P, S, Mn, K. Иногда добавляют источники витаминов в виде различных экстрактов. Уксусная кислота служит источником углерода и энергии для бактерий.

Уксусная кислота стала первым микробиологическим продуктом, полученным с помощью иммобилизованных клеток. Этот способ может быть непрерывным и периодическим. В течение длительного времени применяется адсорбирование уксуснокислых бактерий на древесной стружке, древесном угле, коксе и других субстратах. Пропуская раствор этанола через генераторы с иммобилизованными бактериями, получают 10-15 %-ный раствор уксусной кислоты. Из 100 л безводного спирта теоретически должно быть получено 103 л уксусной кислоты. На практике выход уксуса из 100 л этанола редко превышает 90 л, что связано с переокислением и неполным окислением этанола бактериями, а также с его испарением.

В столовом уксусе содержится 5-9 % уксусной кислоты. Уксус с концентрацией кислоты 20-30 % получают путем вымораживания исходного раствора. Путем перегонки получают 70-80 %-ную уксусную кислоту, называемую уксусной эссенцией. Ледяная уксусная кислота содержит 98,0-99,8 % кислоты.

Уксус, полученный при брожении, имеет приятные аромат и вкус, которые обуславливают побочные продукты брожения: сложные эфиры (этилацетат и другие), высшие спирты, органические кислоты.

Уксусную кислоту или уксус широко используют в пищевой промышленности. Уксус, полученный микробиологическим путем (пищевая уксусная кислота, столовый уксус), различается по сортам в зависимости от характера сбраживаемого субстрата. Известен яблочный, виноградный, грушевый и другие сорта уксуса.

Уксус также применяют для растворения органических красителей, при получении медикаментов, пластмасс и т.д.

*Молочная кислота.* Для промышленного изготовления молочной кислоты пригодны молочнокислые бактерии, образующие до 98 % молочной кислоты. Применяемые штаммы *Lactobacillus delbrueckii*, *L. bulgaricus* не предъявляют высоких требований к питательной среде и за короткое время дают высокий выход молочной кислоты.

Молочнокислое брожение вызывается молочнокислыми бактериями, которые с помощью ферментов сбраживают молочный сахар (лактозу) и любой другой сахар (глюкозу) до молочной кислоты и других продуктов:



Процесс идет с накоплением энергии в виде АТФ. По характеру брожения молочнокислые бактерии делятся на две группы: гомоферментативные, когда продукт разложения – молочная кислота, и гетероферментативные, вызывающие образование, кроме молочной кислоты, других продуктов брожения: спирта, уксусной кислоты, CO<sub>2</sub> и др.

К первой группе относятся: молочнокислый и сливочный стрептококки, ацидофильная и болгарская палочки.

Молочнокислый стрептококк (*Streptococcus lactis*). Имеет вид овальных кокков диаметром 0,5–1 мкм, которые располагаются в культуре попарно. Это диплококки, а короткими цепочками – стрептококки. Микроорганизмы грам(+), оптимальная температура развития – 30–35 °С. Сбраживает молочный сахар (лактозу), а также мальтозу. Молоко свертывается через 10–12 часов.

Сливочный стрептококк (*Streptococcus cremoris*). Встречается в молочнокислых продуктах с большой жирностью, имеет вид более длинных цепочек. Используется для производства масла, сыров и сметаны.

Болгарская палочка (*Lactobacterium bulgaricum*). Неподвижная, грам(+), располагается в виде отдельных клеток и коротких цепочек. Оптимальная температура ее развития – 40–45 °С.

Ацидофильная палочка (*Lactobacterium acidophilum*). По морфологии близка к болгарской палочке, но имеет другой температурный оптимум развития – 37 °С. Используется для изготовления ацидофилина.

Огуречная палочка (*Lactobacterium cucumeris*). Короткая, грам(+), бактерия, неподвижная. Развивается в рассоле засоленных огурцов, капусты, в силосе.

Ко второй группе гетероферментативных бактерий относятся капустная палочка, ряд лактобацилл (*Lactobacillus plantarum*, *L. Fermenti*, *L. brevis*), а также кефирные дрожжи и молочная плесень.

Микроорганизмы этой группы чаще встречаются в заквашенных овощах и силосе. Молочнокислые бактерии широко распространены в природе. Они всегда имеются в почве, на поверхности растений, что является источником их постоянного появления в молочных и других продуктах. В промышленности используют

культурные расы бактерий, которые имеют ряд преимуществ перед дикими формами.

*Капустная палочка* (*Lactobacterium brassicae*). Вместе с огуречной встречается в заквашенных овощах, грам(+), сцеплена в пары и цепочки. Оптимум развития – 25 °С. В молочнокислых продуктах можно встретить и пропионовых бактерий, попадающих в молоко из почвы и с растений. Им принадлежит значительная роль при созревании сычужных сыров.

*Кефирные дрожжи* (*Saccharomyces kefirii*), переводящие молочный сахар (лактозу) в спирт, небольшое количество которого вырабатывается этими организмами.

*Молочная плесень* (*Oidium lactis*). Можно обнаружить сверху на молочнокислых продуктах, имеет мицелий, распадающийся на четырехугольные или овальные клетки, отличающиеся сравнительно большими размерами. Окисляет молочную кислоту до CO<sub>2</sub> и воды, ухудшая качество скисшего молока.

Молочнокислые бактерии преобразуют в молочную кислоту самые разные углеводы, поэтому для промышленного получения этой кислоты используют мелассу, молочную сыворотку, глюкозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, осахаренный крахмал и пр. В каждом случае подбирают наиболее подходящий продуцент. Для сбраживания глюкозы или мальтозы обычно применяют штаммы *Lactobacillus delbrueckii*, *L. leichmannii* или *L. bulgaricus*. Для сбраживания осахаренного крахмала используют смесь молочнокислых бактерий *L. delbrueckii* или с *L. bulgaricus*, или со *Streptococcus lactis*. При сбраживании мальтозы выход молочной кислоты выше при использовании *L. bulgaricus* или *L. casei*.

В качестве основного сырья используют мелассу, картофельный осахаренный затвор, которые разбавляют водой до определенной концентрации (12 %), вносят дополнительные источники аминного азота (свободные аминокислоты), витаминов и других биологически активных веществ в виде кукурузного или дрожжевого экстракта, или вытяжку солодовых ростков (так как на молочнокислое брожение биологически активные вещества оказывают положительное влияние).

Молочную кислоту в промышленных условиях получают мето-

дом анаэробной глубинной ферментации. Концентрация сахара в среде должна быть 5-20 %, температура 44-50 °С, pH 6,3-6,5. Во время ферментации pH среды поддерживают, добавляя мел. Через 6-7 суток культивирования в среде остается 0,5-0,1 % сахаров и 11-14 % лактата кальция. Из 100 г сахаров получают 80-90 г лактата. Осадок мела и коллоиды отделяют фильтрацией. Фильтрат упаривают до концентрации 27-30 %, затем охлаждают до 25-30 °С и выдерживают в кристаллизаторах 36-48 ч. Кристаллы лактата отделяют центрифугированием. Молочную кислоту из лактата получают при помощи серной кислоты.

Тяжелые металлы осаждают сульфатом натрия. Молочную кислоту обрабатывают активированным углем, фильтруют и фасуют. Конечный продукт - в виде жидкого концентрата молочной кислоты.

Молочную кислоту применяют для приготовления джемов, в которых она способствует хорошей консистенции. Молочная кислота как регулятор pH, улучшатель вкуса применяется в производстве многих сыров, квашении капусты, в сухом концентрате кваса. В хлебобулочном производстве молочная кислота и лактаты увеличивают объем мякиша и улучшают корку хлеба при использовании муки низкого качества. Способность лактатов удерживать влагу применяют в производстве колбас, сыров, детского питания. Молочную кислоту также используют для ускорения получения молочно-белкового сгустка при производстве творога.

## ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 4.

### Биотехнология получение сыра

**Цель занятия:** ознакомиться с технологией производства сыра и сырных изделий, ответить их вопросы.

**Приборы и материалы:** методические указания, плакаты.

Для процессов ферментации молока используются чистые культуры микроорганизмов, называемые заквасками. Исключение составляют закваски для кефира, которые представляют естественный симбиоз нескольких видов молочнокислых грибов и молочнокислых бактерий. Этот симбиоз в лабораторных условиях воспроизвести не удалось, поэтому поддерживается культура, выделенная из природных источников.

Культуры для заквасок выделяются из природных источников, после чего проводится направленный мутагенез и отбор штаммов, отвечающих перечисленным выше требованиям. Биотехнологии на основе молока включают, как правило, все основные стадии биотехнологического производства, которые можно рассмотреть на примере сыроварения.

Производство сыра, или сыроделие (сыроварение) - один из древнейших процессов, основанных на ферментации. Сыры бывают самые разнообразные - от мягких до твердых. Мягкие сыры содержат много воды, 50-60%, а твердые - мало, 13-34%. На первом этапе идет подготовка молока (первичная обработка). На втором - готовится культура молочнокислых бактерий. Микроорганизмы подбираются в определенной пропорции, обеспечивающей наилучшее качество. Набор бактерий также зависит от температуры термообработки. Третья стадия - стадия ферментации, - в сыроварении в некоторых случаях происходит в 2 этапа, до и после стадии выделения. Сначала молоко инокулируют определенными штаммами микроорганизмов, приводящими к образованию молочной кислоты, а также добавляют сычужный фермент реннин. Он ускоряет превращение жидкого молока в сгусток (створаживание) в несколько раз. Эта реакция активируется молочной кислотой, вырабатываемой бактериями. Функции реннина могут выполнять и другие протеиназы, но реннин также участвует в процессах протеолиза, происходящих в сыре при созревании. После образования сгустка сыворотку отделяют, а

полученную творожистую массу подвергают термообработке и прессуют в формах. Далее сгусток солят и ставят на созревание. Иногда полученная масса проходит дополнительную обработку, которая заключается в следующем: заражение спорами голубых плесневых грибов при производстве рокфора; нанесение на поверхность спор белых плесневых грибов при производстве камамбера и бри; нанесение бактерий, необходимых для созревания некоторых сыров. Некоторые сыры после выделения должны подвергнуться дальнейшей ферментации (стадия созревания). Микроорганизмы и ферменты в ходе этого процесса гидролизуют жиры, белки и некоторые другие вещества молодого сыра. В результате их распада образуются вещества, придающие сырам характерный вкус.

Процессы ферментации при производстве многих молочных продуктов, таких как сметана, творог, многие сыры идут в ферментерах открытого типа. Как правило, они занимают немного времени. К одним из самых простых относят производство кефира, простокваш, сметаны и масла. Например, при производстве сметаны к сливкам добавляют 0,5-1% закваски, используемой при производстве масла. Далее продукт выдерживают, пока концентрация кислоты не достигнет 0,6%. В заключение хотелось бы добавить, что процессы получения молочнокислых продуктов весьма просты и доступны для воспроизводства в домашних условиях. Они не требуют строгих условий соблюдения стерильности, протекают, как правило, при комнатной или чуть повышенной температуре. Собственно, изначально они были одними из первых «домашних» биотехнологий, которые были позднее поставлены на промышленную основу.

#### Контрольные вопросы

1. Что называют заквасками, как их выделяют?
2. Какие бывают сыры и сколько в них содержится воды?
3. Какие технологические стадии приготовления сыра Вы знаете?
4. Что означает стадия созревания сыра?
5. Процессы ферментации других молочных продуктов идут в ферментерах какого типа?

## ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 5.

### Биотехнология получения витаминов

**Цель занятия:** Ознакомиться с микроорганизмами, синтезирующие витамины и способами их получения.

В связи с возрастающими потребностями в витаминах особенно большой интерес проявляется к микроорганизмам как продуцентам витаминов. Микроорганизмы содержат много витаминов, которые чаще всего входят в состав ферментов. Состав и количество витаминов в биомассе зависят от биологических свойств данной культуры микроорганизмов и условий культивирования. Некоторые витамины микроорганизмы синтезируют, другие напротив усваивают в готовом виде из окружающей среды.

Витамин В<sub>12</sub> (цианкобаламин). Синтезировать витамин В<sub>12</sub> способны уксуснокислые бактерии, грибы и пропионовокислые бактерии. Наибольшее промышленное значение имеют *Propionibacterium* и *Pseudomonas* (*P. denitrificans*).

Концентрат витамина В<sub>12</sub> предназначен для обогащения кормов животных. Он представляет собой однородный порошок коричневого цвета, кисловатый на вкус, имеет характерный запах. Для обогащения кисломолочных продуктов витамином В<sub>12</sub> используют пропионовокислые бактерии как в чистом виде, так и в виде концентрата, приготовленного на молочной сыворотке.

Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин) можно в небольших количествах выделять из природного сырья. В наибольшем количестве он содержится в моркови и печени трески. Из 1 т моркови получают 1 г витамина, из 1 т печени – 6 г.

Рибофлавин впервые был выделен в кристаллическом виде в 1933 г. Продуцентами данного витамина являются дрожжи, мицелиальные грибы и бактерии. Наиболее активными продуцентами витамина В<sub>2</sub> являются дрожжеподобные грибы рода *Geothecium* (эремофекиум), входящие в класс аскомицетов. Культивирование проводят глубинным способом при хорошей аэрации. Максимальное накопление витамина происходит вместе с максимумом накопления биомассы на 2-е сутки, причем синтез рибофлавина начинается лишь после фазы интенсивной ассимиляции сахара.

Витамин В<sub>2</sub> обогащают некоторые сорта белого хлеба, его используют для окраски пищевых продуктов в оранжево-желтый цвет.

Каротиноиды – это предшественники витамина А, среди которых наиболее активен β-каротин. В организме человека каротиноиды не синтезируются, поэтому должны поступать извне. В печени каротин превращается в витамин А.

Продуцентами каротиноидов могут быть грибы и дрожжи. В промышленности β-каротин чаще всего получают с помощью микроскопического гриба рода *Blakeslea* (блакеслеа). Культивирование проводят и поверхностным, и глубинным способами на питательных средах сложного состава. Во время ферментации среду интенсивно аэрируют. Образование каротиноидов в культуре микроорганизмов не идет параллельно с образованием биомассы. Интенсивный синтез каротиноидов начинается, когда в среде использован весь азот, а рост культуры уменьшается. В качестве стимуляторов в питательные среды добавляют экстракты цитрусовых и дрожжей.

β-каротин используют при изготовлении пищевых продуктов как краситель. Его применяют при изготовлении колбас с целью замены нитрита натрия и обеспечения высокой интенсивности и устойчивости цвета. Используют при производстве леденцов, пищевых паст, кексов и других кондитерских изделий. Во многих странах β-каротин применяют для подкрашивания сливочного масла. Нагревают до 30 °С, добавляют β-каротин, который при такой температуре хорошо растворяется в масле. В Италии каротиноиды используют в производстве макаронных изделий.

β-каротин применяется для стабилизации цвета мяса охлажденного и замороженного в тушах. С этой целью раствор β-каротина наносят на поверхность мяса.

Кроме того, β-каротин обладает антиокислительными свойствами, которые используются для продления срока хранения продукта.

Таким образом, витамины, синтезированные микроорганизмами, используют не только для повышения пищевой ценности продуктов питания, но также в качестве антиоксидантов, красителей и стабилизаторов цвета.

#### Контрольные вопросы

1. Перечислите основные операции биотехнологического производства витаминов.
2. Какой витамин используется для обогащения кормов и какие бактерии его синтезируют?
3. Какие микроорганизмы используются для синтеза витамина рибофлавин?
4. Как применяют витамины в пищевой промышленности?

## ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 6.

### Требования, предъявляемые к пищевым и кормовым дрожжам

**Цель занятия:** сформировать навык определения подъемной силы хлебопекарных дрожжей.

Дрожжи – сборная группа грибов, не имеющих типичного мицелия. Известно около 500 видов дрожжей.

Дрожжи применяются в пивоварении, виноделии, спиртовой промышленности, хлебопечении, микробиологической промышленности (получение кормового белка, ферментов), а также как объект исследований в биоэнергетике, радиобиологии, генетике.

Большинство из используемых человеком видов относятся к роду сахаромицеты (*Saccharomyces*), которые активно сбраживают простые углеводы до этилового спирта. Наиболее детально изучена генетика пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

*Свойства дрожжей, ценные для биотехнологии:* быстро растут, безопасны для человека, растут на дешевой среде (парафин, меласса, метиловый спирт). Недостаток – сложно получать внутриклеточные продукты, т.к. клетки покрыты очень прочной оболочкой. Наиболее часто применяемый способ получения внутриклеточных соединений – автолиз, т.е. разрушение клетки под действием ее собственных ферментов.

*Усредненный химический состав дрожжей (%):* вода – 74, белок – 12,7, жир – 2,7, клетчатка – 2,1 минеральные вещества (кальций, калий, фосфор, магний, алюминий, сера, железо, кобальт, цинк и др.) – 2,1, витамины B1, B2, PP.

#### *Кормовые дрожжи.*

В качестве исходного сырья при получении кормового белка обычно используются отходы целлюлозной и деревообрабатывающей промышленности, солома, хлопковая шелуха, корзинки подсолнечника, льняная костра, стержни кукурузных початков, свекловичная меласса, картофельная мезга, виноградные выжимки, барда спиртовых производств, отходы кондитерской и молочной промышленности.

В России и некоторых нефтедобывающих странах разработаны технологии получения кормовых дрожжей из n-парафинов нефти. В

нашей стране первый завод по производству кормовых дрожжей из жидких парафинов нефти вступил в действие в 1971 г.

Хороший субстрат для выращивания кормовых дрожжей – молочная сыворотка, являющаяся производственным отходом при переработке молока.

Наряду с использованием дрожжевых белков в качестве кормовой добавки при балансировании рационов с.х. животных ставится задача сделать эти белки пригодными для питания человека.

Для увеличения производства продуктов животноводства необходима надежная кормовая база. Корма, не содержащие в достаточном количестве белков и витаминов, не могут удовлетворить животноводство и птицеводство.

В последние годы в рацион кормления животных и птиц все больше входят кормовые дрожжи, полученные на гидролизных и целлюлозных предприятиях, используя для этой цели углеводы, содержащиеся в гидролизатах и сульфитных щелоках. Эти дрожжи являются биологически полноценным кормом, источником белка, витаминов и минеральных веществ.

Кормовые дрожжи повышают биологическую ценность белков других кормов за счет содержащихся в них незаменимых аминокислот. По содержанию аминокислот, в том числе незаменимых, кормовые дрожжи близки к белкам животного происхождения.

Промышленное производство микробной белковой биомассы организовано на основе переработки углеводного и углеводородного сырья. Кормовые дрожжи вырабатываются с использованием следующих видов углеводного сырья: гидролизатов древесины и растительных отходов сельскохозяйственного производства и обесспиртованной барды гидролизно-спиртового производства, сульфитных щелоков и предгидролизатов сульфатно-целлюлозного производства.

Производство дрожжей на гидролизатах позволяет решить как проблему утилизации сельскохозяйственных отходов или отходов лесобрабатывающей промышленности, так и получить кормовой продукт, пригодный для использования в животноводческой промышленности.

Ввиду актуальности исследования и разработки технологий микробиологического производства кормовых белковых препаратов це-

лью данной работы является проектирование линии производства дрожжевого белка.

#### *Химический состав кормовых дрожжей.*

Биомасса дрожжевых клеток состоит из 75 - 80% воды и 25 - 20% сухих веществ. Органические вещества дрожжей состоят из протеина, полисахаридов, без азотистых экстрактивных соединений и липидов. Наиболее ценным компонентом является протеин. Наибольшее количество протеина содержится в кормовых дрожжах, выращенных на зерно-картофельной и меласной барде.

Химический состав дрожжей зависит от состава перерабатываемого сырья, расы дрожжей, технологии производства, способа сушки. Самый низкий уровень протеина отмечается у пекарских дрожжей, культивируемых на сульфитных щёлках, наиболее высокий - у дрожжей рода *Candida*, культивируемых на углеводородных субстратах: до 60% от сухого вещества биомассы. По качеству белка дрожжи значительно превосходят растительные корма и приравниваются к кормам животного происхождения.

Кормовые дрожжи (эприн, паприн, гаприн и др.) характеризуются достаточно высоким содержанием протеина (в среднем 61,4% с колебаниями 59-63,7% в абсолютно сухом веществе) и превосходят все высокобелковые корма растительного и животного происхождения на 12-16 абсолютных процентов. Только в рыбной муке на 6% больше протеина, чем в дрожжах.

В настоящее время среди биосинтетических продуктов из непищевого сырья в рационах животных применяется белково-витаминный концентрат (паприн), его лизат и ферментоллизат. Химический состав этих кормов характеризуется достаточно высоким содержанием протеина (52,2-60,5%), низким содержанием жира: от 2,47-2,40% в лизате и ферментоллизате до 0.41% в гидролизных дрожжах.

#### **Контрольные вопросы**

1. Где используются дрожжи?
2. Свойства дрожжей, ценные для биотехнологии.
3. Какие питательные среды используются для культивирования кормовых дрожжей?
4. Химический состав кормовых дрожжей.

## **ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 7.**

### **Производство и промышленное использование ферментов**

**Цель занятия:** изучить области применения ферментов, изучить их классификацию.

**Приборы и материалы:** методические указания, образцы ферментов, таблицы.

*Ферменты (энзимы)* – катализаторы белковой природы, образующиеся и функционирующие во всех живых организмах, увеличивающие скорость протекания реакции. Для ферментативных реакций характерен почти 100% выход продуктов. Ферменты обладают узкой специфичностью, В настоящее время в природе обнаружено свыше 3 тысяч ферментов.

Единственным, неограниченным источником ферментов являются микроорганизмы, из которых можно выделить любые из известных в настоящее время ферментов. Исключение составляет папаин (размягчитель мяса), который получают из плодов папайи. Продуктивность штаммов микроорганизмов, производящих ферменты, можно увеличить с помощью мутагенных факторов в 2-5 раз.

Синтезируемые микроорганизмами ферменты подразделяются на внеклеточные и внутриклеточные.

*Внеклеточные ферменты* получают из культуральной жидкости, предварительно отделанной от микроорганизмов. Для выделения *внутриклеточных ферментов* разрушают клеточные оболочки с помощью механических, физических, химических (действие кислот, растворителей), ферментативных и биологических методов.

Ферменты применяются в пищевой, фармацевтической, текстильной, кожевенной и других отраслях промышленности, в медицине, сельском хозяйстве, химическом синтезе.

*Иммобилизация ферментов* – это перевод их в нерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) каталитической активности.

Иммобилизованные ферменты нашли самое разнообразное использование в медицине (в качестве противовоспалительных, тром-

болитических и фибринолитических препаратов), фармацевтической (в медицинской диагностике при анализе лекарственных веществ белковой природы), химической (в качестве активных компонентов стиральных и моющих средств) и пищевой промышленности (при обработке мяса, в качестве катализаторов при проведении различных технологических процессов), в аналитических целях, в качестве ферментных электродов для определения концентрации сахаров, аминокислот и других соединений.

Иммобилизованные ферменты характеризуются и некоторыми *недостатками*. В результате иммобилизации в ряде случаев наблюдается уменьшение удельной активности системы.

Еще одним недостатком иммобилизованных ферментов является стоимость иммобилизации, которая может оказаться неприемлемо высокой.

Таким образом, при использовании иммобилизованных ферментов приходится решать комплекс вопросов, связанных с экономической обоснованностью их практической реализации. Самое главное преимущество ферментов как специфических биокатализаторов заключается в их способности осуществлять сложные химические преобразования в обычных условиях, при крайне незначительных затратах энергии.

### Задания

1. Запишите термин «ферменты», укажите источники их получения, а также чем отличаются внеклеточные и внутриклеточные ферменты.
2. Дайте определение иммобилизации ферментов, укажите способы иммобилизации.
3. Заполните таблицу 1.

Таблица 1 – Применение иммобилизованных ферментов

Область применения	Примеры

*Использование очищенных ферментов и технических препаратов.*

*Технический препарат* фермента представляет собой смесь разных белков, в которой основным является тот, название которого имеет препарат. Количество этого ферментного белка должно быть не менее 10-15% от общего количества белков. Довольно часто технические ферментные препараты содержат нейтральный наполнитель, например ксилозу, которая не влияет на каталитические свойства основного фермента.

Хотя промышленные ферменты иногда реализуются в виде технических препаратов, определенная их часть подвергается экстракции и очистке. При этом решается несколько задач: удаляют токсичные и нежелательные метаболиты и микроорганизмы, стандартизируют активность. Таким образом, обеспечивается более высокое качество препарата и его стабильность, также можно придать препарату желаемые аромат и цвет. Главная трудность, возникает из-за неоднородного состава культуральных жидкостей, которые часто содержат большие количества коллоидов и имеют высокую вязкость.

Выделение и очистка ферментов – трудоемкий и дорогой процесс. Поэтому в кожевенной, спиртовой промышленности, для введения в корма животных применяют ферментные препараты в неочищенном виде.

Технические препараты используются в разных областях промышленности, в основном связанных с гидролизом крахмала, пектинов, целлюлозы, гемицеллюлозы (ксилан) и дисахаридов (сахароза, лактоза). Большое внимание уделяется протеазам, которые осуществляют гидролиз пептидных связей в белках. Ввиду широкого распространения и быстрого возобновления белка как субстрата, приобретают все большее значение.

Ферменты или их иммобилизованные формы требуемой белковой чистоты применяют в клинической медицине и научных исследованиях.

Технические исходные неочищенные культуры обозначают знаком «X». К очищенным относятся препараты, активность которых после очистки в 10, 15, 20 раз выше исходных (обозначают 10X, 15X, 20X). Название ферментного препарата складывается из основного фермента и видового названия микроорганизма – продуцента. Например, Глюкаваморин П10Х препарат комплексного действия.

Стандартизируется по амилолитической (АС) и декстринолитической активности. Содержит также ферменты мальтазу, гемицеллюлазу и др.

#### *Использование промышленных ферментных препаратов.*

Использование микробных ферментов в некоторых отраслях промышленности началось более 70 лет назад. Большую часть, составляют гидролазы (реакции гидролиза), так как именно они являются основными в промышленной биотехнологии.

Ферменты немикробного происхождения находят применение сравнительно реже в силу различных причин, в частности: низкой лабильности, дороговизны, сезонности получения и других факторов. Но в ряде случаев, в отсутствие микробного аналога, для коммерческих целей выделяют ферменты растительного и животного происхождения. Примерами таких ферментов могут служить ренин животного происхождения, фицин выделенный из инжира, папаин и др. Для получения в производственном масштабе ферментов растительного и животного происхождения в последнее время с успехом используют культивирование тканей и отдельных органов. Предположительно этот метод должен значительно удешевить и соответственно увеличить удельную долю коммерческих ферментов растительного происхождения.

#### Группы ферментов:

К *амилолитическим* ферментам относятся L-амилаза, β-амилаза, глюкоамилаза. Их действие проявляется при гидролизе крахмала и гликогена. Крахмал при гидролизе сначала расщепляется на более простые полисахариды - декстрины, а затем - до глюкозы. Эти ферменты применяются в спиртовой промышленности, хлебопечении.

Грибные амилазы используются в пищевой промышленности при выпечке хлеба. Их действие основывается на гидролизе крахмала в муке с образованием сбраживаемых сахаров. В шелкоткацком производстве грибные амилазы применяют для удаления крахмала из тканей (взамен ранее употребляемых химикатов)

*Протеолитические* ферменты относятся к гидролазам. Их действие заключается в расщеплении пептидных связей в белках и пептидах.

Применение *протеаз* широкое: мясная промышленность для умягчения мяса, кожевенная промышленность - при удалении волосяного покрова и мягчении шкур; кинопроизводство - для растворения желатинового слоя на пленках при их регенерации; парфюмерия - при создании добавок в зубную пасту, кремы, лосьоны, промышленность синтетических моющих средств - при применении моющих добавок для удаления загрязнений белковой природы; медицина - при лечении воспалительных процессов, ожогов, тромбозов.

Грибные протеазы широко используются для деградации клейковины до постоянного уровня. Это позволяет стандартизовать операцию процесса хлебопечения и сократить периоды замешивания и выдерживания.

Используют их также при производстве сухарей с низким содержанием белка.

Все микробные протеазы можно разделить на три класса: сериновые протеазы, металлопротеазы и кислые протеазы. Сериновые и металлопротеазы образуются бактериальными культурами, кислые протеазы образуют микроскопические грибы.

Металлопротеазы используются в пивоваренной и спиртовой промышленности. При производстве пива использование протеаз связано с предотвращением образования мути, являющейся результатом выпадения в осадок белковых компонентов пива. Кроме металлопротеаз для этой цели используются растительные ферменты: бромелин и папаин.

При производстве пищевого спирта ячменный солод заменяют несолодовыми зерновыми. С целью получения сбраживаемых сахаров в среду, предназначенную для сбраживания, добавляют L-амилазу и протеазу.

Кислые протеазы. Ферменты этого типа встречаются у бактерий, но преобладают у высших грибов. Чаще всего эти ферменты, ввиду их способности коагулировать молоко, используются как заменители ренина (фермент получаемый из сычуга молодняка жвачных).

У свертывающих молоко ферментов коагулирующая активность должна преобладать над протеолитической активностью. Сущность процесса коагуляции заключается в образовании комплекса казеина с ионами  $Ca^{2+}$ . Сычуг – экстракт желудков телят содержит фермент

ренин, который считается наиболее подходящим для этой цели протеолитическим ферментом. Замена дорогостоящего и дефицитного сычужного фермента на дешевый и доступный фермент микробного происхождения является фактором, определяющим дальнейшее развитие сыродельной промышленности. Содержимое брюшной полости стареющих животных невозможно использовать как источник ренина по той причине, что с возрастом вместо ренина образуется протеина за другого типа – пепсин.

В последние два десятилетия в мире заметно увеличилось употребление сыра, вследствие чего отмечается острая нехватка ренина, что оказывает существенное влияние на коммерческую цену сыра.

*Пектолитические* ускоряют негидролитическое расщепление пектиновых веществ (пектин - пектиновые кислоты и протопектин-представители полисахаридов, содержатся во фруктах, корнеплодах, стеблях (лен). Применение в текстильной промышленности - вымачивание льна перед его переработкой, в виноделии - осветление вин, уничтожение мутности, в консервировании - при приготовлении фруктовых соков.

*Целлюлолитические* ферменты проводят гидролиз целлюлозы до глюкозы. Использование их очень перспективно в гидролизной промышленности – это получение глюкозы из целлюлозы; в медицинской - выделение лекарственных веществ (стероидов) из растений; в пищевой - улучшение качества растительных масел; в сельском хозяйстве - как добавки в комбикорма для жвачных животных.

В ближайшем будущем значительный рост использования ферментных препаратов, а именно микробных целлюлаз, связан с возможностью ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных субстратов с целью получения сахара для пищевых целей.

Ферменты также используются для улучшения действия пищеварительной системы. С этой целью широкое применение нашли протеазы, амилазы, целлюлазы, липазы и др.

Очевидно, в ближайшем будущем существующая ныне тенденция развития производства ферментных препаратов не изменится. Большое значение будет уделяться производству технических препаратов промышленного назначения широкого спектра и малотоннажной ферментной продукции (прокариотов) высокой чистоты для аналитических, диагностических и терапевтических целей.

### Задания

1. Укажите методы культивирования микроорганизмов с целью получения ферментов, выделите преимущества и недостатки этих методов
2. Перечислите основные технологические этапы культивирования и способы очистки ферментов.
3. Перечислите факторы, влияющие на синтез ферментов.
4. Определите разницу между техническими и высокоочищенными ферментными препаратами, укажите области их использования
5. Заполните таблицу 2

Таблица 2 – Использование ферментов в промышленности

Фермент	Принцип действия	Область использования

### Контрольные вопросы

1. Что такое ферменты?
2. Как получают ферменты в биотехнологии?
3. Как используют иммобилизованные ферменты, как это связано с вашей специальностью?
4. Какие существуют методы получения ферментов?
5. Каковы преимущества глубинного метода культивирования?
6. Какие способы очистки ферментов применяют?
7. Чем отличаются технический и очищенный ферментный препарат?
8. Где применяются протеолитические и амилаолитические ферментные препараты?
9. Как применяются ферментные препараты в переработке мяса и молока?

## ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 8.

### Применение ферментативных препаратов в сельском хозяйстве

**Цель занятия:** сформировать представление о ферментативных препаратах и их значение в животноводстве и растениеводстве

**Приборы и материалы:** методические указания, образцы ферментных препаратов.

Одним из важных направлений современной биотехнологии является получение на основе культивирования микроорганизмов и использование в сельском хозяйстве различных ферментных препаратов, которые могут применяться в процессе приготовления кормов для сельскохозяйственных животных как добавки к кормам для улучшения их усвояемости, а также в ветеринарии для профилактики и лечения желудочно-кишечных и паразитарных заболеваний.

Основной компонент кормов сельскохозяйственных животных – растительная продукция (зерно, силос, грубые корма и др.), содержащая довольно много трудноперевариваемых веществ, – клетчатка, лигнин, гемицеллюлоза. Даже у жвачных животных, содержащих в преджелудке (рубце) активные штаммы целлюлозоразлагающих микроорганизмов, клетчатка переваривается на 40–65%. Не полностью перевариваются также растительные белки (60–80%), липиды (60–70%), крахмал и полифруктозиды (70–85%), пектиновые вещества.

Для улучшения перевариваемости и повышения эффективности использования растительных кормов в рационы сельскохозяйственных животных вводят ферментные препараты (0,1–1,5 % от сухой массы корма), полученные из микроорганизмов и содержащие активные комплексы гидролитических ферментов. Препараты микробных ферментов обычно получают из культур бактерий или микроскопических грибов (*Bac. Subtilis*) выделяют гидролитические ферменты в культуральную среду, поэтому их ферментные препараты производят путем концентрирования и высушивания при определенных условиях (лиофилизацией) культуральной жидкости. Если источником ферментов являются микро-

скопические грибы (аспергиллы, фузариум), то ферментный препарат готовят высушиванием поверхностной культуры этих микроорганизмов. Очищенные ферментные препараты получают экстракцией ферментов из клеток микроорганизмов подходящим растворителем и осаждением фермента этанолом.

Каждый ферментный препарат обозначается определенным буквенным и цифровым индексом. Буква «Г» в названии препарата указывает на то, что он получен из культуральной жидкости при глубинном способе выращивания микроорганизмов, тогда как буква «П» свидетельствует о том, что ферментный препарат получен из поверхностной культуры микроскопических грибов. Индекс «2» в названии препарата показывает, что это концентрированный сироп, «3» – сухой ферментный препарат, «10» – очищенный ферментный препарат. Индекс «Пх» обозначает, что ферментный препарат представляет собой высушенную поверхностную культуру грибов.

В рационе крупного рогатого скота значительный удельный вес занимают сочные и грубые корма, богатые клетчаткой, пентозанами, пектиновыми веществами, которые медленно перевариваются микроорганизмами рубца, снижая усвояемость организмом других питательных веществ. Значительное улучшение перевариваемости этих веществ наблюдается при добавлении в корм ферментных препаратов с активным комплексом гидролитических ферментов, таких как пектофетидин ГЗх и целловиридин ГЗх (в соотношении 1:1), амилосубтилин ГЗх и глюкаваморин Пх. При этом не только повышается общая продуктивность животных, но и существенно снижается расход кормов на создание одной единицы животноводческой продукции (на 8–10 %).

При откорме свиней положительное действие оказывают ферментные препараты с амилалитической и протеолитической активностью – амилосубтилин ГЗх, протосубтилин ГЗх, амилоризин Пх, глюкаваморин Пх, протезим ГЗх.

Особенно важное значение имеет применение ферментных препаратов при кормлении молодняка сельскохозяйственных животных. Так, например, у телят формирование рубца происходит к 2–3-месячному возрасту, вследствие чего наблюдается слабое переваривание грубых и сочных кормов. Поэтому для замены молока растительными кормами и лучшего их использования в рацион телят целе-

сообразно вводить ферментные препараты – пектофоетидин ГЗх, амилосубтилин ГЗх, протосубтилин ГЗх и глюкаваморин Пх, содержащие комплекс амилолитических и протеолитических ферментов.

У поросят-сосунов ферментные системы желудочно-кишечного тракта начинают нормально функционировать лишь в 3–4-месячном возрасте и для улучшения перевариваемости питательных веществ корма им рекомендуется добавлять в корм ферментный препарат протезим ГЗх. При кормлении ягнят в целях улучшения перевариваемости белков и углеводов в их кормовые рационы вводят глюкаваморин Пх и амилоризин Пх, в результате чего привесы увеличиваются на 11–15%.

Пищеварительные железы птиц не образуют ферменты, катализирующие гидролиз клетчатки и пектиновых веществ, а микрофлора кишечника у них малочисленна, поэтому в их кормовые рационы добавляют ферментные препараты с целлюлолитической, пектолитической и протеолитической активностью – пектофоетидин ГЗх, целлозиридин ГЗх, амилосубтилин ГЗх, глюкаваморин Пх, пектаваморин Пх, протосубтилин ГЗх, гликозидазу ГЗх, лизоцим ГЗх, протезим ГЗх. В результате применения указанных препаратов яйценосность кур повышается на 5 %, привесы бройлеров увеличиваются на 7-15%, тогда как расход корма на создание единицы продукции снижается на 4-7 %.

Применение ферментных препаратов также эффективно при кормлении рыб. При добавлении в кормовые рационы рыб протосубтилина ГЗх, амилосубтилина ГЗх, пектаваморина Пх в количестве 1–0,15 % значительно улучшается перевариваемость белков и других питательных веществ корма.

Ферментные препараты используются также в кормопроизводстве чаще всего при силосовании бобовых трав, соломы, картофеля и при приготовлении соломоконцентратов. Зеленая масса бобовых трав содержит большое количество буферных веществ (белки, аминокислоты, щелочные соли), которые препятствуют понижению рН в процессе молочнокислого брожения, кроме того в ней имеется недостаточно сахаров, являющихся субстратами молочнокислых бактерий. Если путем добавления ферментов обеспечить частичный гидролиз полисахаридов – клетчатки, крахмала, пектиновых веществ, гемицеллюлоз, то образуется больше сахаров для жизнедеятельности мо-

лочнокислых бактерий, в результате в силосируемой массе повышается концентрация молочной кислоты, обеспечивая снижение потерь питательных веществ и улучшение питательных свойств полученного таким путем корма. Хорошую эффективность при силосовании бобовых трав показали следующие ферментные препараты: целловиридин ГЗх, пектофоетидин ГЗх, пектаваморин Пх, глюкаваморин Пх, целлокандин ГЗх, целлолигнорин Пх. При силосовании картофеля рекомендуется применять амилоризин Пх, глюкаваморин Пх, пектаваморин Пх. При этом кормовая ценность получаемой силосной массы повышается на 15–18 %.

Ферментные препараты имеют существенное значение в технологиях приготовления кормов из соломы злаковых культур. Солома характеризуется высоким содержанием трудноусвояемых веществ – целлюлозы, ксиланов, лигнина – и низким содержанием белков. В ней почти нет растворимых углеводов, необходимых для развития молочнокислых бактерий. Поэтому при силосовании соломы применяются целлюлозоразлагающие ферментные препараты – целловиридин ГЗх, целлолигнорин Пх, целлокандин ГЗх, пектаваморин Пх. В результате действия этих препаратов в силосируемой массе повышается концентрация растворимых сахаров, за счет синтеза микроорганизмами увеличивается содержание сырого протеина (на 50 %).

Для получения соломоконцентратов обычно применяется смесь двух ферментных препаратов пектофоетидина ГЗх и глюкаваморина Пх, которые обеспечивают гидролиз полисахаридов. Затем на продуктах гидролиза выращивают кормовые дрожжи. Для лучшего роста дрожжей в соломоконцентрат добавляют мелассу, мочевину, кальциймонофосфат, хлорид натрия, необходимое количество воды. Получаемый таким способом корм имеет консистенцию силоса, а по питательной ценности приближается к хорошему луговому сену.

Соломоконцентраты могут быть получены в гранулированном виде и в этом случае могут сохранять свои питательные свойства длительное время – до 1 года. Переваримость клетчатки в таком корме повышается до 75–80%, содержание белков достигает 10–12 % от сухой массы.

Ферментные препараты применяются в процессе получения заменителей цельного молока для молодняка крупного рогатого скота из кормовых дрожжей, которые подвергаются гидролизу. В результа-

те гидролиза разрушается клеточная оболочка дрожжевых клеток и микробная биомасса переводится в легкоусвояемую форму, повышается содержание растворимых углеводов, незаменимых аминокислот и полиненасыщенных жирных кислот. Для гидролиза кормовых дрожжей обычно используют препараты – пектофоетидин ГЗх, дрожжелитин ГЗх, лизосубтилин Г10х.

Микробные ферментные препараты широко применяют в ветеринарии для лечения и диагностики многих заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц. Например, ферменты, способные разрушать клеточную оболочку и обладающие лизирующим действием, используются в лечении бактериальных и других заболеваний (сальмонеллез и попеллороз у птиц, эндометриты у коров и др.). Для этих целей применяются выпускаемые промышленностью ферментные препараты – лизоцим ГЗх, гликозидаза ГЗх, лизосубтилин Г10х, мальтаваморин Г10х, дрожжелитин ГЗх.

В результате того, что амилосубтилин ГЗх и протосубтилин ГЗх оказывают влияние на редуционную способность бактерий в желудочно-кишечном тракте животных, количество и подвижность инфузорий, переваривание целлюлозы и других трудноусвояемых углеводов, эти препараты используют для профилактики и лечения желудочных заболеваний, в частности алиментарных атоний преджелудков у жвачных животных. Ферменты, содержащиеся в этих препаратах, вызывают также гидролиз оболочек яиц гельминтов.

### Задания

1. Перечислите основных продуцентов ферментов.
2. Укажите, как обозначаются ферментные препараты.
3. Заполните таблицу 3.
4. Перечислите основные микробные препараты, укажите их значение

Таблица 3 – Применение ферментных препаратов в сельском хозяйстве

Область применения	Цель применения	Примеры

### Контрольные вопросы

1. Каким способом получают ферменты?
2. Какие продуценты ферментов существуют?
3. Как обозначают ферментные препараты?
4. Как используются ферментные препараты в животноводстве?
5. Как используются ферментные препараты в кормопроизводстве?
6. С какой целью применяют ферментные препараты в кормлении животных?

## ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 9.

### Технология получения биопрепаратов-симбионтов ЖКТ

**Цель занятия:** Ознакомиться с микроорганизмами- симбионтами ЖКТ животных, биопрепаратами, созданными на их основе и их применением в сельском хозяйстве.

Наряду с производством ферментных препаратов, выделяемых из микробных клеток, разработаны технологии получения биопрепаратов на основе живых микроорганизмов – симбионтов желудочно-кишечного тракта животных, которые в процессе своей жизнедеятельности синтезируют различные ферменты, витамины, незаменимые аминокислоты, антибиотики, вещества, обладающие гормональным действием, и таким образом активно участвуют в процессах пищеварения и синтеза веществ, не образующихся в клетках животных, защите от микробной инфекции.

Эффективные микробные препараты, широко используемые в животноводстве, производятся на основе пропионовокислых (пропиовит) и ацидофильных (пропиацид) бактерий, а также азотобактерий (азотацид).

Пропиовит представляет собой порошок серовато-песчаного цвета, содержащий в 1 г препарата 4–6 млрд бактерий и 80–100 мкг витамина В<sub>12</sub>, применяется для профилактики и лечения болезней желудочно-кишечного тракта у телят, поросят, цыплят. При его применении нормализуется рост и развитие молодняка сельскохозяйственных животных, повышается их устойчивость к инфекционным заболеваниям.

Пропиацид и азотацид – сухие препараты комбинированного действия, способствуют образованию в желудочно-кишечном тракте животных уравновешенных биоценозов, особенно они эффективны против дисбактериозов.

Для борьбы с бактериальными и вирусными желудочно-кишечными заболеваниями применяются бактериальные препараты на основе *Bac. subtilis*, *licheniformis*, *mucilaginosus*, которые, вероятно, действуют как источники биологически активных веществ – ферментов, витаминов, антибиотиков, гормонов.

Важной задачей ученых и специалистов, работающих в области сельскохозяйственной биотехнологии, является создание и внедрение в природные экосистемы желудочно-кишечного тракта животных высокоактивных штаммов микроорганизмов, способных к лучшему перевариванию целлюлозы и других углеводов, растительных белков и липидов, сверхсинтезу незаменимых аминокислот и витаминов. В настоящее время ведутся исследования по изучению микробных популяций рубца (преджелудка) жвачных животных, в котором подвергается перевариванию 70–85 % всего сухого вещества корма, проходящего через желудочно-кишечный тракт этих животных.

Рубец представляет собой высокоэффективную природную систему непрерывного культивирования анаэробных микроорганизмов – бактерий (*Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Eubacterium* и др.) и простейших (*Diplodinium*, *Entodinium*, *Ophryoscolex*, *Isotricha* и др.).

Слизистая оболочка рубца не образует собственных ферментов, и процесс переваривания пищи полностью происходит с помощью ферментных белков, вырабатываемых микроорганизмами. В результате жизнедеятельности микрофлоры в преджелудках жвачных животных гидролизуются практически все формы сложных углеводов (крахмал, пектиновые вещества, гемицеллюлозы, клетчатка, дисахариды), белки и липиды, подвергаются брожению моносахариды (глюкоза, фруктоза, манноза). Образующиеся в результате гидролиза сложных веществ моносахариды, аминокислоты и жирные кислоты используются животными в качестве источников энергии и в биосинтетических процессах. Сами микроорганизмы после их отмирания также перевариваются в рубце и становятся для животных источниками полноценных белков, незаменимых аминокислот, полиненасыщенных жирных кислот, витаминов.

Создание высокоактивных штаммов микроорганизмов и сбалансированных экосистем желудочно-кишечного тракта животных проводится как обычными методами генетики и селекции, так и с использованием мутагенеза и клонирования генов. Применение этих методов позволит целенаправленно изменять экосистемы желудочно-кишечного тракта животных в нужном направлении, добиваясь

улучшения усвояемости, корма, усиления синтеза полезных веществ, подавления патогенной микрофлоры.

### Контрольные вопросы

1. На основе каких микроорганизмов создаются биопрепараты пропиовит, азотоцид и пропиацид, и, какими свойствами они обладают?
2. Для борьбы с бактериальными и вирусными желудочно-кишечными заболеваниями применяют препараты на основе бактерий.
3. Образует ли слизистая рубца собственные ферменты?
4. Какими методами создаются высокоэффективные штаммы микроорганизмов для ЖКТ животных?
5. Для чего в кормлении применяют микробные препараты?

---

---

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алборова П.В., Козырев А.Х., Базаева Л.М., Ханаева Д.К. Экология. Рабочая тетрадь для лабораторно-практических занятий. Учебно-методическое пособие / Владикавказ, 2021.
2. Алборова П.В. Кормовая ценность донника желтого. В сборнике: перспективы развития АПК в современных условиях. Материалы 10-й международной научно-практической конференции. Владикавказ, 2021. С. 24-26.
4. Основы биотехнологии переработки с.-х. продукции. Методические указания к лабораторно-практическим занятиям. /Белооков А.А., Белоокова, О.В. Троицк, 2015 г. – 84 с.
5. Гореликова Г.А. Основы современной пищевой биотехнологии: Учебное пособие / Г.А. Гореликова. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2004. – 100 с.
7. Егорова Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. - М.: Издательский центр «Академия», 2005. - 208с.
8. Загоскина Н.В. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова. - М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.
9. Зубаиров Р.Г. Проблемы внедрения биотехнологии и первые результаты внедрения / Р.Г. Зубаиров // Практическая биотехнология в сельском хозяйстве, экологии, здравоохранении: сборник трудов. - М., 2006. - С. 10-12.
10. Рогов И.А. Пищевая биотехнология: Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Г.П. Шуваева. - М.: КолосС, 2004. - 440с.
11. Тихонов И.В. Биотехнология / И.В. Тихонов, Е.А. Рубан, Т.Н. Грязнева и др. - Спб.: ГИОРД, 2008. - 704с.
12. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха, Е.С. Воронин, Е.А. Калашникова и др. – 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Высшая школа, 2008. - 710 с.

## Содержание

ВВЕДЕНИЕ .....	3
Лабораторное занятие 1. Технология приготовления питательных сред для культивирования микроорганизмов .....	5
Лабораторное занятие 2. Подготовка биореактора к посеву и технология культивирования микроорганизмов .....	9
Лабораторное занятие 3. Биотехнология в получении пищевых компонентов микробного происхождения. ....	14
Лабораторное занятие 4. Биотехнология получение сыра .....	24
Лабораторное занятие 5. Биотехнология получения витаминов. ....	26
Лабораторное занятие 6. Требования, предъявляемые к пищевым и кормовым дрожжам .....	28
Лабораторное занятие 7. Производство и промышленное использование ферментов .....	31
Лабораторное занятие 8. Применение ферментативных препаратов в сельском хозяйстве .....	38
Лабораторное занятие 9. Технология получения биопрепаратов-симбионтов ЖКТ .....	44
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	47

---

Лицензия: ЛР. № 020574 от 6 мая 1998 г.

Подписано в печать 18.01.2022 г. Бумага писчая. Печать трафаретная.  
Бумага 60x84 1/16. Усл. печ. л. 3. Тираж 35. Заказ .

---

362040, Владикавказ, ул. Кирова, 37.  
Типография ФГБОУ ВО «Горский госагроуниверситет»