

## Лекция 6. Виды брожений

### Общая схема брожений.

Брожение — первая, самая древняя форма запасания энергии в форме АТФ которая проходит при помощи фосфорилирования субстратного и две формы так называемого мембранного окислительного фосфорилирования и фотофосфорилирования.

В замкнутых пространствах, в анаэробной среде, где будут проходить бродильные процессы, создаются трудные условия отсутствия внешнего акцептора электронов. Клетки должны решать проблему окисления-восстановления, поскольку при брожениях, глюкоза, как самый распространенный субстрат, окисляется, за счет чего клетки получают энергию и конструктивные материалы для того чтобы выстраивать новые клетки, для роста, размножения. Соответственно, им требуется большая часть восстановителей, которые они так же получают из субстрата — глюкозы. Если есть восстановление, то должна быть и окислительная часть. В среду выделяется окисленный продукт, это  $\text{CO}_2$  и органические кислоты. Сумма восстановительных эквивалентов и окислительных эквивалентов всегда сбалансирована и равна. Есть схема, которая описывает известные брожения:

Органическое вещество является донором электронов, оно претерпевает окислительные превращения, окисляется, образуя в результате промежуточные продукты. Электроны уходят на переносчики электронов ( $\text{NAD}^+$ ).

Промежуточный продукт фосфорилируется и получается фосфорилированная форма промежуточного продукта с макроэргическим фосфатом.

Макроэргическая связь реализуется в субстратном фосфорилировании. При этом, из АДФ получается АТФ и окисленное органическое вещество (\*)

Окисленное органическое вещество служит акцептором электронов.

Переносчики электронов, с доноров электронов переносят электроны на акцепторы электронов.

Органически окисленные вещества превращаются в восстановленные органические вещества — продукты брожения.

Окислительная часть (\*): образуются окисленные продукты брожения ( $\text{CO}_2$ ) — необходимо для баланса.

### Субстраты для брожений.

В брожение, обычно вступают субстраты, которые не полностью восстановлены и не полностью окислены (сахара, аминокислоты, некоторые органические кислоты). Например, углеводороды не могут сбрасываться в анаэробных условиях, для их окисления необходим кислород.

### Спиртовое брожение.

Спиртовое брожение известно человечеству более 6 тысяч лет. Спиртовое брожение было изучено еще Луи Пастером. Пастер доказал, что в анаэробных условиях проходит биологический процесс, который вызывается дрожжами и он показал, что дрожжи — это активные клетки, которые растут в аэробных условиях. Он выиграл спор с химиками того времени, немецкий химик Либих был тогда во главе химической группы, но выиграл спор Пастер. Он доказал, что спиртовое брожение идет с участием дрожжей. Химики же настаивали, что это химический процесс, а то что образуется,

например, осадок дрожжей после проведения спиртового брожения они объясняли образованием некоторого аморфного вещества, которое выпадает при этом в осадок при проведении химических процессов и это в общем случае никак не связано с жизнью и с жизнью живых организмов, поскольку без кислорода нет жизни. Пастер доказал, что без кислорода жизнь тоже существует, что есть анаэробные формы микроорганизмов. С тех пор стали известны анаэробные формы брожения, которое существует в достаточно широко представленном виде.

Затем, братья Бюхнер в начале 20 столетия показали, что спиртовое брожение можно провести и на экстрактах из дрожжей. Они растирали массу дрожжей с кварцевым песком, получая таким образом экстракт клеток и показали, что на выделенных экстрактах клеток (получается смесь ферментов), тоже получается этанол из глюкозы. Это положило начало основам энзимологии.

Брожение начинается с глюкозы, далее, через промежуточные реакции гликолиза превращается в 2 молекулы пировиноградной кислоты, которая расщепляется на 2 молекулы  $\text{CO}_2$  и 2 молекулы ацетальдегида, которые восстанавливаются в 2 молекулы этанола.

Кратко: промежуточное окисленное соединение ацетальдегид, за счет переносчиков электронов восстанавливается в этанол. На уровне гликолиза образуется АТФ за счет субстратного фосфорилирования из промежуточных продуктов.

В начале первой мировой войны Германию отделили, снабжение прекратилось и нужно было как то решать вопрос с производством взрывчатых веществ, что требовало большого количества глицерина. Германский исследователь Нейберг решил эту проблему с помощью дрожжей, с помощью спиртового брожения. Он добавил к бродящим культурам от дрожжей бисульфит, который связывал ацетальдегид. Реакция вошла в учебники по биохимии, как метод ловушки промежуточного продукта или метод ловушки метаболита. Ацетальдегид связывался с бисульфитом, но не мог восстановиться до этанола — вторая форма брожения по Нейбергу. В результате реакции образовывался ацетальдегидбисульфит, который не является субстратом для образования этанола. Восстановители шли на восстановление пировиноградной кислоты до глицерола. Продуктами реакции были глицерол,  $\text{CO}_2$  и связанный ацетальдегид.

Третья форма брожения по Нейбергу заключалась в том, что к бродящей массе дрожжей добавляли фосфат. В результате клетки вырабатывали этанол, глицерол  $\text{CO}_2$  и сульфит.

Дрожжи не единственные представители, которые могут образовывать этанол. Этанол образуют ещё некоторые бактерии, например, такая бактерия как *Zygomonas mobilis*, которая была выделена в Мексике из сока агавы. Мексиканцы делали из сладкого сока агавы напиток, который назывался пульки, потом разработали способ перегонки спирта из этого мексиканского напитка пульке и получили известный напиток текила. То есть текила, это самогон из бродящего при  $40^\circ\text{C}$  сока агавы. *Zygomonas mobilis* интересен тем, что он может выдерживать брожения до  $42^\circ\text{C}$ , то есть температура при котором можно проводить а брожение *Zygomonas mobilis* может достигать  $42^\circ\text{C}$ , это очень выгодно для жарких стран для Бразилии например где ведут производство спирта из сахарного тростника именно с помощью *Zygomonas mobilis*, а не с помощью дрожжей поскольку дрожжи прекращают свой метаболизм и образование спирта при температуре чуть выше  $30^\circ\text{C}$ . При  $31^\circ\text{C}$  дрожжи уже плохо

себя, чувствуют, поэтому летом в жарких странах ферментеры на больших бродительных производствах приходится охлаждать. Охлаждать теплой водой, которая идет из водопроводного крана не очень эффективно, поэтому очень много энергии тратится именно на охлаждение больших ферментеров. Это проблема, поэтому повышение температуры брожения на 10 или даже 12°C дает очень большой экономический эффект при производстве спирта, в основном, топливного этанола.

При брожении, *Zygomonas mobilis* сбраживают глюкозу до виноградной кислоты с помощью КДФГ пути. Глюкоза сбраживается, получается 2 молекулы пировиноградной кислоты, а дальше все тоже самое как у дрожжей — ацетальдегид и этанол на конечных этапах от пирувата до этанола. Но на пути от глюкозы до пирувата, действует другой путь расщепления сахаров у *Zygomonas mobilis*.

Спиртовое брожение применяют практически во всех странах. Получают и питьевой спирт и топливный в качестве присадки к топливу, кроме того, дрожжи применяют в хлебопекарной промышленности при выпечке хлеба используются как раз свойства дрожжей образовывать CO<sub>2</sub>, а при брожении CO<sub>2</sub> разрыхляет хлеб опара поднимается, поднимая тесто и хлеб получается более пышный и насыщенный CO<sub>2</sub>. Производство дрожжей для пищевых и технических целей существует практически во всех странах мира, везде есть дрожжевые заводы и спиртовые производства. Кроме того, огромное количество дрожжей производится на дрожжевых заводах и используются в качестве дрожжей для домашнего хозяйства.

### Молочнокислородное брожение.

Молочнокислородное брожение, это тоже древний способ сохранения молока и молочных продуктов. Известно человечеству около 6000 лет. В нем используют молочнокислородные бактерии для сквашивания молока и для хранения молока на длительный период. Молоко — очень богатый субстрат для многих микроорганизмов и если его не сохранять, оно портится очень быстро. Но молочнокислородные бактерии приспособились жить в молоке, они приспособились использовать молочный сахар (лактоза), который находится только в молоке, в растительном мире не встречаются, они нашли свою нишу в этом субстрате. Молочнокислородные бактерии очень быстро сквашивают молоко образуют при этом, молочную кислоту в одном случае, в других случаях образуют молочную кислоту + ацетат + этанол и CO<sub>2</sub>. Молочнокислородные бактерии очень быстро снижают pH своего микроокружения, при котором очень немногие микроорганизмы могут выживать и расти. Таким образом, молочнокислородные бактерии защищают свой субстрат и свое микроокружение. Кроме того, в последнее время выяснено что молочнокислородные бактерии способны также создавать специальные вещества которые по сути являются антибиотиками, но антибиотиками их не называют, чтобы люди не боялись их употреблять. Они образуют так называемые бактерицины — это вещества пептидной природы, которые влияют на микроокружение и на другие чужеродные бактерии. Таким образом, они защищают свое микроокружение. Человечество научилось использовать эти бактерицины в своих целях для защиты пищевых продуктов от поражения микроорганизмами бактериями или даже грибами (слабое влияние). Отмечается успешное и эффективное воздействие на грамположительные бактерии, поэтому бактерицины, одним из самых известных которых является лизин, широко применяется в пищевой промышленности для защиты готовых продуктов, мясных, рыбных консервов, молочных продуктов сыров и так

далее. Молочнокислые бактерии, являются не спорообразующими, а анаэробными по своей сути, но они относятся к так называемым аэротолерантным анаэробам — кислород не влияет на их метаболизм, то есть, он не угнетает рост и развитие этих микроорганизмов, и они в присутствии кислорода не переключаются с брожений на дыхание клетки. Они не способны к дыханию у них нет генов, которые бы приводили к синтезу цитохромов, например, оксидаз. Они не способны синтезировать гем однако есть сведения что присутствие гемина (вещество-предшественник гемов) они способны синтезировать гем, но тем не менее, полноценного цитохромов и дыхания у них все равно не получается. В последнее время появились работы о том, что некоторые молочнокислые бактерии способны поглощать кислород, но природа этого явления пока еще до конца не изучена. Молочнокислые бактерии делятся на две большие группы они практически одинаковые по численности — так называемые гомо и гетеро ферментативные молочнокислые бактерии. Все они за исключением одного рода спор не образуют. Проводят молочнокислое брожение двумя способами:

Гомоферментативный способ молочнокислого брожения заключается в том, что гидролизуют лактозу, получается глюкоза и галактоза, из глюкозы затем образуется две молекулы молочной кислоты с помощью гликолиза расщепляет и превращается в 2 молекулы пировиноградной кислоты. Промежуточный продукт — пировиноградная кислота восстанавливается в молочную кислоту. В гомоферментативном молочнокислом брожение на 95% образуется. молочная кислота, остальные 5% иногда до 10% а это ацетат,  $\text{CO}_2$  и этанол.

Гетероферментативное молочнокислое брожение проходит по другой схеме: глюкоза с помощью пентозофосфатного пути превращения глюкозы превращается сначала в фосфоглицериновой альдегид, затем в две молекулы пировиноградной кислоты. Одна молекула пировиноградной кислоты восстанавливается в лактат, а вторая молекула расщепляется на  $\text{CO}_2$  и ацетилкофермент А. Ацетилкофермент А через несколько стадий превращается в этанол.

По другому пути образуется ацетилкофермент А, ацетилфосфат и затем ацетат.

В зависимости от условий, от pH, от температуры могут образовываться разные вещества в разных пропорциях.

Гетероферментативное молочнокислое брожение используется в заквасочных культурах для приготовления так называемых сочных кормов для хранения сочных кормов для сельского хозяйства для кормления животных в зимний период, а кроме того, гетероферментативное молочнокислое брожение проходит также при квашении капусты, засолке огурцов. Там выделяется  $\text{CO}_2$  и небольшое количество этанола и образуется молочная кислота, которая собственно и консервирует этим продукты.

Молочнокислые бактерии в настоящее время испытывают бум интереса, поскольку их повсеместно признают, как безопасных для человека и к ним предъявляют гораздо меньше требований по безопасности, когда они вводятся в пищевые субстраты. То есть, не нужно получать многочисленные разрешения, потому что считается, что молочнокислые бактерии обладают так называемым статусом GRAS (generally recognized as safe), что переводится как повсеместно признано безопасными. Действительно, на протяжении больше чем в 6 веков использования нет никаких свидетельств о том, чтобы молочнокислые бактерии являлись возбудителем каких-то болезней, кроме того, они гипоаллергенны, не токсичны.

Молочнокислые бактерии применяют в качестве пробиотиков (приносящие/поддерживающие жизнь). Термин пробиотики возник сравнительно недавно, их добавляют в корма или в пищу. Считается, что человеку нужно регулярно принимать молочнокислые продукты для того чтобы поддерживать статус своего организма, содержать кишечник в нормальном режиме функционирования. О том, что нужно регулярно принимать такие препараты свидетельствуют результаты эксперимента, которые были проведены в Финляндии. Финские ученые очень много занимаются пробиотиками в общем молочнокислыми продуктами традиционно, давно и очень широко применяется в Финляндии и они сделали тест: они вывели пробиотик в котором установили точечную последовательность одного гена из 20-25 нуклеотидов. К такой нуклеотидной цепи привязали флуоресцентный краситель на препаратах, когда проводится такая гибридизация это называется метод FISH (fluorescent in situ hybridisation). На свету можно легко увидеть какие клетки будут флуоресцировать, значит туда попала эта метка, которая видоспецифично связывается с микроорганизмами. Они добавили этот пробиотик в йогурт и давали его пить двадцати студентам-медикам, которые в течение 2 недель принимали этот йогурт ежедневно и затем начался эксперимент они должны были каждый день приносить в лабораторию на анализ образцы своих каловых масс. В лаборатории ставили FISH эксперимент и определяли наличие вот флуоресцирующих микроорганизмов. Затем прекратился прием этого препарата с этим известным микроорганизмом, а эксперименты по их выявлению продолжились. Через две недели уже ни одной клетки не было ни у одного из испытуемых. Это говорит о том, что молочнокислые бактерии к сожалению, не могут раз и навсегда установиться в своей экологической нише в толстом кишечнике. Они как бы туда входят какое-то время пребывают и затем вымываются, то есть у них низкая способность к адгезии к клеткам, выстилающим толстый кишечник, поэтому регулярный прием молочнокислых продуктов рекомендован и этот эксперимент как раз подтверждает для чего это нужно делать.

### **Бифидобактерии. Их брожение.**

Среди молочнокислых бактерий широко известны так называемые бифидобактерии. Считается, что именно бифидобактерии являются наиболее эффективными пробиотическими культурами, поскольку они с самого начала младенческого возраста занимают кишечник. На само деле, они не первыми появляются в кишечнике. Первыми в кишечнике младенца при грудном вскармливании проявляется *E.coli*, они очень быстро поглощают кислород со стенок кишечника и в просвете кишечника и делают эту среду уже благоприятной для заселения анаэробными бифидобактериями. В кишечнике младенцев при грудном вскармливании до 20% от всей микробиоты составляют именно бифидобактерии.

Бифидобактерии проводят гетероферментативное молочнокислое брожение, но у них есть собственный путь сбраживания глюкозы, который не приводит к образованию  $CO_2$  то есть из глюкозы получают такие продукты, как ацетат и лактат без образования  $CO_2$ , что очень важно для младенцев.

Брожение осуществляется следующим образом:

Две молекулы глюкозы фосфорилируются за счет 2 молекул АТФ, образуется 2 молекулы глюкозо-6-фосфата, которые после изомеризуются в две молекулы фруктозо-6-фосфата. Одна молекула фруктозо-6-фосфата превращается в эритрозо-4-фосфат и

ацетилфосфат. Ацетилфосфат за счет субстратного фосфорилирования образует АТФ и превращается в ацетат.

Эритрозо-4-фосфат реагирует со второй молекулой фруктозо-6-фосфата и за счет осуществления транскеталазной реакции образуются два сахара: седогептулоза + фосфоглицериновый альдегид. Эти две молекулы вступают на путь превращений, образуя в конечном итоге 2 молекулы фосфоглицеринового альдегида и две молекулы ацетилфосфата. Из двух молекул ацетилфосфата образуется два ацетата и две молекулы АТФ. Из фосфоглицеринового альдегида образуется две молекулы пировиноградной кислоты, которые восстанавливаются за счет двух молекул пиридина в две молекулы молочной кислоты (лактат).

Поэтому, по классическому брожению бифидобактерий из двух молекул глюкозы образуется 3 ацетата + 2 лактата + 1 АТФ. Данный процесс характерен и для других бифидобактерий, они всегда находятся в дефиците по АТФ в силу метаболических возможностей по превращению глюкозы в свои продукты. АТФ образуется сравнительно мало если сравнивать с количеством образованных продуктов, поэтому, растут они довольно скудно, образуют не большую биомассу, из-за нехватки энергии. Зато они превращают большие количества субстрата, лактозы в продукты брожения — в молочную кислоту, уксусную кислоту этанол и др.

### **Свойства пробиотиков и пребиотиков.**

Сейчас, многие лаборатории мира работают над созданием новых более эффективных бактерицидных антибиотиков, которые образуются молочнокислыми бактериями. Некоторые бактерицидные молочнокислые бактерии эффективны в отношении подавления роста грибов, такие бактерицидные пробиотики уже выделяются и применяются. Ведутся непрерывные поиски новых более эффективных пробиотических культур, которые должны отвечать таким пробиотическим требованиям, как аэротолерантность, потому что при производстве таких культур не будет слишком сложно, дорого и трудоемко выращивать, центрифугировать и получать сухие препараты, как в анаэробных условиях, поэтому такие пробиотические культуры должны быть аэротолерантными, прежде всего, чтоб они не погибали при контакте с кислородом. Они должны удерживать желудочные и кишечные стрессы. В нормальном желудке, как известно, рН достигает 1 или 2, поэтому при попадании в такую сильно кислую среду многие бактерии гибнут, для человека это хорошо потому что это является барьером против проникновения чужеродных микроорганизмов в нашу среду, соответственно пробиотические культуры должны быть защищены какой-то оболочкой, либо они должны быть достаточно устойчивы к кратковременным действиям такого стресса — 1-3 часа они должны выдерживать кишечной стресс. Дальше они попадают в двенадцатиперстную кишку, где происходит контакт с желчными кислотами поэтому, они должны быть устойчивы к действию и желчных кислот на протяжении примерно 5 часов. Они должны удерживать хранения культуры в наиболее эффективном и широко применяемом методе — в лиофильном состоянии, поскольку для промышленности очень важно, как сохранять такие лиофильные культуры, в том числе и пробиотики. После хранения они должны храниться 1-3 года без пересева, поскольку пересев, это очень трудоемкое, дорогостоящее мероприятие. Поэтому, чем дольше они хранятся, тем а лучше в таком вот лиофилизированном виде. Еще одно свойство эффективных пробиотиков, это способность к адгезии. Ее тоже

изучают в мышинных экспериментах и экспериментах с культурами человеческих клеток. В эксперименте смотрят, как клетки адгезируют, то есть прикрепляется к клеткам, например, кишечника. Это очень важное свойство с тем чтобы они не быстро вымывались бы из кишечника. Априори культуры, которые в будущем будут применять в качестве пробиотических культур, должны быть непатогенные, не токсичные и не аллергенны. На рынке этих пробиотических культур сейчас уже очень много, но тем не менее постоянно ведутся поиски новых более эффективных, пробиотиков.

В понятие пробиотика входит еще понятие пребиотика. Пребиотики, это обычно химические вещества, какие-то субстраты, которые поддерживают рост пробиотических культур. Обычно в капсулу добавляют не только живые клетки пробиотических культур, но еще и субстраты, которые на первое время будут поддерживать рост этих пробиотиков в кишечнике. Препараты, которые совместно содержат пребиотики и пробиотики называют синбиотики.

### **Пропионовокислое брожение.**

Брожение пропионовокислых бактерий. Пропионовые бактерии были выделены в начале 1930 годов, их экологической нишей считают производственную нишу, например, при выдерживании сыров типа швейцарских вносят закваску, содержащие пропионовокислые бактерии.

Пропионовокислые бактерии появились где-то на заре технологии приготовления сыров, когда сыры выдерживают и готовили в емкостях сделанных из желудков телят. Из желудка телят пропионовокислые бактерии попадали в сыры, они предавали специфический вкус, который понравился людям и уже после начали чистые культуры добавлять в сыры твердых сортов. На пропионовокислых бактериях, делали научные эксперименты, и один из этих экспериментов увенчался открытием так называемой гетеротрофной фиксации  $\text{CO}_2$  — это реакции по которой неорганические источник углерода фиксируется/присоединяется к каким-нибудь органическим молекулам и таких реакции известно несколько, все они получили название «реакции гетеротрофной фиксации». Всего было открыто две самые известные реакции — это фиксация  $\text{CO}_2$  на ацетате. Она была открыта в 1936 году американским исследователем Харландом Вудом. В 1936 году не было меченых изотопов — удобных веществ, которые бы показали наличие этих веществ. Он проводил эти эксперименты тщательным взвешиванием аналитическим путем вычислял сколько  $\text{CO}_2$  выделилось, сколько глюкозы использовали пропионовые бактерии. Он делал доклад о том, что пропионовокислые бактерии фиксируют  $\text{CO}_2$  за счет пропионовой реакции фиксации  $\text{CO}_2$ , после, реакцию назвали «реакция Вуда-Вергмана» в честь Харланда Вуда и его научного руководителя.

Сейчас, реакция Вуда-Вергмана вошла во все учебники по биохимии и представляет собой гетеротрофную фиксацию  $\text{CO}_2$  на ацетате, пирувате и др. Среди пропионовокислыми бактериями есть связанные с молочнокислым брожением и кожные, вызывающие угревую сыпь. С пропионовокислыми кожными бактериями успешно борются, находят какие-то препараты, которые подавляют их развитие а вот молочнокислые пропионовокислые бактерии изучают в другом аспекте и некоторые даже предлагают пропионовокислые бактерии также ввести в состав пробиотических культур, их так же еще называют классическими пропионовокислыми бактериями

Пропионовокислое брожение начинается с глюкозы: глюкоза посредством гликолиза превращается в пировиноградную кислоту (которая так же может поучиться из лактата, пируват).

Пировиноградная кислота может превратиться в ацетилкофермент А с выделением  $\text{CO}_2$  и двух протонов, после она превращается в ацетат и АТФ.

Другая ветвь брожения включает фиксацию  $\text{CO}_2$  на пировиноградной кислоте с образованием оксалоацетата, который восстанавливается до малата. Малат превращается в фумаровую кислоту, которая восстанавливается в сукцинат (янтарную кислоту) с образованием АТФ — фумаратное дыхание.

Фумарат превращается в сукцинат, который с присоединением кофермента А превращается в сукцинилкофермент А.

Сукцинилкофермент А с помощью фермента, содержащего P12 в качестве протестической группы превращается в метилмалонил-кофермент А. Метилмалонил-кофермент А передает  $\text{CO}_2$  на пировиноградную кислоту и превращается в пропионилкофермент А.

Пропионилкофермент А отдает кофермент А сукцинату и превращается в пропионат.

Пропионовокислые бактерии применяются в пищевой промышленности в качестве закваски при приготовлении сыров. Они являются продуцентами витамина B12, который идет в медицину. Витамин B12 синтезируется в больших концентрациях, превышающих их собственные потребности. Для синтеза витамина B12 нужен кобальт. В зависимости от концентрации кобальта, который добавляют в среду, будет происходить синтез витамина B12 до определенной концентрации. Оказалось, что Разрыв между минимальной и максимальной концентрацией кобальта при которой все функции клетки протекают нормально может составлять 1000 раз. То есть, клетки пропионовокислых бактерий по непонятным причинам могут синтезировать в 1000 раз больше витамина B12, чем им нужно для собственных нужд. Данное свойство активно используется в биотехнологии — на средах с кобальтом выращиваются пропионовокислые бактерии, очищаются и используются в медицинской практике. Людям с анемией, с нарушенной кроветворной способностью ставят уколы с витамином B12. На самом деле, чемпионами мира по производству витамина B12 в расчёте на клетку являются метанобразующие археи. Они образуют в 3-5 раз больше витамина B12, чем самые продуктивные пропионовокислые бактерии, но способ добычи этого витамина B12 значительно сложнее, он происходит из ила очистных сооружений. После проведения анаэробного метанового брожения образуется биомасса, содержащих метанобразующие бактерии, которые экстрагируют, добывают витамин B12, и очищают. Но его запрещено применять в медицинской промышленности, его применяют только как добавку в корм скоту в сельском хозяйстве.

Еще один витамин, который синтезируют пропионовокислые бактерии, это витамин H или биотин, который тоже достаточно в большом количестве синтезируется, но не являются сверхпродуцентами. Промышленное производство биотина основано на культивировании других микроорганизмов.

### **Маслянокислое и ацетонобутиловое брожение.**

Маслянокислое и ацетонобутиловое брожение стали использовать для производства ацетона и бутанола в период первой мировой войны в начале в Великобритании, затем в Германии. Ацетон шел на производство кордита — взрывчатого вещества, а бутанол впоследствии уже после 1930 годов стали применять для изготовления искусственного каучука (искусственной резины). Это брожение свойственно представителям рода клостридий — это анаэробные спорообразующие бактерии, которые в большинстве своем не переносят контакта с кислородом и быстро погибают при контакте с кислородом, поэтому с ними приходится работать в анаэробных условиях и поддерживать культуру. Они эффективно разлагают полисахариды такие как крахмал, некоторые даже разлагают целлюлозу и образуют при этом масляную кислоту, молочную кислоту, уксусную кислоту, а затем включается один ген в работу, который начинает вырабатывать фермент, который начинает переводить углерод, поступающий от глюкозы на другие продукты. Во второй фазе поражения, которая наступает через какой-то промежуток они начинают сбрасывать электроны которые продолжают поступать от глюкозы на преобразованные органические кислоты, такие как масляная кислот, уксусная кислота и превращает их в бутанолмасляную кислоту и в этанолуксусную кислоту. Кроме того образуется и ацетон. Это свойство было обнаружено и использовано для целей производства. С России производство ацетона и бутанола была запущено в 1935 году в г. Грозный. У истоков разработки стоял заведующий кафедры микробиологии Владимир Николаевич Шапошников. За внедрение научных разработок в практику он был удостоен правительственных наград, за учебник по микробиологии был удостоен сталинской премии.

Ацетонобутиловое брожение характеризуется наличием двух фаз. Рост клеток идет по стандартной S-образной кривой. В первую фазу клетки образуют кислоты, которые нарастают и затем снижаются. При этом, наблюдается снижение рН которое по мере уменьшения количества кислот увеличивается. Образование нейтральных продуктов так же имеет вид S-образной кривой (ацетон, этанол, бутанол). Первая и вторая фаза брожения находятся соответственно до и после достижения максимума образования кислот.

В первую фазу клетки активно растут, соответственно, восстановители идут на рост клеток. Их потребление занимает биомасса, поэтому клетки выбрасывают в среду окисленные формы брожения, а окисленные они тратят на свой собственный рост. Когда рН снижается до определенного момента — рН 5, начинается синтез фермента, который преобразует углеродный обмен клетки и начинается сброс электронов на кислоты. Кислоты начинают уменьшаться, зато вместо этого начинается синтез нейтральных продуктов. Клетки находят новых доноров электронов и сбрасывают туда восстановители и восстанавливают кислоты до нейтральных продуктов брожения, что и требуется для производства.

Клостридии делятся на так называемые пуринолитические и на сахаролитические. Микроорганизмы, которые вызывают образование ацетона, бутила, относятся к сахаролитическим, то есть они расщепляются сахара, растут на полисахаридах, таких как крахмале (производство в Грозном было основано на картофельном крахмале). Пуринолитические клостридии в природе расщепляют ДНК, РНК и сбраживают пурины, применяют серу превращаются в какие-то продукты, а вот протолитические клостридии очень опасны для человека. Они расщепляют белки и

один класс из их вызывает токсичных нейротоксинов в продуктах домашнего приготовления, например там есть белок который не выдерживает значение рН меньше 5, он угнетает их рост и такие клостридии могут развиваться в продуктах домашнего изготовления, если они приготовлены без добавления например уксусной кислоты, то там может клостридии, образующие нейротоксин ботулизма, который является самым мощным нейротоксином на земле. Человек умирает очень быстро от паралича мышц. Есть ещё столбнячный токсин, который образует токсин при попадании в кровоток, при этом возникает столбнячный синдром, который приводит к смерти от столбняка. К счастью есть вакцина противостолбнячная, которую раз в 5 лет нужно всем принимать: уколиться и на 5 лет забыть о столбняке.

Кровоток останавливают пережатием сосудов, конечность остается без кислорода, в результате, если в рану попала грязь, то происходит быстрое развитие микроорганизмов, развивается гангрена и самым эффективным средством является ампутация конечности. Поэтому, до появления антибиотиков, много людей лишались конечностей на поле боя.