



TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI TOIMETISED  
УЧЁНЫЕ ЗАПИСКИ ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА  
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS

BIOLOOGILISED TEADUSED

**5**

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

---

Г. Я. КАЛЛАС

**ВЫВЕДЕНИЕ НОВОГО УСТОЙЧИВОГО ШТАМА  
АЦЕТОНО-БУТИЛОВЫХ БАКТЕРИЙ**



ГИЗ „НАУЧНАЯ ЛИТЕРАТУРА“



TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI TOIMETISED  
УЧЁНЫЕ ЗАПИСКИ ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА  
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS

BIOLOGILISED TEADUSED

**5**

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

---

Г. Я. КАЛЛАС

**ВЫВЕДЕНИЕ НОВОГО УСТОЙЧИВОГО ШТАМА  
АЦЕТОНО-БУТИЛОВЫХ БАКТЕРИЙ**



ГИЗ „НАУЧНАЯ ЛИТЕРАТУРА“

ТАРТУ, 1949

TRÜ Taimefüsioloogia Kateeder.  
Juhataja: H. Kallas.

TRÜ Toimetiste kolleegium: V. Hiie, H. Keres, R. Kleis, A. Muuga, K. Orviku,  
V. Ritslaid, E. Talvik, J. Tehver, A. Uibo, A. Vaga, A. Valdes, A. Vassar, J. V. Veski.  
Peatoimetaja: dots. K. Taev.

Недостатки в области освоения, разведения и хранения спор бактерий ацетоно-бутилового брожения на крупном помеле кукурузной муки ставили порой производство под серьёзную угрозу потери основного штамма культуры.

С целью обеспечить производство устойчивым запасным штамом культуры и была начата настоящая работа. Испытывая элективную культуру, мы вывели новый штам, который отличается своей высокой устойчивостью и имеет ряд других преимуществ перед существующими штаммами.

В основу работы был положен принцип проведения жёсткого отбора на том субстрате, на котором культура будет использована в производстве. Мы подобрали такие условия, которые обеспечивают зарождение, быстрый рост и размножение желаемого организма. При этом мы исходили из опыта Виноградского, который ещё в 1892 г. ввёл приём элективной культуры, предшествующий выделению чистой линии. Как известно, тот же приём был с успехом использован В. Омелянским (1900—1905 г.) при выведении микроорганизмов, сбразживающих клетчатку.

## I. Методика работы.

### Выведение элективной культуры.

5 %-й затор из кукурузной муки крупного помола наливают в пробирки, закрывают их ватными пробками, стерилизуют  $1\frac{1}{2}$  часа при  $1\frac{1}{2}$  атм. и охлаждают до  $36^{\circ}\text{C}$ . Затем содержимое пробирок заражают свежей, нестерильной болтушкой из кукурузной муки крупного помола в количестве 0,5 мл на 10 мл затора.

Для создания анаэробных условий, способствующих развитию ацетано-бутиловых бактерий, в пробирки, на затор стерильно на-слаивают пипеткой 2,5 мл генераторного масла. После этого пробирки пастеризуют 45 сек при  $100^{\circ}\text{C}$  в аппарате Коха, быстро охлаждают до  $37^{\circ}\text{C}$  и ставят бродить в термостат при  $37^{\circ}\text{C}$ .

После разбраживания затора в пробирки добавляют (стерильно) 0,5 мл бутилового спирта. Содержимое пробирок слегка взбалтывают и вновь ставят в термостат на 24 часа. Из этих пробирок производят затем заражение склянок со стерильным 6 %-м затором (200—400 мл) кукурузной муки крупного помола. В заражённые таким способом склянки стерильно добавляют 0,5 % до 0,7 %, по объёму, нормального бутилового спирта, закрывают ватными пробками и ставят в термостат.

Через 24 часа производят пересев в подобные же склянки по уже описанной методике, только без добавления бутилового спирта. Таким образом производят пересев до 7-ой генерации включительно. Во всех случаях процент инокулята по объёму = 2,5 %. Все склянки выдерживают при  $37^{\circ}\text{C}$  60 час., после чего их содержимое анализируют на ацетон и кислотность.

Ацетон определяется по методу Мезигера в граммах на литр бражки; кислотность — титрованием в мл N/10 NaOH на 10 мл бражки.

Испытание выведенной культуры производят на 6‰, 8‰ и 6‰-х заторах. Элективная культура, с наилучшими результатами, берётся для получения спор на 5‰, 6‰ и 8‰-й конц. того же затора. Стерилизация затора при испытании, заготовке и размножении спор продолжается 2 часа при 2 атм. Полученные споры хранятся в склянках с ватными пробками, хотя лучше их хранить в запаянных пробирках до 1—2 м-цев, после чего вновь испытывают на заторе 6‰, 8‰ и 9‰-й конц.

Предварительное двукратное испытание спор производится на 7—12-ый день. Из спор, оказавшихся лучшими, заготавливаются новые споры.

Пробирки с новыми спорами, после 72 час. брожения, пастеризуются 45 ск при 100°С в аппарате Коха, а затем запаиваются.

Для выведения ацетоно-бутиловых бактерий существует много методов, напр., Hasse W. (1885), Hall (1929), Мантейфель (1940) и др., но они являются слишком затяжными и не гарантирующими чистоту и ценность культуры, поэтому мы применили свою оригинальную методику, гарантирующую быстроту выведения необходимого типа культуры и его высокую ценность, соответствующую поставленным задачам. По нашей методике уже через 15 дней можно получить устойчивую элективную культуру.

## II. Выведение чистой линии.

### 1. Выделение культуры.

Из запаянной пробирки культуры, условно обозначенной как „А<sub>5</sub>“, стерильно берётся капля жидкого затора с культурой и разводится в 10 мл дистиллированной воды в пробирке. После лёгкого взбалтывания из той же пробирки, методом разлива на поверхность, производится посев спор на сусловый агар-агар в чашки Петри. Чашки Петри выдерживаются 24 часа в термостате при 37° С, после чего платиновой петелькой отдельные колонии бактерий пересеваются на косой сусловый агар-агар в пробирки и, параллельно, в пробирки с 5 0/0-м стерильным затором из кукурузной муки крупного помола. После заражения все пробирки ставятся в термостат при 37° С на 24 часа.

### 2. Пересев.

После разбраживания производится пересев в склянки, содержащие 200 мл стерильного 6 0/0-го затора. Когда склянки разбродились, из них производится новый пересев в подобные же склянки с 6 0/0-м стерильным затором из той же муки, и одновременно для проверки чистоты линии на сусловый агар-агар в чашки Петри.

Из тех склянок с 6 0/0-м затором, которые дали хорошие результаты сбраживания, производился новый пересев в склянки с 6 0/0 и 9 0/0-й концент. затора для испытания свойств отдельных чистых линий, с 2,5 0/0-м инокулятом. Одной чистой линией заражаются: две склянки с 200 мл 9 0/0-го затора каждая (для анализа на газо-выделение); две склянки с 400 мл 9 0/0-го затора каждая (для определения кислотности и выхода ацетона) и одна склянка 6 0/0-го затора (200 мл или 400 мл) для инокуляции последующих генераций.



Из этих склянок через 18—24 час. производится инокуляция новой серии склянок последующей генерации или препаратов чистой культуры (для краткости в дальнейшем будем их называть сокращённо АЧК). Объём затора АЧК 8 литр.

Чистые линии с лучшими результатами при предварительном испытании испытывают вновь до 7-ой или до 9-ой и 10-ой генерации.

### 3. Производство химических анализов.

Из склянок, оставленных на определение кислотности, начиная с 12-го часа брожения и до установления спада кислотности, берутся пробы через каждые 1—2 часа, а затем, после спада кислотности, через каждые 4 часа. Взятие проб производится стерильно, при помощи пипетки Мора на 20 мл.

Для определения газовыделения берутся склянки ёмкостью 200—250 мл затора. После инокуляции склянки стерильно закрываются резиновыми пробками, с затвором с серной кислотой. Склянки вместе с затвором взвешиваются с точностью до 0,01 гр. и затем ставятся в термостат при 37°С, и по разности в весе при повторных взвешиваниях (через определённые отрезки времени) определяется газовыделение. По окончании брожения из тех же склянок производится анализ на ацетон и остаточный сахар (по Бертрау).

Выходы газа и ацетона учитываются в граммах на 1 литр затора или бражки, сахар — в % к бражке.

Присутствие крахмала определяется добавлением иода в пробу затора.

Из АЧК после окончания брожения берётся проба на конечную кислотность, ацетон и 2 литра бражки для разгонки на лабораторной колонке. Общее количество сольвентов определяется методом высаливания поташом.

Во всех случаях затор изготавливается из кукурузной муки крупного помола с содержанием крахмала в 68%.

### 4. Микроскопический анализ.

Микроскопический анализ культуры производится по методике, разработанной Институтом микробиологии АН СССР. Данные анализа указаны в графе „мазок“. Дается краткая характеристика

культуры или её „типа“ по стадиям развития и подвижности культуры. При этом различают следующие стадии развития:

- 1) единичные неравномерные по величине палочки;
- 2) единичные равномерные, нормальной величины палочки;
- 3) парные палочки, слившиеся под углом, близким к  $90^{\circ}$ ;
- 4) неравномерные по величине и неоднородные палочки со спорами;
- 5) свободные споры.

Встречаются также палочки, в различной степени атрофированные и автолизирующиеся. Каждый тип обозначается сокращённо соответствующими римскими цифрами.

Подвижность различают как „очень хорошую“, „очень быструю“ и т. д. Оценка подвижности — сокращённо обозначается „ср.“ или „3“, „оч. хор.“ или „5“ и т. д. Наблюдается и неподвижность культуры, что свойственно аномальному состоянию культуры в процессе брожения или в период спорообразования — обозначается сокращённо „нп“ или „1“. В случае, если встречается неоднородность по подвижности или стадии развития, то соответствующие стадии и группы подвижностей обозначают как II—III, III—IV, „хор.-ср.“ и т. д. Если от преобладающих стадий развития или групп движения отличаются лишь единичные организмы, тогда обозначают: III — ед. IV, или по подвижности „хор.“, „ед. ср.“, „5“ — „ед. 3“ и т. д.

### 5. Характеристика по внешнему виду.

Различают следующие фазы брожения:

- 1) Фаза разбраживания, т. е. появление единичных пузырьков газа.
- 2) Фаза активного брожения, т. е. активного выделения газа, — обозначается сокращённо „газ“.
- 3) Фаза, когда затор тягучий в виде взвеси, — обозначается сокращённо „взв“.
- 4) Фаза, когда затор поднимается к поверхности в виде ноздреватой тягучей массы, — обозначается сокращённо „под“.
- 5) Фаза осаждения и разложения слизистой массы. Ранее поднявшаяся на поверхность слизистая масса теряет свою вязкость, разлагается и осаждается на дно сосуда, — обозначается сокращённо „ос“.

Когда наблюдается промежуточное положение между четвёртой и пятой фазами, то это состояние обозначается сокращённо „ос-взв“. Это соответствует моменту начала разложения поднятой слизи.

## 6. Заготовка спор.

После всех испытаний по генерациям производится заготовка спор лучших чистых линий, условно обозначенных „А“ и „К“.

Заготовка производится массовым высевом в пробирки со стерильным 5%-м затором кукурузной муки крупного помола, которые после 72 часов брожения и пастеризации 45 ск при 100° С запаиваются. Затор для заготовок стерилизуется 1½ часа при 1½ атм. После нескольких дней лёжки (на выдержку) проверялись 2-е пробирки спор до 10-ой генерации включительно (чистой линии штамма „К“). При этом учитывались активность культуры и быстрота сбраживания затора. Пересевы по генерациям производились через каждые 6 час. (пересев на вторую генерацию производился на 14-м часу брожения).

## 7. Оценка и сравнение результатов.

Результаты брожения оцениваются по сравнению с нормой, которую даёт существующий штам „Clostridium acetobutylicum“, согласно работам Н. Д. Иерусалимского (1934—1940) и др. Согласно этим данным, нормальное ацетоно-бутиловое брожение на средах, содержащих глюкозу и крахмал, имеет две характерные фазы. Первая характеризуется быстрым подъёмом кислотности и быстрым подъёмом газовыделения до максимума. Максимум наступает к 12—20 часам брожения. После этого наступает вторая фаза брожения с характерным спадом кислотности и газовыделения до минимума. При этом газовыделение затухает к моменту конца брожения, а кислотность после достижения минимума имеет незначительный вторичный подъём и останавливается на некоторой точке, которая имеет меньший показатель, чем показатель кислотности при максимуме (обычно 3—4 мл N/10 NaOH на 10 мл бражки; показатель максимума обычно колеблется между 4—5,5 мл N/10 NaOH на 10 мл бражки). Газа выделяется всего 32—38 гр/литр, и ацетона получается не меньше 6—6,5 гр/литр или 10—11% от крахмала. Сольвентов по объёму, примерно, 2,2%.

Соотношение получаемых сольвентов следующее: ацетона 30%, бутилового спирта 60% и этилового спирта 10%. Крахмал исчезает в бражке к 24—30 часам. Перед падением кислотности до минимума происходит поднятие затора, обычно к 20—26 часам брожения.

Ненормальным считается брожение, когда получается очень низкий выход ацетона, и когда кислотность непрерывно растёт, превышая показатели обычного максимума, что сопровождается и слабым газовыделением. Процесс брожения продолжается нормально 60 часов, но при слабом разбраживании может затянуться и до 72 час.

### III. Результаты работы.

#### 1. Испытания элективной культуры.

По указанной методике работы была выведена устойчивая элективная культура, названная нами условно культурой „А<sub>5</sub>“. Характеристика её даётся в таблицах № 1 и № 2.

Таблица № 1.

Результаты испытания элективной культуры „А<sub>5</sub>“ при 37° С на 8%-м заторе кукурузной муки крупного помола.

№№ генераций	% концентра- ции затора	Показатели анализов									
		Выход ацетона	Выход газа	Кислотность в мл N/10 NaOH на 10 мл					Ковеч- ная	Максим. к-ти на час брожения	Миним. к-ти на час брожения
				Началь- ная	Макси- мальная	Мини- мальная	Ковеч- ная	Максим. к-ти на час брожения			
1	6	5,95 гр.л.	—	0,4	—	—	2,1—2,4	—	—		
2	8	6,25 „ „	—	0,3	—	—	2,9	—	—		
3	6	6,89 „ „	—	0,4	—	—	2,6—2,9	—	—		
4	6	6,79 „ „	—	0,5	—	—	2,0—2,4	—	—		
5	8	6,73 „ „	32,75 гр.л.	0,4	4,5	1,9	2,5	14	24		
6	6	—	—	0,8	—	—	2,6	—	—		
7	8	6,97 „ „	32,34 „ „	0,3	4,0	2,0	2,9	12	18		

Примечание. Поднятие затора наблюдалось между 18—20 часами брожения.

Из таблицы № 1 видно, что у элективной культуры „А<sub>5</sub>“ кислотность и выхода ацетона являются нормальными на всех генерациях.

Таблица № 2.

Результаты испытания элективной культуры „А<sub>5</sub>“ на 5-ой и 7-ой генерациях на 8%-м заторе.

Часы бро- жения	Показатели анализов							
	Выход газа		Кислотность		Наличие крахмала		Характеристика затора	
	на 5 генер.	на 7 генер.	на 5 генер.	на 7 генер.	на 5 генер.	на 7 генер.	на 5 генер.	на 7 генер.
0	0	0	0,4	0,3	+	+	—	—
12	1,75	3,00	2,3	4,0	+	+	газ.	газ.
14	—	—	3,1	3,6	+	+	”	”
16	—	—	3,3	2,4	+	+	”	”
18	—	—	4,5	2,0	+	+	”	подн.
19	—	—	4,1	2,1	+	+	подн.	”
24	11,75	14,10	1,9	2,5	—	—	”	”
36	19,00	10,85	2,4	2,6	—	—	”	”
48	0,50	4,60	2,5	2,9	—	—	”	”
60	0,25	0,12	2,5	2,9	—	—	взв.	ос.
Всего	33,25	32,67	—	—	—	—	—	—

## 2. Описание культуры.

Mc Coy, Fred, Peterson, Hastings (1926) в своей совместной работе дают описание культуры *Cl. acetobutylicum*, как вполне сходной с нашим штамом.

В итоге испытаний, из 12 выведенных чистых линий выделились две чистые линии с лучшими показателями и различной морфологией. Одна из них названа штамом „А“, другая — штамом „К“.

Культура штамма „А“ во многом сходна с существующим штамом ацетоно-бутиловых бактерий, в том числе по развитию и величине.

На суловом агар-агаре она даёт широкие круглые колонии, слегка выпуклые или плоские. Края колонии немного лопастевидно-зазубренные. В молодом возрасте (до 20 ч. роста) они имеют слабый жёлто-коричневый цвет и почти прозрачны. К 24 часам роста, иногда позже, колонии окрашиваются с поверхности в молочно-матовый цвет. В дальнейшем поверхность приобретает беловатую морщинистость, гофрированную ломаной линией, радиально тянущейся к выпучивающемуся центру. Края по-прежнему остаются жёлто-коричневые.

Диаметр колонии достигает 2,5—3 мм, высота 1 мм. При густом посеве она образует сплошную беловатую плёнку с узорчато-морщинистой поверхностью.

После 50 часов роста колония темнеет и приобретает коричневый цвет. В этот момент она состоит из споровых форм культуры.

Вообще, колония состоит из единичных палочек, плотно прилегающих друг к другу и расположенных, в большинстве случаев, радиальными нитями. Эти нити, в момент приобретения беловатой окраски, приобретают ветвистость и образуют зигзаги, что, вероятно, и определяет радиальную узорчатую морщинистость колоний. Это соответствует III типу развития культуры в жидкости. В жидком субстрате они очень сходны с существующим штамом ацетоно-бутиловых бактерий и отличаются лишь большей подвижностью. Кукурузный затор, после сбраживания со штамом „А“, приобретает мутно-серый цвет. Спора образуется в конце палочки.

Штам „К“ отличается от штамма „А“ и существующего штамма *Cl. acetobutylicum* большей подвижностью палочек, особенно в первый период развития, и величиной. До III типа они очень мелкие и быстро двигаются в жидкой среде, в заторе из кукурузной муки, приобретая полную длину в моменты, когда кислотность затора приближается к максимуму.

В этот период палочки располагаются попарно, образуя углы, как и существующие производственные ацетоно-бутиловые бактерии.

Реже образуются цепочки, состоящие из 3—4 палочек. В этот период наблюдается их неравномерность по длине и подвижности — от слабой до хорошей. В IV типе встречаются единичные цепочки из 3—5 палочек. Споры образуются или в центре клетки или ближе к одному из концов палочек. В этот момент палочка сама принимает иную форму: если спора образуется точно в середине, то палочка принимает форму эллипса, если ближе к одному концу, то палочка принимает форму, похожую на заострённое эллипсообразное ручное зеркало. Под микроскопом споры обладают тёмно-жёлтым цветом со слегка зеленоватым оттенком, а тело бактерии (палочки) светложелтоватой каймой охватывает спору.

Спора имеет слегка угловатую эллипсоидно-вытянутую форму. Размер средний. Когда спора достигает полной величины, она освобождается от окружающей её тело материнской бактерии, которая разлагается к тому времени автолизом. При высеве культуры штамма „К“ на сусловый агар-агар она образует мелкие круглые и выпуклые колонии диаметром не больше 1—1½ мм, похожие на восковые

булавочные головки. Они имеют слегка матово-жёлтый цвет и состоят из отдельных палочек. После 48 часов роста эти колонии начинают приобретать мутно-коричневый оттенок. Это изменение цвета совпадает со спорообразованием. Затер после сбраживания штамом „К“ приобретает яркожёлтый цвет со слегка зеленоватым, как бы флуоресцирующим оттенком.

Из всего этого ясно, что нам удалось выделить два различных штамма ацетоно-бутиловых бактерий.

### 3. Сравнительное испытание штамов „А“ и „К“.

Согласно Stiles с сотр. (1929), с увеличением концентрации затора от 3,26 % до 7,38 % общее количество растворителей остаётся практически постоянным — так же, как количество ацетона и бутилового спирта, но увеличивается выход этилового спирта. По

Таблица № 3.

Результаты предварительного испытания штамов „А“ и „К“.

Наименование штамов	Выход ацетона в гр/лит бражки				
	на 6% концентрат.		на 9% концентрат.		
	1-я генерация	2-я генерация	5-ая генерация	7-ая генерация	объёмный% сольвентов
„А“	4,09	4,49	5,92	5,41	не определ.
„К“	4,49	5,26	7,52	7,12	2,55
Существующий штам	—	—	6,56	6,95	2,2

нашим наблюдениям, это соответствует увеличению концентрации затора до 9%. Исходя из этого, для испытания устойчивости новой культуры была принята наивысшая концентрация.

При предварительном испытании штам „А“ и штам „К“ на 6%-м заторе из кукурузной муки крупного помола (в склянках) и 9%-м таком же заторе (в АЧК) рассчитаны средние результаты, которые приводятся в таблице № 3.

Из таблицы № 3 видно, что штам „К“ даёт лучшие выходы ацетона, чем штам „А“ и существующий штам.

Штам „К“ на 9%-м заторе 5-ой генерации даёт выходы ацетона от 6,42 до 7,52 гр/лит.



Газовыделение в среднем 34 гр/лит, кислотность максимальная к 14 час. брожения с показателем 5,1—5,6 мл N/10 NaOH на 10 мл бражки. Затор поднимается кверху между 16—24 часами брожения. Конечная кислотность нормальная (ненормальностью считается, если кислотность останавливается на высшей точке, — Robinson, G. 1922 г. и др.) Брожение заканчивалось при 37° С к 48 часам, считая с момента заражения. Штам „А“, как более слабая культура (сходная с существующим штамом), был заготовлен на II генерации в пробирки и оставлен в запас, а штам „К“ подвергся дальнейшему испытанию, и из него заготавливалось несколько серий спор.

#### 4. Испытание устойчивости штам „К“.

Для испытания штам „К“ применялись особо жёсткие условия, которые могут встретиться при аварийных и прочих аномальных случаях ведения процесса в производстве.

##### а) Общее испытание.

Первое испытание заключалось в том, что спорам, заготовленным из штам „К“, не дали возможности выстояться (определённый период лёжки после заготовки).

Таблица № 4.

Испытание штам „К“ на выход ацетона по поколениям (ацетон в гр/лит бражки).

Генерация % затора	1-ая	2-ая	3-ья	4-ая	5-ая	6-ая	7-ая	8-ая	9-ая	10-ая
6	4,49	5,26	5,03	4,50	4,33	4,99	4,80	—	—	—
9	7,52	7,35	7,04	7,04	7,12	6,73	7,20	6,03	5,09	5,72
9	7,80	7,43	7,35	7,12	7,28	6,97	7,28	7,74	—	—
ср. на 9% заторе	7,66	7,39	7,20	7,08	7,15	6,85	7,24	6,37	—	—

Унтеркофлер Л. и др. (1936) указывают, что пастеризация спор после 6—12 дней выдержки увеличивает выходы на 10% и ускоряет брожение на 50%. Из спор, закончивших брожение, немедленно заражалась 1-я генерация без предварительной пастеризации. Как

1-я, так и последующие генерации испытывались на 6% и 9%-х заторах вплоть до 10-ой генерации включительно. Результаты приводятся в таблицах № 4, 5, 6.

Из таблицы № 4 видно, что выходы ацетона, как на 6%, так и на 9% заторе, до 7—8-ой генерации включительно, выше 6 гр/лит., после чего падают.

Таблица № 5.  
Газовыделение по генерациям штама „К“.

Генерации Часы брожения	Генерации							
	1-ая	2-ая	3-ья	4-ая	5-ая	6-ая	7-ая	8-ая
0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0,17	1,15	1,25	2,36	2,12	0,12	0,82	0,45
16	1,20	6,90	5,25	7,62	7,90	4,25	6,00	3,00
24	4,90	14,20	13,50	18,12	17,62	13,62	12,00	6,55
32	14,75	7,20	11,50	7,37	7,13	10,50	11,55	5,57
40	10,38	2,15	3,25	1,62	1,50	4,00	4,00	5,70
48	3,15	0,70	0,95	0,30	0	2,12	0,95	5,40
56	2,00	0,13	0,12	0,15	0	0,15	0,25	2,75
64	0	0,13	0	0,07	0	0	0,25	0,75
Всего за 64 часа	36,55	32,50	35,57	37,61	36,25	34,38	36,32	32,17

Из таблицы № 5 видно, что, до 8-ой генерации включительно, общее количество выделенного газа находится в нормальных границах (32—37 гр./лит.), затем наступает резкий спад. Это является характерным признаком нормального ацетоно-бутилового брожения. На 8-ой генерации, согласно данным газовыделения, можно предполагать ослабление культуры. На это указывает медленный подъём газовыделения до максимума и растянутый спад, а также низкий уровень максимума.

Практически, начиная со 2-ой генерации и до 7-ой генерации включительно, брожение заканчивается к 48 часам, на 5-ой генерации — к 40-му часу.

Максимум газовыделения — между 24—36 час. брожения. Это объясняется медленностью первоначального разбраживания. Затем, со 2-ой до 7-ой генерации включительно, максимум находится между 14—16 часами брожения. При этом уровень максимума газовыде-

ления возрастает до 4-ой генерации включительно, а затем падает. Учитывая то, что пересев по генерациям производился на 24 часу брожения, и проанализировав данные газовыделения, можно заключить, что, начиная с 5-ой генерации, культура слабеет, что объясняется инокуляцией перезрелой культурой.

Т а б л и ц а № 6.

Анализ кислотности по генерациям при испытании штама „К“ на 9%-м заторе.

Генерации Часы брожения	Генерации								
	1-ая	2-ая	3-ья	4-ая	5-ая	6-ая	7-ая	8-ая	9-ая
0	0,5	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,6	0,5
10	1,0	3,4	3,6	5,2	3,6	2,3	2,6	1,3	4,3
12	1,3	4,3	4,9	5,7	4,2	3,6	4,2	2,1	4,3
14	1,7	—	4,8	5,4	3,9	4,7	4,6	3,7	4,8
16	2,7	3,0	3,8	4,3	3,1	4,8	3,6	—	5,6
18	3,9	—	—	—	—	—	—	4,2	5,8
20	4,6	2,3	2,1	2,3	—	4,4	3,5	—	—
21	—	—	—	—	—	—	—	5,2	6,8
22	4,7	—	—	—	—	—	—	4,9	6,6
24	4,2	1,6	2,6	2,8	2,6	2,9	2,0	—	4,4
36	2,1	2,7	2,9	2,7	3,0	3,2	3,2	2,6	2,0
48	2,5	3,1	3,6	3,8	3,3	3,7	3,6	2,9	2,5
60	3,0	3,8	3,8	3,7	3,9	3,9	3,7	4,6	3,3
64	3,2	5,8	4,0	3,7	3,8	3,9	3,7	—	—

Из таблицы № 6 видно, что кислотность до 7-ой генерации вполне нормальная, что подтверждает вывод, сделанный при анализе данных таблицы № 5 об окончании брожения со 2-ой по 7-ую генерацию уже к 48 часам брожения. Максимум кислотности, с 1-ой до 7-ой генерации включительно, наступает на 12—16 часу брожения. Затем происходит нормальный „перелом“, спад до минимума и затем вновь незначительный подъём до 3,7—3,9, на этом уровне достигается относительная стабильность. На 8-ой и 9-ой генерации, максимум кислотности наступает после 20 часов, в дальнейшем к 12—16 часу. Это свойственно нормальному ацетонобутиловому брожению. Подтверждается и закономерность, отмеченная Унтеркофлером и др. (1936), что 8-ая и 9-ая генерации уменьшают выход ацетона, увеличивают вязкость и слизистость затора.

Из таблиц № 4 и 5 можно сделать вывод, что споры штамма „К“ дают нормальное ацетоно-бутиловое брожение с характерными для него показателями кислотности, газовыделения и выходами ацетона с первой до 8-й генерации.

б) Выносливость культуры к низкой температуре и к относительной нестерильности.

В нестерильных условиях заражались склянки с 9%-м затормом, которые затем бродили при комнатной температуре. Испытание проводилось до 5-ой генерации включительно. Пересевы по генерациям производились через 24 часа. На протяжении всех 5 генераций штам „К“ давал нормальное ацетоно-бутиловое брожение. После окончания брожения склянки выдерживались в тех же условиях ещё четверо суток, чтобы дать время разбродиться, возможно, находящимся в бражке посторонним культурам, а затем анализировались на содержание ацетона. Согласно данным Бехте-ревой, Иерусалимского и других, в нестерильных условиях заражение затора молочно-маслянокислыми бактериями нарушает нормальный ход ацетоно-бутилового брожения.

В результате оказалось, что склянки, несмотря на все эти ненормальности, содержали от 6,65—6,81 гр/лит. ацетона.

Это доказало устойчивость культуры и к низкой температуре брожения, и к относительной нестерильности, которые могут иметь место в заводской обстановке.

в) Выносливость при заражении устарелой культурой.

Подобный вариант возможен в заводских условиях при аварийных случаях, чтобы не останавливать работы при неудачах с инокуляторами.

Из 4-ой генерации на 50-ом часу брожения были заражены склянки новой 1-ой генерации, которые испытывались до 6-ой генерации включительно. Пересев по генерациям производился через 24 часа. Результаты приводятся в таблице № 7.

Из таблицы № 7 видно, что эти испытания штам „К“ выдержал, тем более, что на 2-ой и 4-ой генерации, после заражения этих генераций, температура в термостате случайно поднялась до 42° С, а эта высокая температура является неблагоприятно действующим на

Таблица № 7.

Испытание штамма „К“ при заражении почти отбродившей (устарелой) культурой на 50-м часу брожения.

Генерации №№	Выход газа в гр./литр.	Выход ацетона в гр./литр.	Кислотность в мл N/10 NaOH на 10 мл бражки				Время поднятия затора в часах	Время исчезновения крахмала
			начальная	максимальная	минимальная	конечная		
1.	36,99	6,70	0,5	$\frac{4,5}{20}$	$\frac{2,1}{36}$	2,4	24	20
2.	37,77	6,85	0,5	$\frac{5,2}{17}$	$\frac{2,4}{26}$	4,1	26	20
3.	36,77	6,85	0,3	$\frac{4,2}{12}$	$\frac{2,2}{24}$	4,4	24	24
4.	36,50	7,24	0,5	$\frac{5,8}{20}$	не уловлен.	5,7	н. п.	—
5.	35,00	7,37	0,4	$\frac{5,5}{21}$	$\frac{2,3}{86}$	3,7	26	36
6.	35,10	7,24	—	$\frac{6,1}{16}$	$\frac{2,3}{48}$	3,4	н. п.	36

Примечания: 1) В таблице № 7 в графах миним. и макс. кислотности числитель дроби показывает величину кислотности, а знаменатель — на каком часу брожения определена эта кислотность.

2) „н. п.“ в графе времени поднятия затора обозначает „не поднял затора“.

ацетно-бутиловое брожение фактором. Возможно, этим и объясняется неподнятость затора на 4-ой генерации и ненормально высокая конечная кислотность. То, что затор не поднялся на 6-ой генерации, можно объяснять также возможно не замеченными нарушениями температурного режима.

Из этих данных можно заключить: 1) что штамм „К“ не снижает выходов ацетона и при нарушении температурного режима в сторону повышения температуры, но не поднимает при этом затора; 2) что штамм „К“ способен вынести и заражение отбраживающей культурой, по крайней мере, до 6-ой генерации, не снижая выхода ацетона.

### 5. Качество бражки.

Необходимо отметить ещё одно положительное свойство „К“, — это малое пенообразование при сбраживании кукурузного затора. Для характеристики состава сольвентов (получаемых при сбраживании со штаммом „К“) была произведена разгонка бражки на лабо-

раторной ректификационной колонке. Для разгонки было взято 2 литра бражки на 56 часу брожения со 2-ой генерации.

Перед ректификацией бражка фильтровалась через марлю. Этот приём увеличил, безусловно, значительный процент потери растворителей.

Выход ацетона в этой бражке был равен 7,12 гр/литр.

Результаты разгонки приводим в таблице № 8.

Т а б л и ц а № 8.

**Результаты разгонки бражки на лабораторной ректификационной колонке.**

Температурные точки С°	Количество сольвента в мл.	В % к объёму бражки
55°, 56°	9,0	0,45
56°, 58°	4,0	0,20
60°, 82°	1,0	0,05
82°, 90°	5,0	0,25
90°, 92°	28,0	1,40
Всего	47,0	2,35%

Из таблицы № 8 видно, что процентное содержание растворителей (сольвентов) в бражке равно 2,35%, без учёта больших потерь при фильтровании бражки. Нельзя не отметить и малый процент промежуточных фракций, что указывает на хорошие соотношения основных компонентов.

## 6. Паспортизация спор.

Для общей и окончательной характеристики штамма „К“ приводим характеристику спор из третьей заготовки в таблицах №№ 9 по 14.

Т а б л и ц а № 9.

**Характеристика штамма „К“ (1-ой генерации до 24 часов брожения) на разбраживаемость.**

№№ пробирок спор	Ч а с ы б р о ж е н и я								
	8	10	12	14	16	18	20	22	24
16		Разбраживание началось	газ	газ	газ	газ	газ	газ	газ
33			газ	газ	газ	газ	газ	газ	газ

Из таблицы № 9 видно, что разбраживание начинается между 8 и 10 часами брожения.

Таблица № 10.

## Характеристика культуры штамма „К“ на сбраживаемость.

№№ пробирок спор	Какая генерация	Ч а с ы б р о ж е н и я				
		10	12	14	20	22
16 33	вторая	газ	газ	газ	взв	под
	”	”	”	”	”	”
		10	12	14	26	27
16 33	третья	газ	газ	газ	взв	под
	”	”	”	”	”	”
		10	12	14	20	22
16 33	четвёрт.	газ	газ	газ	взв	под
	”	”	”	”	”	”
		10	12	14	20	22
16 33	пятая	газ	газ	газ	взв	под
	”	”	”	”	”	”
		10	12	14	20	22
16 33	шестая	газ	газ	газ	взв	под
	”	”	”	”	”	”
		10	12	14	20	22
16 33	седьмая	газ	газ	газ	взв	под
	”	”	”	”	”	”
		10	12	14	20	22
16 33	восьмая	газ	газ	газ	взв	под
	”	”	”	”	”	”
		10	12	14	20	22
16 33	девятая	газ	газ	газ	газ	под
	”	”	”	”	”	”

Как видно из таблицы № 10, затор нормально бродит и поднимается на 20—27-м часу брожения.

Таблица № 11.

## Общая характеристика штамма „К“ на 5-ой генерации.

Часы брожения	Кислотность		Газо-выделение		Наличие крахмала		М а з о к		Внешняя характеристика	
	16 проба	33 проба	16 проба	33 проба	16 проба	33 проба	16 проба	33 проба	16 проба	33 проба
0	—	—	0	0	+	+	—	—	—	—
6	0,8	0,9	0,20	0,35	+	+	—	—	газ	газ
8	1,5	1,9	—	—	+	+	—	—	”	”
10	2,5	2,8	—	—	+	+	II „4“	II „5“	”	”
12	3,9	4,7	2,15	2,40	+	+	мелкая	—	”	”
14	4,6	4,8	—	—	+	+	III „4“	III „5“	взв	”
16	5,6	5,4	—	—	+	+	—	—	”	”
18	4,9	5,0	4,95	5,50	+	+	III „4“	III „4—5“	”	”
20	4,0	3,1	—	—	+	след	—	—	под	под
24	2,1	2,2	7,00	12,00	след	—	III „4—3“	III „4“	”	”
30	—	—	11,90	11,05	—	—	—	ед „3“	”	”
36	2,7	2,6	4,10	3,70	—	—	—	—	”	”
42	—	—	2,25	2,25	—	—	—	—	”	”
48	3,5	3,7	1,10	1,10	—	—	IV „2“	IV „2“	”	”
60	4,0	3,9	0,25	0,15	—	—	ел „3“	ед „3“	под	ос-взв
Всего газа :			33,90	38,50	—	—	—	—	—	—

Из таблицы № 11 видно, что на 5-ой генерации штам „К“ даёт нормальные показатели ацетоно-бутилового брожения. Перелом кислотности происходит на 16-ом часу брожения с показателем максимальной кислотности, равным 5,6—5,4. Газа выделяется от 33,90 до 38,50 гр./литр. Максимум газовыделения находится между 18—24 или между 24—30 часами брожения. Затор поднимается на 24 часу брожения.

Крахмал исчезает к 20—24 часам брожения.

Из таблицы № 12 видно, что на 7-ой генерации штам „К“ даёт нормальные показатели ацетоно-бутилового брожения.

Переломом кислотности происходит на 12—16 часу брожения с показателем максимальной кислотности, равным 5,6—5,5.

Газа выделяется от 34,75 до 35,15 гр./литр.; максимум газовыделения находится между 24—30 часами брожения. Затор поднимается к 24 часу брожения; крахмал исчезает к 24 часу брожения.

Из таблицы № 13 видно, что и на 9-ой генерации штам „К“ даёт нормальные показатели ацетоно-бутилового брожения. Пере-



Таблица № 12.

## Общая характеристика брожения штамма „К“ на 7-ой генерации.

Часы брожения	Кислотность		Газо-выделение		Наличие крахмала		М а з о к		Внешняя характеристика	
	16	33	16	33	16	33	16	33	16	33
	проба	проба	проба	проба	проба	проба	проба	проба	проба	проба
0	0,2	0,2	0	0	+	+	—	—	—	—
6	0,7	0,8	1,10	0,30	+	+	—	—	газ	газ
8	2,0	2,0	—	—	+	+	—	—	„	„
10	2,6	3,3	—	—	+	+	II „4“	II „4—3“	„	„
12	5,3	5,5	2,20	3,00	+	+	—	—	взв	„
14	5,4	5,4	—	—	+	+	III „4—5“	III „4“	„	„
16	5,6	4,5	—	—	+	+	—	ед „5“	„	„
18	—	—	6,00	6,10	+	+	—	—	„	„
20	3,1	2,3	—	—	+	+	III „4—3“	III „4—3“	„	взв
24	1,9	2,2	7,75	9,15	след	след	III—IV	III—IV	под.	под.
30	—	—	10,25	8,00	—	—	„2“	„3“ ед „2“	„	„
36	2,7	2,6	4,30	4,70	—	—	III—IV	IV—„3“	„	„
42	—	—	—	2,00	—	—	„2“ ед „3“	ед „2“	„	„
48	3,2	3,2	2,75	1,00	—	—	IV—„2“	IV—„2“	„	„
60	3,5	3,3	0,80	0,50	—	—	—	—	„	ос—взв
Всего газа:			35,15	34,75	—	—	—	—	—	—

лом кислотности происходит на 16 часу брожения с показателем кислотности, равным 5,3—4,9; газа выделяется от 33,50—34,05 гр/лит. Максимум газовыделения находится между 18—24 часами брожения. Крахмал исчезает к 24 часу брожения, к этому же времени поднимается и затор.

Как видно из таблицы № 14, выход ацетона на всех генерациях выше 7 гр. на литр бражки. Показатели кислотности и газовыделения находятся в допустимых границах нормального ацетоно-бутилового брожения. Остаточный сахар (недоброд) до 10-ой генерации небольшой и лишь на 10-ой генерации больше единицы (нормально допустимыми можно считать показатели до 0,6—0,7%).

Из всех приведённых данных паспортизации спор штамма „К“ вытекает, что споры штамма „К“ отвечают всем требованиям производственной культуры ацетоно-бутиловых бактерий и пригодны для заводского испытания.

Таблица № 13.

## Общая характеристика брожения штамма „К“ на 9-ой генерации.

Часы брожения	Кислотность		Газо-выделение		Наличие крахмала		М а з о к		Внешняя характеристика	
	16	33	16	33	16	33	16	33	16	33
	проба	проба	проба	проба	проба	проба	проба	проба	проба	проба
0	0,3	0,3	0	0	+	+	—	—	—	—
6	2,0	1,7	0,25	0,55	+	+	—	—	газ	газ
8	2,9	2,3	—	—	+	+	—	—	„	„
10	4,0	3,6	—	—	+	+	II—„4“	II—„4“	„	„
12	4,8	4,9	3,60	3,65	+	+	—	—	„	„
14	4,9	5,3	—	—	+	+	III—„4—5“	III—„4—5“	„	„
16	4,2	5,2	—	—	+	+	—	—	„	„
18	—	—	1,25	7,00	+	+	—	—	„	„
20	3,8	4,5	—	—	+	+	III—„4“	III—„4“	взв	„
24	2,7	2,2	11,15	11,75	след	след	III—„2“	III—„3—2“	под	под
30	—	—	6,00	6,65	—	—	—	—	„	„
36	3,6	3,8	3,00	2,75	—	—	—	—	„	„
42	3,6	3,8	1,35	1,15	—	—	—	—	„	„
48	3,6	3,8	0,65	0,15	—	—	IV—„2“	IV—„2“	„	„
60	4,5	4,1	0,25	0,40	—	—	—	—	ос	ос
Всего газа			33,50	34,05	—	—	—	—	—	—

Таблица № 14.

## Характеристика конечных результатов брожения штамма „К“ по генерациям.

Наименование показателей	5-я генерация		7-я генерация		9-я генерация		10-я генерация	
	16 проба	33 проба	16 проба	33 проба	16 проба	33 проба	16 проба	33 проба
Ацетон г/лит	7,52	7,47	7,52	7,43	7,20	7,16	7,59	7,67
Кислотность	3,8	3,7	3,5	3,3	3,9	4,0	4,1	4,2
Сахар в % (недоброд)	0,092	0,099	0,39	0,60	0,13	0,34	1,21	1,04
Газа г/лит	33,90	33,15	35,15	34,75	33,50	34,05	не опред.	

## Выводы.

1. Выделена элективная и затем чистая культура, отвечающая основным требованиям нормального ацетоно-бутылового брожения. Чистые линии ацетоно-бутыловых бактерий штаммов „А“ и „К“ не

однородны. Они являются различными штаммами, а может быть, и различными типами ацетоно-бутиловых бактерий.

2. Штам „К“ является наиболее устойчивым и активным штаммом ацетоно-бутиловых бактерий. Штам „К“ на 8%—9%-м заторах кукурузной муки крупного помола даёт выход ацетона выше 7 гр/литр бражки, при нормальной кислотности и газовыделении, сохраняя производственную мощность до десяти генераций включительно. Штам „К“ относительно хорошо выдерживает понижение температуры брожения и пересев устарелой культурой при относительной пестерильности и прочих аномальностях брожения, возможных в условиях заводской обстановки.

При применении пересевов по поколениям через 12—18 часов, штам „К“ даёт ускоренный процесс брожения, заканчивая брожение к 48 часам.

3. По морфологии штам „К“ отличается от существующего штамма *Clostridium acetobutylicum*. В жидкой среде палочки штамма „К“ в начальный период (до III типа) мелкие и очень подвижные, затем достигают нормальной величины. Споры образуются в центре палочки или несколько ближе к одному из её концов. Форма бактерии при этом подобна вытянутому эллипсу с лёгкой угловатостью. На сушлом агар-агаре образуются мелкие круглые мутно-жёлтые, переходящие в коричневые, выпуклой формы колонии, похожие на булавочные головки. Затор, после сбраживания со штаммом „К“, имеет жёлтый цвет со слегка зеленоватым оттенком, в отличие от зеленовато-серого или серого цвета при сбраживании с существующим штаммом.

\*  
\*  
\*

В заключение выражаю искреннюю благодарность химикам Н. Ю. Артецкой, М. Я. Гусевой, О. М. Зубаревой и лаборантке В. П. Шutowой за их активную помощь в аналитической работе и доценту А. Ф. Лазареву за любезный просмотр работы и полезные замечания.

## Литература.

1. Бехтерева М. Н., и Перусалимский Н. Д. Динамика и баланс ацетоно-бутилового брожения. 1936—1937 гг.
2. Виноградский С. Архив Инст. Экспер. Мед. I, 87, 1892 г.
3. Перусалимский Н. Д. Микробиология, IV, в. 4, 1935, III, 44, 1934; V, 177, 1936 г. и IX, 159, 1940.
4. Мантейфель А. Я. Микробиология, VIII, 9—10, 10, (97—1108) 1940 г.
5. Омелянский С. Арх. биол. наук, № 7, 9, 11, 1900 г., № 12, 1905 г.
6. Шапошников В. Н. и Мантейфель А. Я. Микробиология, VIII, 1, 1939 г.
7. Hall J. Journ. Bact. XII, 255, 1929.
8. Hasse W. D. Med. Wochenschr. 214, 1885.
9. Mc. Coy E., Fred E., Peterson W., and Hastings E. Journ. Ind. Dis. 39, 457, 1926.
10. Robinson, G. I. Biol. chem. LIII, 125, 1922.
11. Stiles H. R., Peterson B. H. and Fred E. B., I. biol. chem., 84, 1929.
12. Unterkofler, Z., Christensen, L. and Fülmer, E. I. Industr. and Eng. Chemistry, 28, № 3, 354, 380, 1936.

## Оглавление.

I. Методика работы . . . . .	4
Выведение элективной культуры . . . . .	4
II. Выведение чистой линии . . . . .	6
1. Выделение культуры . . . . .	6
2. Пересев . . . . .	6
3. Производство химических анализов . . . . .	7
4. Микроскопический анализ . . . . .	7
5. Характеристика по внешнему виду . . . . .	8
6. Заготовка спор . . . . .	9
7. Оценка и сравнение результатов . . . . .	9
III. Результаты работы . . . . .	11
1. Испытания элективной культуры . . . . .	11
2. Описание культуры . . . . .	12
3. Сравнительное испытание штаммов „А“ и „К“ . . . . .	14
4. Испытание устойчивости штамма „К“ . . . . .	15
5. Качество бражки . . . . .	19
6. Паспортизация спор . . . . .	20

*Vastutav toimetaja*  
*A. F. Lazarev.*  
*Tehniline toimetaja*  
*H. Kohu.*

Ladumisele antud 9. XII 48.  
Trükkimisele antud 14. II 49.  
Paberi kaust 67 X 95.  $\frac{1}{16}$ .  
Trükipoognaid  $1\frac{3}{4}$ . Autoripoog-  
naid 1,2. Arvestuspoognaid 1,21.  
MB 00168. Laotihedus trpg. 38000.  
Tiraaž 2420. Trükikoja tellimus  
nr. 2530. Trükikoda  
„Hans Heidemann“, Tartu,  
Vallikraavi tn. 4.



Цена 1 р. 75 к.