

ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие «Основы биотехнологии» создано на базе курса лекций, более 10 лет читаемых авторами студентам биолого-химического факультета Московского педагогического государственного университета. Цель пособия — показать, как принципы биохимии, молекулярной и клеточной биологии, используемые в производстве, не только формируют новое качество биотехнологических процессов, но и обеспечивают приоритетное развитие современной биологии.

В книге изложены традиционные и новейшие технологии, основанные на достижениях генной и клеточной инженерии. Рассмотрены прогрессивные методы биотехнологии, такие, как получение рекомбинантной ДНК, трансгенных растений и животных, культивирование клеток и тканей, клонирование, обеспечение сверхпродуктивности объектов. Значительное внимание уделено вопросам использования биотехнологических процессов для решения актуальных социально-экономических проблем — энергетических, сырьевых, медицинских, экологических, сельскохозяйственных. Обобщены главные достижения биотехнологии в современном производстве; во многих разделах обсуждаются прогнозы ее развития.

Материал пособия обеспечит необходимый уровень подготовки студентов-биологов, а также заинтересует специалистов, занимающихся исследованиями в области биотехнологии.

Авторы выражают благодарность Ю. Г. Кроповой и Д. А. Сквородину за оказанную помощь в подготовке пособия.

ВВЕДЕНИЕ

Последние два десятилетия характеризуются выдающимися достижениями биотехнологии, являющейся междисциплинарной областью знаний, базирующейся на микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, биоорганической химии, биофизике, вирусологии, иммунологии, генетике, инженерных науках и электронике.

Развитие биотехнологии позволяет существенно интенсифицировать производство, повышать эффективность использования природных ресурсов, решать экологические проблемы, создавать новые источники энергии. Возможности биотехнологии при международном сотрудничестве специалистов могут быть направлены на решение мировых кризисных проблем, связанных с восполнением дефицита белка и энергии, предотвращением опасных заболеваний, охраной окружающей среды.

Одна из особенностей биотехнологии состоит в том, что она использует технологии производства продуктов на ранних этапах развития микробиологического синтеза. Выявлены существенные потенциальные возможности для усовершенствования традиционных технологий и расширения сфер приложения получаемых продуктов. Например, методом генетической инженерии созданы уникальные штаммы микроорганизмов для сыроварения.

Разработка биотехнологических процессов связана с большими капиталовложениями. Внедрение новейших биотехнологий особенно перспективно в тех случаях, когда продукт не может быть получен другими способами или может быть получен в недостаточных количествах, по более высокой цене. Исследования в этом направлении в основном сосредоточены на производстве фармакологических препаратов, диагностикумов.

Иммунная биотехнология, с помощью которой распознают и выделяют из смесей одиночные клетки, может применяться не только непосредственно в медицине для диагностики и лечения, но и в научных исследованиях, в фармакологической, пищевой и других отраслях промышленности, а также использоваться для получения препаратов, синтезируемых клетками защитной системы организма.

Большое будущее биотехнологии связано с протоинженерией — технологией изменения свойств природных белков на генетическом уровне, получения новых белков (например, новых стимуляторов роста растений, инсектицидов, активных и устойчивых фер-

ментов, высококачественных пищевых продуктов, биосенсоров и биоэлементов, медицинских приборов).

Важную роль в указанном направлении играют расширение и усовершенствование существующих биотехнологических процессов, создание новых. В частности, большие перспективы связаны с введением в растение комплекса генов, управляющих фиксацией азота.

Растущая область биотехнологии — биоэлектроника. Использование биосенсоров революционизирует методы измерения и контроля в различных отраслях промышленности, медицине, научных исследованиях.

С внедрением биотехнологии в добывающую промышленность связан переход от тяжелой индустрии к высоким технологиям. Применение биотехнологии металлов перспективно для извлечения из руд платины и других драгоценных и стратегически важных металлов, а биотехнологических методов — для увеличения извлечения нефти из скважин, удаления серы из угля, метана из шахт.

Внедрение биотехнологии в практику изменяет соотношение в системе: человек — производство — природа, повышает производительность труда. Широкое использование биотехнологических процессов способствует стиранию грани между промышленным и сельским производством, поскольку продукты питания, корма и другие сельскохозяйственные продукты вырабатывают в промышленных условиях. Так, на фермах применяют установки для переработки сельскохозяйственных отходов в биогаз, используемый для удовлетворения собственных потребностей в топливе; внедряются промышленные методы производства компонентов кормов.

В настоящее время достижения биотехнологии перспективны в следующих отраслях:

- в промышленности (пищевая, фармацевтическая, химическая, нефтегазовая) — использование биосинтеза и биотрансформации новых веществ на основе сконструированных методами генной инженерии штаммов бактерий и дрожжей с заданными свойствами на основе микробиологического синтеза;

- в экологии — повышение эффективности экологизированной защиты растений, разработка экологически безопасных технологий очистки сточных вод, утилизация отходов агропромышленного комплекса, конструирование экосистем;

- в энергетике — применение новых источников биоэнергии, полученных на основе микробиологического синтеза и моделированных фотосинтетических процессов, биоконверсии биомассы в биогаз;

- в сельском хозяйстве — разработка в области растениеводства трансгенных агрокультур, биологических средств защиты растений, бактериальных удобрений, микробиологических методов

рекультивации почв; в области животноводства — создание эффективных кормовых препаратов из растительной, микробной биомассы и отходов сельского хозяйства, репродукция животных на основе эмбриогенетических методов;

- в медицине — разработка медицинских биопрепаратов, моноклональных антител, диагностикумов, вакцин, развитие иммунобиотехнологии в направлении повышения чувствительности и специфичности иммуноанализа заболеваний инфекционной и неинфекционной природы.

Глава 1

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

К важнейшим отраслям биоиндустрии (рис. 1.1) следует отнести некоторые отрасли пищевой промышленности (широкомасштабное выращивание дрожжей, водорослей и бактерий для получения белков, аминокислот, витаминов, ферментов); сельское хозяйство (клонирование и селекция сортов растений, производство биоинсектицидов, выведение трансгенных животных и растений); фармацевтическую промышленность (разработка вакцин, синтез гормонов, антибиотиков, интерферонов, новых лекарственных препаратов); экологию — защиту окружающей среды и устранение загрязнений (очистка сточных вод, переработка хозяйственных отходов, изготовление компоста и др.).

Биотехнология призвана не только совершенствовать традиционные методы, широко используемые в пищевой промышленности при производстве молочнокислых продуктов, сыра, пищевых кислот, алкогольных напитков, но и создавать современные технологии для синтеза полимеров, искусственных приправ, сырья (текстильная промышленность), для получения метанола, этанола, биогаза и водорода, для извлечения некоторых металлов из руд.

1.1. ПРОИЗВОДСТВО КОРМОВОГО БЕЛКА

В соответствии с нормами питания человек должен ежедневно получать с пищей 60 — 120 г полноценного белка; в рационе сельскохозяйственных животных на каждую кормовую единицу нужно не менее 110 г полноценного белка. Для поддержания жизненных функций организма, построения клеток и тканей необходим постоянный синтез различных белковых соединений. Если растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все белковые аминокислоты из углекислоты, воды, аммиака и минеральных солей, то человек и животные не могут синтезировать



Рис. 1.1. Перспективные направления биотехнологии в снабжении человечества продовольствием

некоторые аминокислоты (валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан и фенилаланин), которые называют *незаменимыми*. Эти аминокислоты должны поступать в организм в готовом виде с пищей; их отсутствие вызывает тяжелые заболевания человека и снижение продуктивности сельскохозяйственных животных.

Для человека главные источники незаменимых аминокислот — белки животного и растительного происхождения, входящие в состав пищи, а для животных — в основном растительные белки. Все незаменимые аминокислоты должны содержаться в белках

пищи в определенных соотношениях, отвечающих потребностям данного организма.

Если содержание белков в растительном корме ниже нормы, то во избежание перерасхода кормов и повышения себестоимости животноводческой продукции количество белка в корме компенсируют введением белковых добавок в виде препаратов незаменимых аминокислот либо белковой массы с более высоким содержанием ряда аминокислот по сравнению с эталоном. Незаменимые аминокислоты наиболее сбалансированы в белках семян сои. Относительно высокую биологическую ценность имеют также белки зерна риса и гороха. В белках зерна пшеницы и ячменя очень мало лизина, метионина и изолейцина, а в белках кукурузы еще и триптофана. Для балансирования кормов (в которых основной компонент — зерно злаковых культур) по белку и незаменимым аминокислотам применяют концентрированные белковые добавки — комбикорма. Для их приготовления используют мясокостную и рыбную муку, отходы мясной и молочной промышленности, жмыхи масличных растений, отруби, шроты зернобобовых культур.

Особый интерес представляет использование микроорганизмов в качестве источника белка и витаминов при производстве пищевых продуктов. Перспектива и экономическая целесообразность употребления микроорганизмов в технологии производства пищевых продуктов диктуются рядом факторов:

1) возможностью использования самых разнообразных химических соединений, в том числе отходов производства, для культивирования микроорганизмов;

2) высокой интенсивностью синтеза белков;

3) относительно несложной технологией культивирования микроорганизмов, которое можно осуществлять круглосуточно и во все сезоны года;

4) относительно высоким содержанием белка и витаминов, а также углеводов, липидов и препаратов на основе микробов;

5) повышенным содержанием незаменимых аминокислот по сравнению с растительными белками (табл. 1.1);

6) возможностью направленного генетического влияния на химический состав микроорганизмов в целях совершенствования белковой и витаминной ценности продукта.

Использование белка микробного происхождения для изготовления пищевых продуктов позволяет экономить высокоценные животные и растительные белки, а также повышать биологическую ценность готового продукта.

Для промышленного производства пищевых продуктов и их использования на основе микроорганизмов необходимы тщательные медико-биологические исследования. Пищевые продукты, получаемые с добавлением микробных препаратов, должны пройти

Таблица 1.1

Содержание незаменимых аминокислот в белках некоторых микроорганизмов (в граммах на 100 г белка)

Аминокислота	Микроорганизмы				
	дрожжи	водоросли	бактерии	грибы	актиномицеты
Валин	5–7	5–7	4–6	5–7	5,5
Лейцин	6–9	6–10	5–11	6–9	7,7
Изолейцин	4–6	4–7	5–7	3–6	5,3
Треонин	4–6	3–6	4–5	3–6	4
Метионин	1–3	1,5–2,5	2–3	2,5	1,3
Лизин	6–8	5–10	6–7	3–7	6,4
Фенилаланин	3–5	3–5	3–4	3–6	5
Триптофан	1–1,5	до 2	1,5	1,5–2	1,4

всестороннюю проверку для выявления канцерогенного, мутагенного, эмбриотропного действия на организм человека и животных. Токсикологические исследования, усвояемость продуктов микробного синтеза — основные критерии целесообразности технологии их производства.

В настоящее время мировой дефицит белка составляет около 15 млн т. Наиболее перспективен микробиологический синтез, что следует из представленных ниже данных. Если для крупного рогатого скота требуется 5 лет для удвоения белковой массы, для свиней — 4 мес, для цыплят — 1 мес, то для бактерий и дрожжей — 1–6 ч. Мировое производство пищевых белковых продуктов за счет микробного синтеза составляет более 15 тыс. т в год.

В качестве источников кормового белка чаще используют различные виды дрожжей и бактерий, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли, белковые коагуляты травянистых растений.

1.2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ И БАКТЕРИЙ

Дрожжевые клетки в качестве источника углерода для роста способны использовать неразветвленные углеводороды с числом от 10 до 30 углеродных атомов в молекуле. В основном они представлены жидкими фракциями углеводородов нефти с температурой кипения 200—320 °С. Эти фракции углеводородов нефти мо-

гут быть получены низкотемпературной кристаллизацией, карбомидной депарафинизацией и адсорбцией на молекулярных ситах (цеолитах). В России первый завод по производству кормовых дрожжей из жидких парафинов нефти вступил в действие в 1971 г. В нашей стране и других странах СНГ из *n*-парафинов нефти производят большое количество кормовых дрожжей (свыше 1 млн т). При выращивании дрожжей на *n*-парафинах нефти в приготовленную из них питательную среду добавляют макро- и микроэлементы, необходимые витамины и аминокислоты. Высушенная дрожжевая масса гранулируется и используется как белково-витаминный концентрат (БВК), содержащий до 50—60 % белковых веществ, для кормления сельскохозяйственных животных.

Хорошим субстратом для выращивания кормовых дрожжей является молочная сыворотка — производственный отход при переработке молока. В 1 т молочной сыворотки содержится около 10 кг белка и 50 кг лактозы. Разработана эффективная технология выделения из молочной сыворотки белков методом ультрафильтрации низкомолекулярных веществ через мембраны. Эти белки используют для приготовления сухого обезжиренного молока. Жидкие отходы, остающиеся после отделения белков (пермеат), могут быть переработаны путем культивирования дрожжей в обогащенные белками кормовые продукты.

В качестве источников углерода дрожжевые клетки могут использовать и низшие спирты — метанол и этанол, получаемые в биотехнологии из природного газа или растительных отходов. Дрожжевая масса, полученная после культивирования дрожжей на спиртах, содержит больше белков (56—62 % от сухой массы) и меньше вредных примесей, чем кормовые дрожжи, выращенные на *n*-парафинах нефти, такие, как производные бензола, *D*-аминокислоты, аномальные липиды, токсины и канцерогенные вещества. Кроме того, кормовые дрожжи имеют повышенное содержание нуклеиновых кислот — 3—6 % от сухой массы, которые в этой концентрации вредно воздействуют на организм животных. В результате их гидролиза образуется много пуриновых оснований, превращающихся затем в мочевую кислоту и ее соли, которые могут быть причиной мочекаменной болезни, остеохондроза и других заболеваний. Тем не менее кормовые дрожжи хорошо усваиваются и перевариваются в организме животных, а по содержанию таких аминокислот, как лизин, треонин, валин и лейцин, значительно превышают многие растительные белки. Вместе с тем белки дрожжей частично не сбалансированы по метионину, в них мало цистеина и селенцистеина. Оптимальная норма добавления дрожжевой массы в корм сельскохозяйственных животных обычно составляет не более 5—10 % от сухого вещества.

Наряду с технологией использования дрожжевых белков в качестве кормовой добавки в рационы сельскохозяйственных живот-

ных разработаны технологии получения из них *пищевых белков*. В некоторых странах пивные и пищевые дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida arborea*, *C. utilis*) широко используют в качестве белковых добавок к различным пищевым продуктам. Дрожжевой белок позволяет повысить питательную и витаминную ценность пищевых продуктов, улучшить их вкус и аромат. Так, разработана рецептура приготовления сосисок из мяса индейки с добавлением 25 % белка, дрожжевого хлеба и лапши с частичной заменой муки — до 5 % (США). В результате ферментации дрожжевыми клетками глюкозы, получаемой из кукурузного крахмала, синтезирован белковый продукт мукопротеин, используемый при производстве колбас в качестве замены основного сырья (Великобритания).

Очень полезными продуктами являются ацидофильно-дрожжевое молоко и творог, сделанный из него. Технология получения творога включает следующие этапы. В цельное молоко с 2 % сахара вносят 3 % суточной культуры дрожжей и выдерживают 14—17 ч при температуре 32—33 °С. Полученную закваску добавляют в молоко и выдерживают до свертывания при температуре 33 °С еще 5—6 ч. Такой творог богат витаминами В₁, В₂, С и др. Представители 14 видов дрожжей рода *Candida* утилизируют молочную сыворотку для получения биомассы, богатой витаминами и белком. Способность некоторых видов дрожжей (*Rhodotorula glutinis*) продуцировать каротиноиды нашла применение в производстве пищевых красителей.

Колбасные изделия с добавлением микропротеина рекомендованы больным, страдающим диабетом и другими хроническими заболеваниями.

Фирмой «Amoco Foods» (США) налажено производство сухих дрожжей *Candida utilis* под названием торутеин, который добавляют в продукты питания. В штате Оклахома (США) разработана технология получения ряда диетических продуктов, обогащенных дрожжевым белком «Provosten Т» (фирма «Provesta») с высоким содержанием протеина. Напитки, в которые добавлен препарат, имеют оригинальный вкус.

Важный резерв пищевого белка и витаминов — остаточные пивные дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis*. Организм человека усваивает свыше 90 % всех питательных веществ, содержащихся в них. В составе этих дрожжей обнаружено около 14 витаминов, причем на долю витамина В₁ приходится 10 мг %, витамина В₂ — 3 мг %; они характеризуются хорошей сбалансированностью незаменимых аминокислот, белка (не менее 48 %). Пивные дрожжи могут с успехом применяться при производстве колбас в качестве заменителя казеина; они повышают биологическую и витаминную ценность колбас, улучшают их вкус, аромат и другие показатели. Пивные дрожжи применяют в пищевой промышленности для «ароматизации» мяса, творога и изделий из них. Как правило, биомассу дрожжей при переработке в пищевой белок тщательно очищают.

Сначала разрушают стенки дрожжевых клеток путем механической, щелочной, кислотной или ферментативной обработки с последующей экстракцией гомогенной дрожжевой массы подходящим органическим растворителем. После такой очистки от органических и минеральных примесей дрожжевой продукт обрабатывают щелочным раствором для растворения белков. Далее белковый раствор, отделенный центрифугированием от оставшейся массы дрожжей, подвергают диализу. Очищенные от низкомолекулярных примесей белки осаждают, высушивают и используют в качестве белковых добавок в различные пищевые продукты: сосиски, паштеты, мясные и кондитерские начинки. Белки дрожжей применяют также при получении искусственного мяса. Для этого их нагревают с последующим быстрым охлаждением или продавливанием белковой пасты через отверстия малого диаметра. В белковую пасту добавляют полисахариды и другие компоненты.

Известно более 30 видов бактерий, которые могут быть применены в качестве источников полноценного кормового белка. Бактериальные белковые концентраты с содержанием сырого белка 60—80 % (от сухой массы) — ценные препараты в кормопроизводстве. Следует отметить, что бактерии значительно быстрее, чем дрожжевые клетки, наращивают биомассу и, кроме того, белки бактерий содержат больше цистеина и метионина, что позволяет отнести их в разряд белков с высокой биологической ценностью. Источником углерода при культивировании бактерий могут служить природный и попутный газы, водород, а также спирты — метанол, этанол, пропанол. Чаще всего на газовых питательных средах выращивают бактерии рода *Methylococcus*, способные утилизировать до 85—90 % метана в специальных ферментерах. Однако производство кормового белка из газообразных продуктов довольно сложно и дорогостояще. Более широко применяется технология выращивания бактерий на метаноле, который легко получают путем окисления метана. При культивировании на питательной среде с метанолом наиболее часто используют бактерии родов *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Methylophilus*. Масштабное производство кормовых белков на основе использования метанола впервые было организовано в Великобритании. Концерном «Ай-Си-Ай» выпускается кормовой белковый препарат прутин (коммерческое название). В России также разработана технология получения препарата из метанола под названием меприн. В этом препарате содержится до 74 % белков (от сухой массы), до 5 % липидов, 10 % минеральных веществ, 10—13 % нуклеиновых кислот. В настоящее время разрабатывается технология получения кормового белка из этанола на основе культивирования бактерий рода *Acinetobacter* (препарат эприн).

К числу бактерий с высокой интенсивностью синтеза белков следует отнести и водородокисляющие бактерии, способные накапливать в клетках до 80 % сырого белка (в расчете на сухую

массу). Для их культивирования в составе газовой среды обычно содержится 70—80 % водорода, 20—30 % кислорода и 3—5 % CO₂. Производство кормового белка на основе использования водородокисляющих бактерий может быть организовано вблизи химических предприятий.

Кормовой белок бактериального происхождения добавляют в комбикорма в количестве 2,5—7,5 % от белка рациона сельскохозяйственных животных, а при кормлении взрослых свиней — до 15 %.

1.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОДОРΟΣЛЕЙ И МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Для получения кормового белка используют одноклеточные водоросли *Chlorella* и *Scenedesmus*, синезеленые водоросли из рода *Spirulina*, способные синтезировать белки из диоксида углерода, воды и минеральных веществ за счет энергии солнечного света. Водоросли для своего развития нуждаются в определенных режимах освещения и температуры и в больших объемах воды. Обычно их выращивают в естественных условиях южных регионов в бассейнах открытого типа. Водоросли хлорелла и сценедесмус нуждаются в нейтральной среде, их клетки имеют довольно плотную целлюлозную стенку, вследствие чего они хуже перевариваются в организме животных, чем спирулина, которую выращивают в щелочных озерах (рН 10—11). При выращивании водорослей в культиваторах открытого типа с 1 га водной поверхности можно получить до 70 т сухой биомассы в год, что превышает выход биомассы при возделывании пшеницы, риса, сои, кукурузы.

Содержание белков в клетках *Chlorella* и *Scenedesmus* составляет около 55 % (в расчете на сухую массу), а в клетках *Spirulina* — 65 %. Белки водорослей хорошо сбалансированы по содержанию незаменимых аминокислот, за исключением метионина. В клетках водорослей, кроме того, синтезируется довольно много полиненасыщенных жирных кислот и β-каротина (до 150 мг %).

Белковая масса из клеток водорослей поступает в производство в виде суспензии, сухого порошка или пастообразного препарата. Процесс отделения клеток водорослей от массы воды чрезвычайно трудоемкий. Суточная норма суспензии хлореллы при кормлении молодняка крупного рогатого скота — 3—6 л, взрослых животных — 8—10 л. В связи с тем, что биомасса *Spirulina* характеризуется высоким содержанием белков (до 70 % сухой массы), хорошо сбалансированных по аминокислотному составу, ее используют для приготовления продуктов питания и кондитерских изделий. Добавление этой водоросли в корм тутового шелкопряда (листья шелковицы) значительно увеличивает выход шелка и его качество.

В биомассе многих микроскопических грибов хорошо сбалансированы по аминокислотному составу белки; они включают также витамины и липиды. По своим питательным свойствам белки грибов приближаются к белкам сои и мяса, что позволяет использовать их не только для приготовления кормовых концентратов, но и как добавку в пищу человека. Источником углерода для промышленного выращивания микроскопических грибов служат растительные отходы, содержащие клетчатку, гемицеллюлозы, лигнин, а также торф и навоз. Образцы колбас, выработанные с применением микроскопических грибов, характеризуются высокой степенью перевариваемости белковых веществ *in vitro* за счет активных пепсина и трипсина. Обычно микробная биомасса добавляется в изделия из рубленого мяса в количестве 5—15%. Такой гриб, как *Penicillium roqueforti*, широко используется при производстве сыров, в частности сыра рокфор; он применяется свыше 100 лет. В Великобритании создан пищевой продукт, основным компонентом которого является белок грибного происхождения (*Fusarium graminearum*) — *микопротеин* на дешевом глюкозном сиропе, полученном путем гидролиза пшеничного или кукурузного крахмала. Микопротеин — это аналог мяса, но по сравнению с белками животного происхождения лучшего качества по содержанию белка (44%), минеральных веществ, витаминов и липидов. Хорошая перевариваемость грибной белковой массы в организме животных, а также низкий уровень содержания нуклеиновых кислот позволяют использовать ее в качестве кормовой добавки в большей концентрации, чем кормовые дрожжи. При кормлении взрослых животных возможна замена в корме 50% растительного белка на грибной.

В зависимости от способа подготовки растительного сырья для культивирования микроскопических грибов применяют и соответствующие технологии их выращивания. Более высокий коэффициент использования сырья достигается при выращивании грибов на гидролизатах растительных отходов и жидких отходах деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности по сравнению с их культивированием на твердой питательной среде. Содержание белков в грибной массе при использовании метода глубинного культивирования составляет 50—60% от сухой массы. Для более полного использования сырья практикуется совместное культивирование грибов и бактерий.

Глава 2

ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

2.1. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ЕЕ ЗАДАЧИ

Специфическое применение биотехнологических методов для решения проблем окружающей среды, таких, как переработка отходов, очистка воды, устранение загрязнений, составляет предмет *экологической биотехнологии*. Экологическая биотехнология — это новейший подход к охране и сохранению окружающей среды при совместном использовании достижений биохимии, микробиологии, генетической инженерии и химических технологий.

Круг проблем, решаемых эковиотехнологией, чрезвычайно широк — от разработки и совершенствования методологии комплексного химико-биологического исследования экосистем вблизи источников техногенных воздействий до разработки технологий и рекомендаций по рекультивации почвы, биологической очистке воды и воздуха и биосинтезу препаратов, компенсирующих вредное влияние изменения окружающей среды на людей и животных. В процессе круговорота загрязняющих веществ в экосистемах огромную роль играют микроорганизмы. Помимо использования деятельности микроорганизмов в пищевой, фармацевтической, химической промышленности и в генной инженерии появилась возможность их применения для переработки отходов жизнедеятельности человека. В связи с ростом городов и развитием промышленности возникли серьезные экологические проблемы: загрязнение водоемов, накопление ядовитых веществ, в том числе канцерогенных, бытового мусора и отходов, загрязнение воздуха. Однако многие из созданных человеком низкомолекулярных соединений (ядохимикаты, детергенты) и высокомолекулярных полимеров оказались устойчивыми и не разлагаются микроорганизмами, т. е. требуется разработка более усовершенствованных технологий.

Обычно для утилизации отходов применяют комплексы микроорганизмов и специальные приборные устройства. Многие из созданных человеком химических веществ проявляют биологи-

Таблица 2.1

Перечень веществ, опасных для жизнедеятельности человека

Вещества, проявляющие канцерогенный, мутагенный эффект	Вещества, вызывающие резистентность у вредителей, патогенов и сорняков	Вещества, стимулирующие откладку яиц и размножение вредителей
<i>Хлорорганические:</i> ДДТ, полихлорпирен, полихлоркамфен, гексахлорбутадие <i>Производные дитиокарбаминовой кислоты:</i> цирам, цинеб, ТМТД <i>Производные карбаминовой кислоты:</i> беномил, пиримор, бетанал <i>Производные мочевины:</i> которан <i>Другие:</i> хлорофос, фталофос, базудин, гетерофос, дихлофос, каптан, фолфет, каптофол	<i>Инсектициды и акарициды:</i> ДДТ, токсафен, эндрин, малаатион Фосмет, хлорофос, арамит <i>Фунгициды:</i> медный купорос, каптан, агрозан, додин, фталан, цинеб, родан, фигон	ДДТ, меркаптофос, димеатеат, метилмеркаптофос

ческую активность: обладают мутагенными, канцерогенными, тератогенными свойствами, нарушают структуру клетки. В табл. 2.1 представлен ряд веществ, обладающих опасным для человека действием.

Некоторые загрязняющие биосферу вещества по своему происхождению являются природными соединениями. Например, компонент древесины лигнин, образующийся в значительных количествах как отход целлюлозно-бумажной промышленности, — опасный поллютант. К числу загрязняющих биосферу веществ природного происхождения принадлежат и многие ароматические и галогенсодержащие углеводороды.

2.2. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ И ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ ВЕЩЕСТВ

Чужеродные вещества (ксенобиотики), попадая в организм человека и животных, претерпевают различную биотрансформацию: окисление, восстановление, гидролиз, конъюгацию и другие процессы с участием ферментных систем.

Так, в реакциях окисления чужеродных веществ особое место занимают микросомальные монооксигеназы, а также комплексы мембранно-связанных ферментов с участием цитохромов Р-450. Биотрансформация чужеродных веществ под воздействием микроорганизмов и ферментов протекает в воде и почвах. Изучение этих реакций в почвах в немалой степени затруднено гетероген-

ностью среды и адсорбцией ксенобиотиков, микроорганизмов и ферментов на частицах и коллоидах почв. Устойчивость многих ксенобиотиков в биосфере довольно высока. Например, ДДТ не исчезает из почвы до 30 лет; альдрин и хлордан — до 15 лет; диэльдрин — до 25 лет; гептахлор — до 14 лет. Некоторые поллютанты, подвергаясь распаду или трансформации, могут образовывать более устойчивые или токсичные продукты.

Процессы биотрансформации некоторых ксенобиотиков и загрязняющих веществ показаны на рис. 2.1 — 2.5.

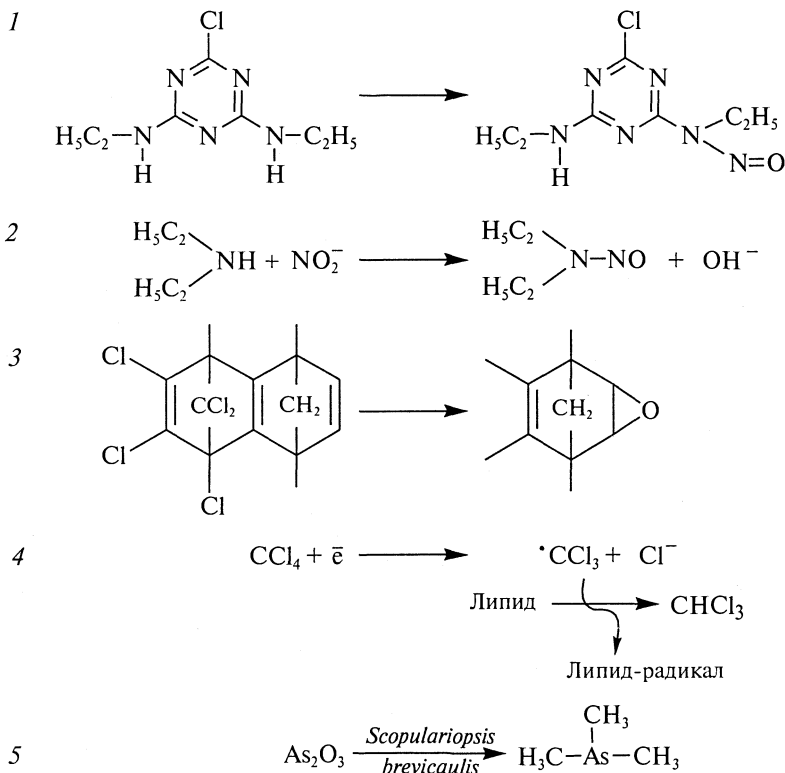


Рис. 2.1. Биотрансформация некоторых ксенобиотиков и загрязняющих веществ:

1 — окисление симазина с образованием канцерогена; 2 — окисление диэтиламина с образованием канцерогенного продукта в желудке млекопитающих; 3 — окисление (эпоксидация) альдрина с образованием токсичного эпоксидадиэльдрина (реакция протекает в организме позвоночных, а также осуществляется многими почвенными организмами из 8 родов); 4 — восстановление четыреххлористого углерода в печени с образованием промежуточного трихлорметильного радикала, способного вступать в реакции окисления и переводить другие молекулы в перекисные соединения, вызывающие повреждение печени; 5 — трансформация оксида мышьяка с образованием триметилированного производного мышьяка

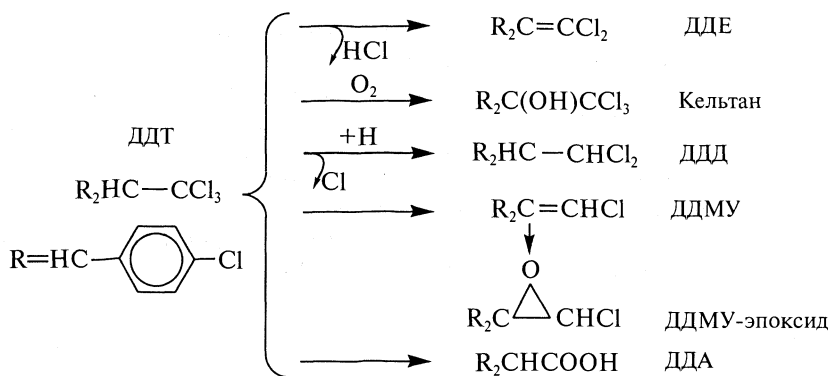


Рис. 2.2. Продукты биотрансформации ДДТ:

ДДЕ — канцероген для нескольких видов млекопитающих; ДДМУ — мутаген для сальмонелл; ДДА — производное ацетата; ДДМУ-эпоксид — продукт конденсации ДДА и ДДМУ, способный вызывать рак у мышей; ДДД — хлорированное восстановленное производное ДДМУ

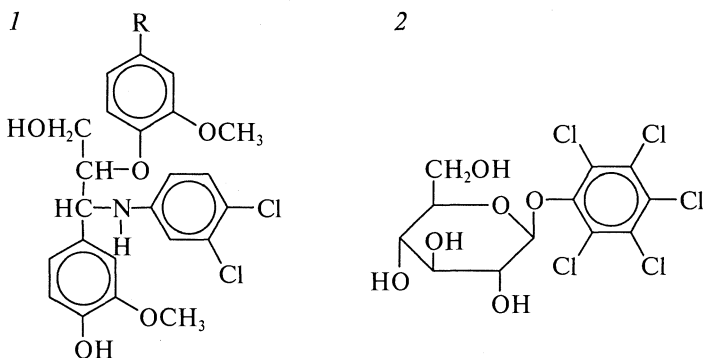


Рис. 2.3. Конъюгаты чужеродных веществ с биомолекулами растений:

1 — ковалентное связывание 3,4-дихлоранилина лигнином с образованием нерастворимого конъюгата; 2 — продукт конъюгации пентахлорфенола с глюкозой

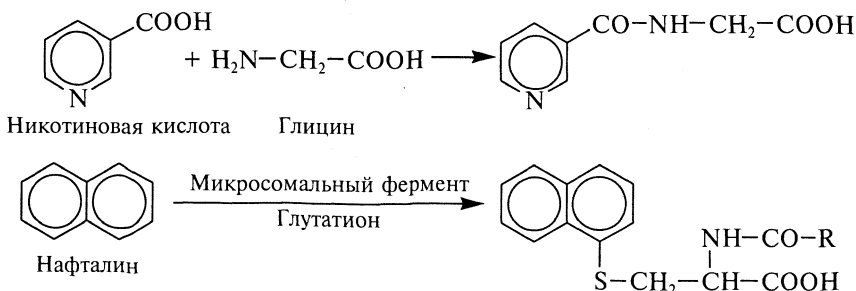


Рис. 2.4. Примеры конъюгации у животных

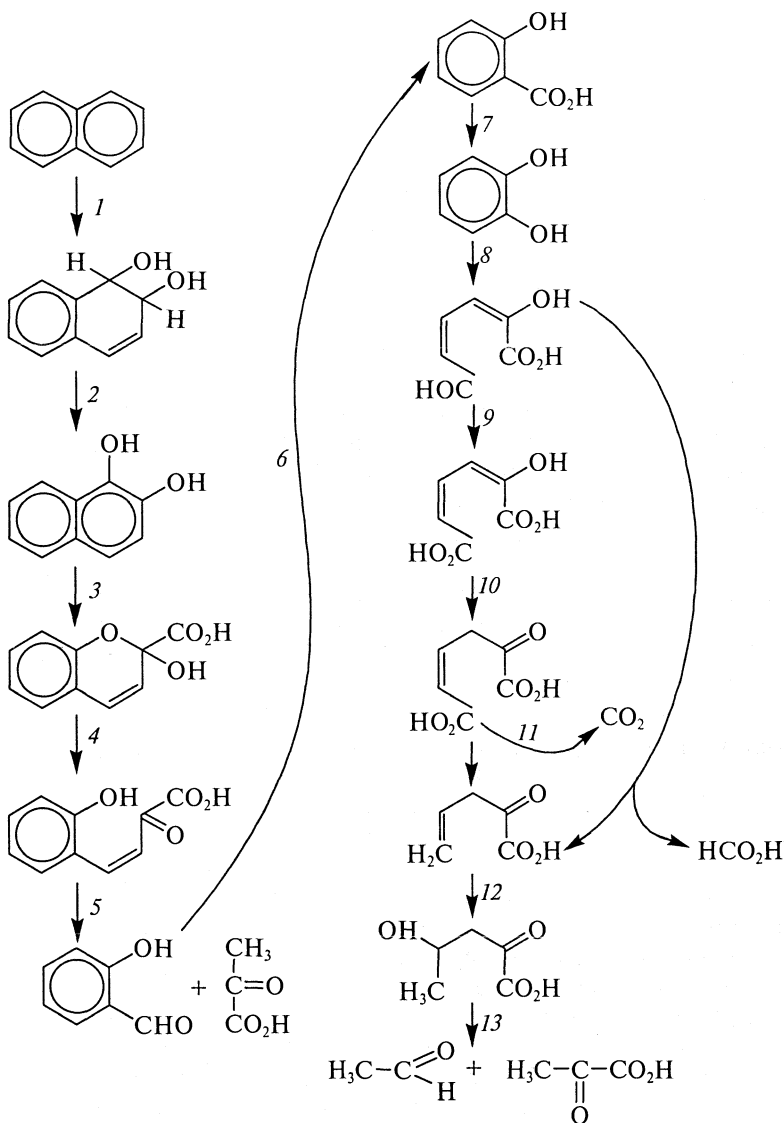


Рис. 2.5. Последовательность ферментативных реакций биодеградации нафталина:

1 — нафталиндиоxygenаза; 2 — *цис*-дигидродиолнафталиндегидрогеназа; 3 — 1,2-диоксинафталиндиоxygenаза; 4 — 2-оксихромен-2-2-карбоксилатизомераза; 5 — 2-оксисбензальпируватальдолаза и пируват; 6 — салицилальдегиддегидрогеназа; 7 — салицилатгидроксилаза; 8 — катехолдиоxygenаза; 9 — 2-оксимуконатсемилальдегиддегидрогеназа; 10 — 2-оксимуконаттаутомераза; 11 — 4-оксалилкротонатдекарбоксилаза; 12 — 2-оксо-4-пентеноатгидратаза; 13 — 2-оксо-4-оксипентаноатальдолаза и пируват

Среди ксенобиотиков, вносимых человеком в биосферу, немалая часть относится к производным нафталина и салициловой кислоты. В превращении этих соединений участвует большое число ферментов.

2.3. ПОЛУЧЕНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТОЙ ЭНЕРГИИ. БИОГАЗ

Экологически чистую энергию можно получать путем преобразования солнечной энергии в электрическую с помощью солнечных коллекторов, а также из *биогаза и микробного этанола*.

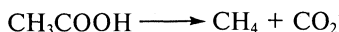
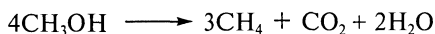
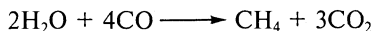
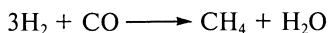
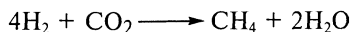
Биогаз — это смесь из 65 % метана, 30 % CO_2 , 1 % сероводорода и незначительных примесей азота, кислорода, водорода и угарного газа. Энергия, заключенная в 28 м³ биогаза, эквивалентна энергии: 16,8 м³ природного газа; 20,8 л нефти; 18,4 л дизельного топлива. В основе получения биогаза лежит процесс метанового брожения, или биометаногенез — процесс превращения биомассы в энергию.

Биометаногенез — сложный микробиологический процесс, в котором органическое вещество разлагается до диоксида углерода и метана в аэробных условиях. Микробиологическому анаэробному разложению поддаются практически все соединения природного происхождения, а также значительная часть ксенобиотиков органической природы. В анаэробном процессе биометаногенеза выделяют три последовательные стадии, в которых участвуют свыше 190 различных микроорганизмов. На *первой стадии* под влиянием экстрацеллюлярных ферментов ферментативному гидролизу подвергаются сложные многоуглеродные соединения — белки, липиды и полисахариды. Вместе с гидролитическими бактериями функционируют и микроорганизмы — бродильщики, которые ферментируют моносахариды, органические кислоты.

На *второй стадии* (ацидогенез) в процессе ферментации участвуют две группы микроорганизмов: ацетогенные и гомоацетатные. Ацетогенные H_2 -продуцирующие микроорганизмы ферментируют моносахариды, спирты и органические кислоты с образованием H_2 , CO_2 , низших жирных кислот, в основном ацетата, спиртов и некоторых других низкомолекулярных соединений. Деградация бутирата, пропионата, лактата с образованием ацетата происходит при совместном действии ацетогенных H_2 -продуцирующих и H_2 -утилизирующих бактерий. Гомоацетатные микроорганизмы усваивают H_2 и CO_2 , а также некоторые одноуглеродные соединения через стадию образования ацетил-КоА и превращения его в низкомолекулярные кислоты, в основном в ацетат.

На заключительной *третьей стадии* анаэробного разложения отходов образуется метан. Он может синтезироваться через ста-

дию восстановления CO_2 молекулярным водородом, а также из метильной группы ацетата. Некоторые метановые бактерии способны использовать в качестве субстрата формиат, CO_2 , метанол, метиламин и ароматические соединения:



Особое место в утилизации отходов занимает метановое сбраживание. Оно позволяет получать из местного сырья биогаз как локальный источник энергии, а также улучшать качество органического удобрения и защищать окружающую среду от загрязнений. Экологически чистые источники энергии не влияют отрицательно на окружающую среду. Современные источники энергии — ГЭС, ТЭС, АЭС — вызывают серьезные нарушения во внешней среде. ГЭС (гидроэлектростанции) служат причиной затопления территорий, изменения ландшафта, гибели биоценозов. ТЭС (теплоэлектростанции) загрязняют атмосферу, нарушают альгологический баланс, вызывают отчуждение земель. АЭС (атомные электростанции) создают угрозу радиационного загрязнения. Сжигание нефти и газа вызывает повышение концентрации CO_2 , образование смога и, кроме того, уменьшение ресурсов нефти и газа.

90—95 % используемого углерода метанообразующие бактерии превращают в метан и лишь 5—10 % углерода превращаются в биомассу. В литературе имеются данные о способности метанообразующих бактерий в анаэробных условиях одновременно синтезировать и окислять метан.

В зависимости от температуры протекания процесса метановые бактерии разделяют на мезо- и термофильные. Оптимальная температура для мезофильных бактерий от 30 до 40 °С, а для термофильных от 50 до 60 °С. В целом термофильный процесс метаногенеза идет интенсивнее мезофильного, притом в этих условиях анаэробной переработки отходов субстрат обеззараживается от патогенной микрофлоры и гельминтов. При анаэробной переработке отходов животноводческих ферм микрофлора метантенков (анаэробных ферментеров) формируется преимущественно из микрофлоры желудочно-кишечного тракта данного вида животных и микрофлоры окружающей среды. Из наиболее часто встречающихся культур следует отметить *Lactobacillus acidophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Peptostreptococcus productus*, *Bacteroides uniformis*, *Eubacterium aerofaciens*. К числу целлюлозоразлагающих бактерий микрофлоры жвач-

ных относятся *Bacteroides succinoqenes* и *Ruminococcus flavefaciens*. Из ружца и навоза жвачных были изолированы такие метанообразующие бактерии, как *Methanobacterium mobile*, *Methanobrevibacter ruminantium* и *Methanosarcina* ssp. После определенного срока работы метантенка при установленном температурном режиме и на постоянном субстрате образуется сравнительно стабильный консорциум микроорганизмов. В ходе изучения микрофлоры свиного навоза при метановом брожении выделено около 130 различных бактерий.

Первую стадию разрушения сложных органических полимеров осуществляют бактерии из родов *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyrivibro*. Главные продукты ферментации — ацетат, пропионат, сукцинат, H_2 и CO_2 . Конечными продуктами ферментации целлюлозы и гемицеллюлозы под действием бактерий, выделенных из ружца жвачных и кишечника свиней, являются различные летучие жирные кислоты.

Бактерии второй, или ацетогенной, фазы, относящиеся к родам *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas* и *Desulfovibrio*, вызывают разложение пропионата, бутирата, лактата и пирувата до ацетата, H_2 и CO_2 — предшественников метана. Ряд микроорганизмов способны синтезировать ацетат из CO_2 в термофильных условиях, к их числу принадлежат *Clostridium formicoaceticum*, *Acetobacterium woodii*, метановые бактерии из родов *Methanothrix*, *Methanosarcina*, *Methanococcus*, *Methanogenium* и *Methanospirillum*.

Для получения биогаза можно использовать отходы сельского хозяйства, испорченные продукты, стоки крахмалперерабатывающих предприятий, жидкие отходы сахарных заводов, бытовые отходы, сточные воды городов и спиртовых заводов. Процесс ведется при температуре 30—60 °С и рН 6—8. Этот способ получения биогаза широко применяют в Индии, Китае, Японии. В настоящее время для производства биогаза чаще используют вторичные отходы (отходы животноводства и сточные воды городов), чем первичные (отходы зерноводства, полеводства, хлопководства, пищевой, легкой, микробиологической, лесной и других отраслей), обладающие сравнительно низкой реакционной способностью и нуждающиеся в предварительной обработке. На рис. 2.6 представлена схема устройства реактора (метантенка) для обработки сельскохозяйственных отходов (навоз, остатки растениеводства). Подача отходов (суб-

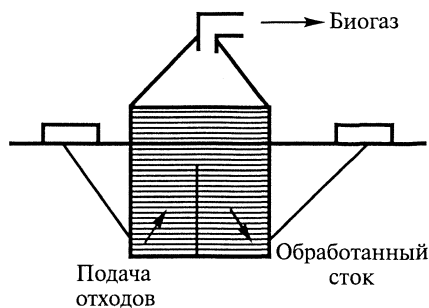


Рис. 2.6. Схема устройства реактора для обработки сельскохозяйственных отходов

страта) и отбор отработанного стока осуществляются в нижней части реактора. Режим его работы может быть как периодическим, так и полунепрерывным. Реактор обычно имеет две (или более) секции для разделения стадий процесса.

Современное состояние проблем и перспектив в области получения биогаза свидетельствует о том, что анаэробная конверсия органических отходов в метан — наиболее конкурентоспособная область биоэнергетики. Основное преимущество биогаза состоит в том, что он является возобновляемым источником энергии. Его производство будет так же длительно, как существование жизни на Земле.

2.4. ПРОИЗВОДСТВО ЭТАНОЛА

Энергию можно получать из растений, богатых углеводами, превращая их в спирт (этанол). К ним относятся меласса, картофель, маниок, стебли кукурузы, злаки, топинамбур (земляная груша). Большое количество этанола получают из гидролизатов древесины лиственных пород или из сульфитных щелоков — отходов бумажных фабрик. Полученный спирт можно смешивать с бензином в соотношении 1:9 (или даже 1:4) и заправлять им машины.

Рост производства этанола связан с широтой его применения в химической промышленности. Он прекрасный растворитель, антифриз, экстрагент. Этанол служит также субстратом для синтеза многих растворителей, красителей, лекарственных препаратов, смазочных материалов, клеев, моющих средств, пластификаторов, взрывчатых веществ и смол для производства синтетических волокон. Его используют в двигателях внутреннего сгорания либо в безводном виде, либо в форме гидратированного этанола. Среди растений, продуцирующих этиловый спирт, следует выделить маниок, злаки (особенно кукурузу) и топинамбур, у которого запасным углеводом является инулин. Используются также сахарный тростник, ананас, сахарная свекла, сорго, у которых основной углевод — сахароза. При переработке сахарного тростника его тщательно делят, целлюлозу (жом) отделяют от сладкого сока и сжигают, а сок концентрируют, стерилизуют и подвергают брожению. Этот раствор отделяют от твердых компонентов и далее из 8—10 %-го спиртового раствора путем перегонки получают этанол. Из оставшейся жидкости (стиллаж) после соответствующей переработки извлекают компоненты удобрений с выходом 2—3 %. «Барду» (кубовой остаток) после перегонки используют в качестве корма для сельскохозяйственных животных. Крахмал при его переработке сначала гидролизуют в сбраживаемые сахара. Производство этанола из мелассы с использованием жома

сахарного тростника в качестве топлива выгодно при современных ценах на сырую нефть.

Данное производство должно быть строго скоординировано со структурой сельскохозяйственных систем и энергопотребляющих секторов хозяйств. Прекрасным сырьем для получения этанола является маниок, способный расти и в полупустынных районах; он может использоваться круглогодично. Из 1 т маниока удается получить 80 л этанола, а из 1 т сахарного тростника — 60—65 л.

В США широко применяют смесь из 6—9 г бензина и 1 г этанола (газохол). В 28 штатах ею заправляют около 800 станций, но для замены всего бензина, потребляемого в США, газоходом потребуется ежегодно производить 45,6 млрд л этанола, что значительно превышает производимое количество спирта, в том числе из злаков.

Среди других технических культур наибольшее предпочтение отдают топинамбуру, который имеет много ботвы, способной компенсировать энергозатраты на перегонку спирта. Инулин, содержащийся в клубнях, после гидролиза и брожения может обеспечить 30—50 гл ацетонобутаноловой смеси с 1 га. Во Франции впервые осуществлена замена 10 % чистого бензина смесью метанола и ацетонобутанола. Перспективна также замена бензина этанолом, получаемым из отходов сахарной промышленности.

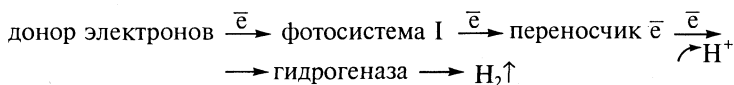
2.5. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ

Все возрастающий дефицит ископаемых топливных ресурсов выдвигает на первый план острую проблему создания и внедрения *возобновляемых источников энергии* и сырья за счет биосистем: растений и фототрофных микроорганизмов, конвертирующих с высокой эффективностью солнечную энергию в энергию химических связей. Резервы солнечной энергии достаточно велики: на поверхность земного шара попадает около $5 \cdot 10^{20}$ ккал этой энергии в год, что в 10 000 раз превосходит современный уровень мировой энергетики за счет добычи ископаемого топлива. Солнечная энергия способна обеспечить современный и будущий уровень энергозатрат человечества. Количество энергии, падающей на общую площадь пустынь на Земле ($2 \cdot 10^7$ км²), достигает $5 \cdot 10^{18}$ кВт·ч. Если бы удалось освоить эту энергию с КПД хотя бы 5 %, то уровень мировой энергетики возрастет более чем в 200 раз. Даже если будущее население Земли достигнет 10 млрд человек, то энергия, снятая с земной поверхности, в 10—12 раз будет превышать необходимые потребности. Ведутся исследования в направлении освоения солнечной энергии, падающей на поверхность морей и океанов.

Совершенно очевидно, что один из наиболее перспективных методов крупномасштабного преобразования солнечной энергии основан на использовании биосистем. Широкое применение биосистем для получения энергии способно обеспечить свыше 15 % производства энергии для экономически развитых стран. В последние 10—15 лет намечены новые пути биотрансформации солнечной энергии при *фотосинтезе*. Установлено, что некоторые микробиологические системы характеризуются высокой эффективностью фотосинтеза. Так, фоторазложение воды, осуществляемое суспензией хлореллы с образованием кислорода, в оптимальных условиях культивирования дает 130—140 л газа с 1 м² освещаемой поверхности в сутки. Известно, что одна из особенностей процесса фотосинтеза — уменьшение эффективности преобразования солнечной энергии при высоких значениях интенсивности света. Новые технологии позволяют повысить эффективность фотосинтеза при высокой интенсивности света. Разрабатываются системы, эффективно поглощающие световой поток и обогащенные реакционными центрами по отношению к пигменту. Световые кривые фотосинтеза улучшаются также с увеличением скорости лимитирующей стадии электронного транспорта. Например, проведение процесса при повышенных температурах в системах термофильных микроорганизмов увеличивает эффективность преобразования солнечной энергии при высокой интенсивности света.

2.6. ФОТОПРОИЗВОДСТВО ВОДОРОДА

Известно, что хлоропласты (например, из шпината) в присутствии искусственного донора электронов и бактериального экстракта, содержащего фермент гидрогеназу, способны продуцировать водород:



Гидрогеназа получает электроны от ферредоксина. В качестве доноров электронов используются различные органические соединения. Процесс сопровождается облучением видимым светом. Эта форма получения энергии имеет ряд достоинств: избыток субстрата фотоллиза (воды); нелимитированный источник энергии (солнечный свет); не загрязняющий атмосферу водород. Водород обладает более высокой теплотворной способностью по сравнению с углеводородами, кроме того, процесс получения водорода — возобновляемый процесс, зависящий в основном от стабильности выделенных хлоропластов. Водород можно получать в присутствии искусственного донора \bar{e} (вместо воды) и поглощающих свет пиг-

ментов, а не мембран хлоропластов. Его способны выделять и некоторые микроорганизмы, например цианобактерии (аэробные фототрофы) и др. При этом микробиологическое образование водорода может идти из соединений углеводного характера, включая крахмал и целлюлозу, а также из аминокислот.

Основная проблема создания систем конверсии энергии биомассы в водород связана с превращением этих метаболитов в топливную форму. Для биотехнологии можно было бы воспользоваться и другими механизмами превращения энергии, выявленными у микроорганизмов. Например, галофильная бактерия *Halobacterium halobium* способна использовать световую энергию, улавливаемую пурпурным пигментом (*бактериородопсином*), вмонтированным в мембрану клетки. Молекула пигмента состоит из одной полипептидной цепи, к которой прикреплена молекула ретиналя, являющегося светочувствительной частью пигмента. Под влиянием солнечного света изменяется конформация пигмента, приводящая к переносу ионов водорода (H^+) через мембрану. Пигмент является как бы протонным насосом. Молекулы бактериородопсина располагаются в мембране триадами, и перекачивание протонов через мембрану обеспечивает градиент концентрации H^+ (ΔH^+), вследствие чего они движутся к наружной стенке, у которой пространство подкисляется и возникает электрохимический градиент ($\Delta \mu_{H^+}$).

Предприняты попытки встраивания молекул пигмента в искусственные системы и повышения эффективности их использования. В частности, растущие бактерии *H. halobium* переносят в мелкие водоемы с высокой концентрацией NaCl и других минеральных солей, в которых исключается загрязнение. У некоторых штаммов половина клеточной мембраны покрыта пурпурным пигментом, и из 10 л бактериальной культуры можно получить 0,5 г пурпурных мембран. В таких биомембранах содержится до 100 000 молекул родопсина. Биомембраны фиксируют на особой подложке, которая должна обладать всеми свойствами, необходимыми для обеспечения тока протонов, а не других ионов. В частности, для этих целей вполне пригодны пористые подложки, пропитанные липидами, которые, сливаясь с мембраной, сплошным слоем покрывают поверхность фильтра. Мембранные фрагменты можно смешивать и с акриламидом с образованием геля. Вместо создания плотных слоев молекул бактериородопсин и липиды могут создавать *протеолипосомы*, которые встраивают в структуры, обеспечивающие эффективное перекачивание протонов.

У *H. halobium* имеется и другой тип насоса, который обеспечивает галородопсин, использующий световую энергию непосредственно для перекачивания ионов. Изучение систем энергоконверсии чрезвычайно перспективно с точки зрения разработки искусственных устройств, более эффективных, чем естественные.

2.7. ОЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД

Важнейшая проблема экологической биотехнологии — очистка сточных вод. Потребность в воде в связи с ростом городов, бурным развитием промышленности, интенсификацией сельского хозяйства огромна. Ежегодный расход воды на земном шаре по всем видам водоснабжения составляет 3300—3500 км³, при этом в сельском хозяйстве — 70 % всего водопотребления. Для производств химической, целлюлозно-бумажной, энергетической промышленности, черной и цветной металлургии и бытовых нужд населения требуется также значительное количество воды. Большая часть этой воды после ее использования возвращается в реки и озера в виде сточных вод.

На современном этапе выделяются следующие направления рационального расхода водных ресурсов: более полное использование и расширение воспроизводства ресурсов пресных вод; разработка новых биотехнологических процессов, позволяющих предотвратить загрязнение водоемов и свести к минимуму потребление свежей воды.

Загрязнение поверхностных и подземных вод можно подразделить на несколько типов: механическое, сопровождающееся повышением содержания механических примесей и относящееся в основном к поверхностным видам загрязнений; химическое, обусловленное присутствием в воде органических и неорганических веществ токсического и нетоксического действия; биологическое, связанное с наличием в воде разнообразных патогенных микроорганизмов, грибов и мелких водорослей; радиоактивное; тепловое.

Основные источники загрязнения и засорения водоемов — недостаточно очищенные сточные воды промышленных и коммунальных предприятий, крупных животноводческих комплексов, отходы производства при разработке рудных ископаемых (воды шахт, рудников); сбросы водного и железнодорожного транспорта; пестициды и т. д. Загрязняющие вещества, попадая в природные водоемы, качественно изменяют их состав.

Сточные воды содовых, сульфатных, азотно-туковых заводов, обогатительных фабрик свинцовых, цинковых, никелевых руд, содержащие кислоты, щелочи, ионы тяжелых металлов, меняют физические свойства воды (появление неприятных запахов, привкусов и т. д.). Сточные воды нефтеперерабатывающих, нефтехимических заводов, предприятий органического синтеза содержат различные нефтепродукты, аммиак, альдегиды, смолы, фенолы и другие вредные вещества. Вследствие окислительных процессов уменьшается содержание в воде кислорода, ухудшаются ее органические показатели.

Нефть и нефтепродукты — основные загрязнители внутренних водоемов, вод и морей Мирового океана — создают разные фор-

мы загрязнения: плавающую на воде нефтяную пленку, осевшие на дно водоемов тяжелые фракции. Вода приобретает токсические свойства и представляет собой угрозу для всего живого: 12 г нефти делают непригодной для употребления 1 т воды. Вредным загрязнителем промышленных вод является фенол, содержащийся в сточных водах многих нефтехимических предприятий. На жизнь населения водоемов пагубно влияют сточные воды целлюлозно-бумажной промышленности. Окисление древесной массы сопровождается поглощением значительного количества кислорода, что приводит к гибели икры, мальков и взрослых рыб. Сточные воды, имеющие повышенную радиоактивность (100 кюри на 1 л и более), подлежат захоронению в подземные бессточные бассейны и специальные резервуары.

В значительной степени загрязняют водоемы моющие синтетические средства, широко используемые в быту, промышленности и сельском хозяйстве и парализующие жизнедеятельность бактерий. Пестициды, попадая в водоемы, накапливаются в планктоне, бентосе, рыбе и по цепочке питания попадают в организм человека, действуя отрицательно как на отдельные органы, так и на организм в целом. Сточные воды, содержащие отходы кожевенной и целлюлозно-бумажной промышленности, сахарных и пивоваренных заводов, предприятий мясомолочной, консервной и кондитерской промышленности, служат причиной органических загрязнений водоемов. Нагретые сточные воды тепловых электростанций вызывают тепловое загрязнение, которое резко изменяет термический режим, отрицательно влияет на флору и фауну водоемов. Возникают благоприятные условия для массового развития в водохранилищах синезеленых водорослей (так называемое «цветение воды»).

Методы очистки сточных вод (механические, химические, физико-химические и биологические). Применение того или иного метода в каждом конкретном случае определяется характером и степенью вредности примесей.

1. *Механические методы.* Сущность этих методов состоит в том, что из сточных вод путем отстаивания и фильтрации удаляют механические примеси. Грубодисперсные частицы в зависимости от размеров улавливаются решетками, ситами, песколовками, навозоуловителями, нефтеловушками и т.д. Механическая очистка позволяет выделять из бытовых сточных вод до 60—75 % нерастворимых примесей, а из промышленных — до 95 %, многие из которых как ценные примеси используются в производстве.

2. *Химический метод.* В сточные воды добавляют различные химические реагенты, которые вступают в реакцию с загрязнителями и осаждают их в виде нерастворимых осадков. Химическая очистка уменьшает количество нерастворимых примесей до 95 %, а растворимых — до 25 %.

3. *Физико-химические методы* используют для удаления тонкодисперсных и растворенных неорганических примесей, а также разрушения органических и плохо окисляемых веществ. В арсенал этих методов входят электролиз, окисление, сорбция, экстракция, ионообменная хроматография, ультразвук, высокое давление и др.

4. *Биологический метод* основан на использовании закономерностей биохимического и физиологического самоочищения рек и других водоемов. Для очистки сточных вод используют биофильтры, биологические пруды и аэротенки.

В биофильтрах сточные воды пропускают через слой крупнозернистого материала, покрытого тонкой бактериальной пленкой, благодаря которой интенсивно протекают процессы биологического окисления. В биологических прудах в очистке сточных вод принимают участие все организмы, населяющие водоем.

Аэротенки — огромные резервуары из железобетона, в которых очистка происходит с помощью активного ила из бактерий и микроскопических животных, которые бурно развиваются в этих сооружениях, чему способствуют органические вещества сточных вод и избыток кислорода, поступающего с потоком подаваемого воздуха. Бактерии, склеивающиеся в хлопья, выделяют в среду ферменты, разрушающие органические загрязнения. Ил с хлопьями оседает, отделяясь от очищенной воды. Инфузории, жгутиковые, амёбы, колероватки и другие мельчайшие животные, пожирая бактерии, не слипшиеся в хлопья, тем самым омолаживают бактериальную массу ила. Сточные воды сначала подвергают механической, а после химической очистке для удаления болезнетворных бактерий путем хлорирования жидким хлором или хлорной известью. Для дезинфекции используют также ультразвук, озонирование, электролиз и другие методы.

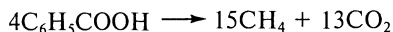
Биологический метод дает существенные результаты при очистке коммунально-бытовых стоков, а также отходов предприятий нефтеперерабатывающей, целлюлозно-бумажной промышленности и производства искусственного волокна. Однако он разрушает только относительно простые органические и аммонийные соединения.

Отстой сточных вод и его использование. В зависимости от степени обработки отстой городских сточных вод обычно делят на *первичный* (необработанный), состоящий из твердых веществ; *вторичный* — твердые вещества, выделяющиеся после вторичного отстоя, или отстой с биофильтров очистных сооружений; *третичный* — результат третичного отстоя сточных вод (известь и глина); *отстой, перегнивший в анаэробных условиях.*

До осушки отстой содержит большое количество влаги (до 95 %). После некоторой стабилизации отстоя, которая достигается путем его сбраживания, содержание твердых веществ составляет 30 %.

Доля содержания органической части в городских сточных водах колеблется от 50 % в перегнившем отстое до 70 % в необработан-

ном отстое. Химический состав типичных отстоев составляет: азот (N) — до 2 %; фосфор (P₂O₅) — 4 %; калий — до 0,5 %. В небольших количествах обнаружены Cd, Cu, Ni, Zn, Hg и Pb. Энергосодержание необработанного отстоя составляет около 16 284 кДж/год. Однако практическое использование отстоя в качестве топлива связано с рядом трудностей: высокое содержание влаги не позволяет использовать отстой без высушивания, на которое расходуется фактически вся выделяемая в процессе его горения энергия. При очистке сточных вод применяют и метановое брожение, которое осуществляется в реакторах (метантенках) в основном двух типов: в реакторах без фиксации биомассы и в реакторах с прикрепленной (фиксированной) биомассой. В качестве подложки, к которой прикрепляется биомасса, используют мелкий песок, окись алюминия и другие носители. В последнее время анаэробное метановое брожение применяют и для детоксикации стоков. Анаэробные бактерии помимо деградации углеводов, липидов, белков, нуклеиновых кислот способны разрушать и многие отходы нефтехимической промышленности, например бензойную кислоту:



Адаптированные ассоциации анаэробов деградируют ацетальдегид, ацетон, бутанол, этилацетат, этилакрилат, глицерол, нитробензол, фенол, пропанол, пропиленгликоль, кротоновую, fumarовую и валериановую кислоты, винилацетат, парафины, синтетические полимеры и многие другие вещества.

Глава 3

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА
МЕТАБОЛИТОВ3.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОДУКТОВ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Спектр продуктов, образующихся методами биотехнологии, необычайно широк и разнообразен. Целевыми продуктами биотехнологических производств могут быть интактные клетки. Одноклеточные организмы используют для получения биомассы, являющейся источником кормового белка. Клетки, особенно в иммобилизованном состоянии, выступают в роли биологических катализаторов для процессов биотрансформации.

Процессами биотрансформации называют реакции превращения исходных органических соединений (предшественников) в целевой продукт с помощью клеток живых организмов или ферментов, выделенных из них. В последние годы высокая специфичность процессов биотрансформации и эффективность иммобилизованных ферментов нашли широкое применение для крупномасштабного производства аминокислот, антибиотиков, стероидов и других промышленно важных продуктов.

Продуктами биотехнологических производств являются природные макромолекулы — белки, ферменты, полисахариды, по-

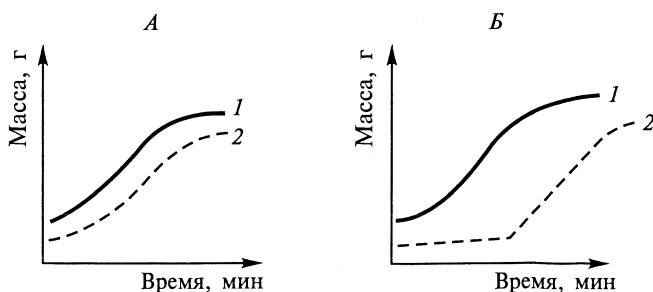


Рис. 3.1. Динамика изменения биомассы и образования первичных (А) и вторичных (Б) метаболитов в процессе роста организма:

1 — биомасса; 2 — продукт

лиэферы (поли-β-гидроксibuтират), выделенные из клеток микроорганизмов, тканей и органов растений и животных.

По отношению к процессу роста низкомолекулярные продукты метаболизма живых клеток делятся на первичные и вторичные метаболиты (рис. 3.1). Первичные метаболиты необходимы для роста клеток. К ним относятся структурные единицы биополимеров — аминокислоты, нуклеотиды, моносахариды, а также витамины, коферменты, органические кислоты и другие соединения. Вторичные метаболиты (антибиотики, пигменты, токсины) — низкомолекулярные соединения, не требующиеся для выживания клеток и образующиеся по завершении фазы их роста.

3.2. МЕХАНИЗМЫ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Центральное звено биотехнологического процесса — живая клетка, в которой одновременно синтезируется великое множество разнообразных соединений. В норме обмен веществ в клетке осуществляется по принципам строжайшей экономии, что обеспечивается сложнейшей системой регуляции обмена веществ. Задача биотехнолога состоит в обеспечении сверхсинтеза одного из продуктов метаболизма, что достигается как путем изменения генетической программы организма, так и посредством нарушения регуляторных систем метаболизма в нем.

Спонтанные изменения генетической природы организма — продуцента основаны на процессах рекомбинации генетического материала *in vivo* (амплификация, конъюгация, трансдукция, трансформация и пр.). Для выделения из природных популяций высокопродуктивных штаммов микроорганизмов используют методы селекции, т. е. направленного отбора организмов со скачкообразным изменением геномов. Методы слепого многоступенчатого отбора случайных мутаций чрезвычайно длительны и могут занимать целые годы. Для возникновения мутаций интересующий ген должен удвоиться 10^6 — 10^8 раз. Более эффективен метод искусственного повреждения генома. Таким методом является *индуцированный мутагенез*, основанный на использовании мутагенного действия ряда химических соединений (гидроксиламин, нитрозамины, азотистая кислота, бромурацил, 2-аминопурин, алкилирующие агенты и др.), рентгеновских и ультрафиолетовых лучей. Мутагены вызывают замены и делеции оснований в составе ДНК, а также индуцируют мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания информации.

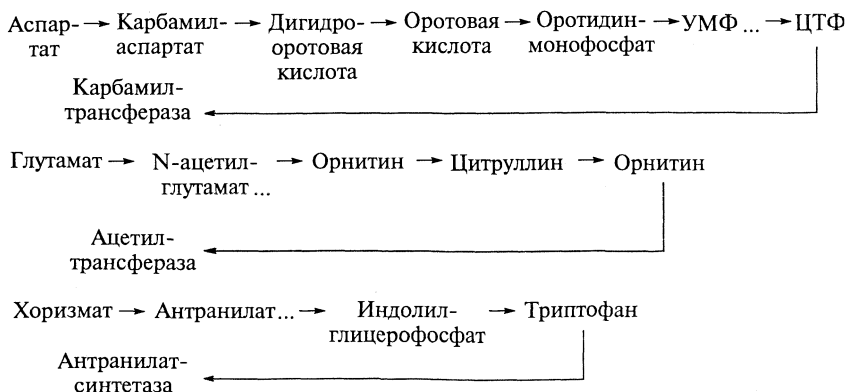
Несмотря на трудоемкость методов селекции, они не потеряли своего значения для создания высокоэффективных микроорганиз-

мов — продуцентов и оказались перспективными для оценки влияния на объекты различных факторов среды — ионов тяжелых металлов, кислот, щелочей и др. В 1983 г. С. Браун и С. Оливер использовали методы селекции для отбора мутантных штаммов дрожжей, устойчивых к высоким концентрациям конечного продукта (10 %-го этанола), при культивировании их в непрерывном режиме (650 ч). Многолетняя селекция штаммов-продуцентов пенициллина позволила увеличить удельную активность антибиотика в культуральной среде в 400 раз, а штаммов бактерий, синтезирующих кобаламин, — в 10 раз. Методами мутагенеза и селекции получены штаммы *Eremothecium ashbyii*, способные выделять до 1,8 мг рибофлавина в 1 мл среды, и штаммы *Brevibacterium ammonigenes*, продуцирующие до 1 г HSKoA на 1 л среды.

Достижения в области молекулярной биологии и молекулярной генетики позволили биотехнологам начиная с 70-х годов прошедшего столетия перейти от слепого отбора штаммов мутантов к сознательному конструированию геномов, используя для этой цели прогрессивную технологию рекомбинантной ДНК.

Каждое из множества разнообразных веществ создается в клетке в строго необходимых для роста пропорциях в результате ферментативных реакций. Координация химических превращений, обеспечивающая экономность метаболизма, осуществляется у микроорганизмов тремя основными механизмами: регуляцией активности ферментов, в том числе путем ретроингибирования; регуляцией объема синтеза ферментов (индукция и репрессия биосинтеза ферментов); катаболитной репрессией.

В процессе *ретроингибирования* (ингибирование по принципу обратной связи) активность фермента, стоящего в начале многоступенчатого превращения субстрата, тормозится конечным метаболитом, что детально разработано при изучении регуляции биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов и новообразования ряда аминокислот:



Таким способом низкомолекулярные метаболиты передают информацию об уровне своей концентрации и состоянии обмена веществ ключевым ферментам метаболизма. Ключевые ферменты — это регуляторы периодичности в процессе функционирования энзима и соответственно образования продукта. Эти ферменты представлены в клетке аллостерическими белками, а конечные метаболиты — аллостерическими эффекторами (активаторами и ингибиторами) ключевых энзимов. С помощью описанного механизма конечные продукты саморегулируют свой биосинтез. Ретроингибирование — способ точного и быстрого регулирования образования продукта.

На обмен веществ, аналогичный конечным метаболитам, оказывают эффект их аналоги (табл. 3.1). Указанное обстоятельство используется для селекции организмов с нарушением механизма обратной связи. Обход механизма ретроингибирования делает объект биотехнологического процесса нечувствительным к концентрации конечного продукта.

Таблица 3.1

Аналоги конечных метаболитов

Конечный метаболит	Аналог конечного метаболита
L-аргинин	D-аргинин
L-гистидин	L-тиазоаланин
L-лейцин	L-валин
L-триптофан	5-метилтриптофан

Для отбора объектов продуценты выращивают на селективной среде, содержащей подходящий аналог или антиметаболит, которые не включаются в обмен веществ (в частности, аналоги аминокислот не включаются в состав белков), что ведет к подавлению роста организма. Выжившие мутанты обладают дефектами в механизме регуляции активности фермента по принципу обратной связи и поэтому служат важными объектами в обеспечении сверхсинтеза целевого продукта.

Среди тысяч энзимов, присущих микроорганизмам, одни, например ферменты гликолиза, синтезируются постоянно и их образование не зависит от состава питательной среды. Такие ферменты называют *конститутивными*. Другие энзимы, *адаптивные или индуцибельные*, возникают только в ответ на появление в питательной среде индукторов — субстратов или их структурных аналогов. Так, добавление β-галактозида — лактозы к питательной среде, на которой культивируются клетки кишечной палочки *E. coli*, вызывает мгновенное появление β-галактозидазы в них, биосинтез которой в последующий период времени возрастает в 10 000 раз. Установлено, что регуляция объема биосинтеза ферментов осуществляет-

ся на оперонном уровне (Ф. Жакоб и Ж. Моно, 1961) путем изменения количества иРНК, образующихся в процессе транскрипции.

Опероном называется упорядоченная совокупность структурных генов (со знаками начала и конца) и регуляторных участков. В состав регуляторной зоны оперона входят ген-регулятор, промотор, усилители транскрипции (энхансеры), ослабители транскрипции (сайлансеры) и другие компоненты.

В процессе индукции низкомолекулярный метаболит-индуктор (например, лактоза), соединяясь с репрессорным белком (продукт гена-регулятора), инактивирует его и тем самым препятствует взаимодействию белка-репрессора с зоной оператора, что обеспечивает возможность присоединения к промотору РНК-полимеразы и начало синтеза иРНК.

Изучение механизма регуляции новообразования аминокислот у микроорганизмов показало, что конечные продукты метаболических путей не только ингибируют активность ферментов первых стадий процесса, но и тормозят биосинтез ферментов последних его этапов. Таким образом, помимо аминокислот у микроорганизмов регулируется новообразование многих первичных метаболитов (пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, витаминов и других соединений). Обнаруженный феномен был назван *репрессией*, а ферменты, биосинтез которых стопорится под влиянием низкомолекулярных метаболитов, переводящих репрессорный белок в активную форму, способную оккупировать зону первоначального связывания РНК-полимеразы (оператор), называются *репрессибельными*. К их числу относятся глутаминсинтетаза, триптофансинтетаза, орнитинкарбамилтрансфераза, уреазы и ряд других энзимов. Специально поставленные опыты продемонстрировали, что репрессия биосинтеза ферментов обеспечивает более грубую в сравнении с ретроингибированием регуляцию образования анаболических энзимов.

Если концентрация конечного продукта уменьшается до определенного очень низкого уровня, то происходит дерепрессия фермента, т. е. скорость их биосинтеза возрастает до необходимых величин.

Бактериальные клетки продуцируют множество низкомолекулярных эффекторов в ответ на изменение окружающей среды (стресс, голодание, действие фагов и пр.). Каждый из эффекторов, взаимодействуя по аллостерическому механизму с определенными регуляторными белками, моделирует промоторную специфичность РНК-полимеразы, запуская тем самым экспрессию определенного набора генов.

Таким образом, ведущими механизмами, обеспечивающими экономность образования продуктов в клетках микроорганизмов, являются ретроингибирование и репрессия, базирующиеся на принципе обратной связи.

Если в питательной среде присутствуют несколько различных источников углерода, клетка микроорганизма вырабатывает фер-

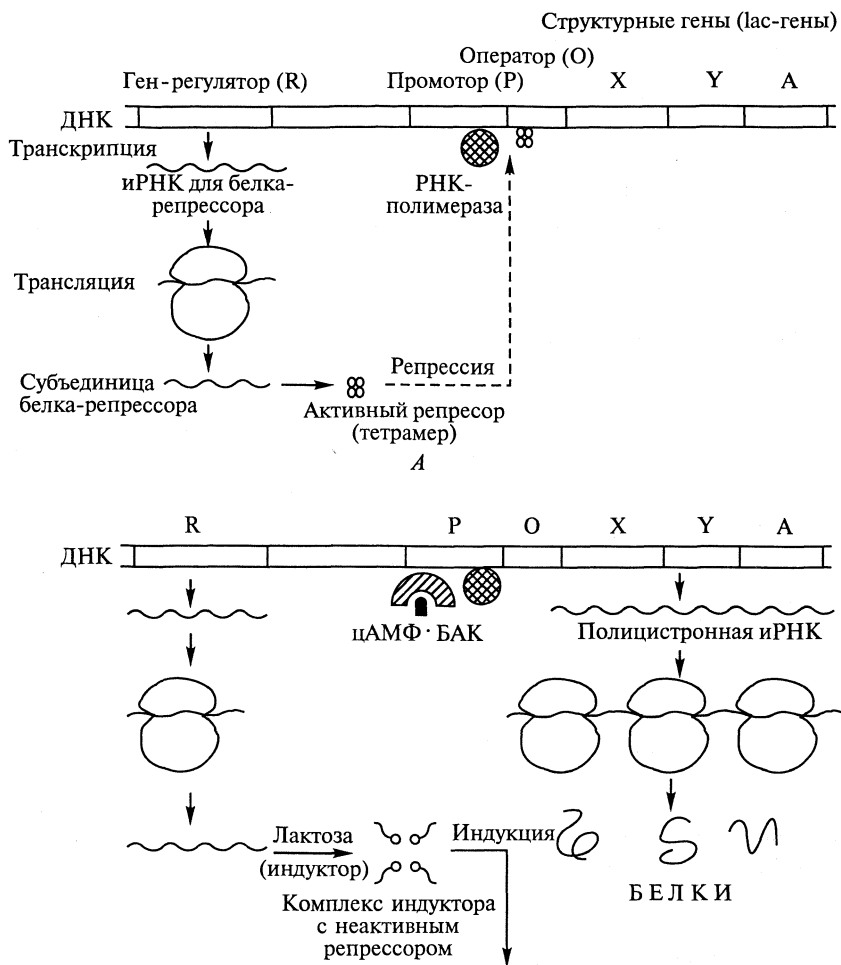


Рис. 3.2. Структура и механизм индукции и репрессии lac-оперона (пояснения в тексте):

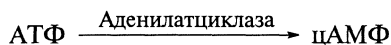
A — в отсутствие индуктора; B — в присутствии индуктора и при дефиците глюкозы

менты для усвоения лишь одного, наиболее предпочтительного субстрата. Так, когда клетки выращивают на смеси глюкозы и лактозы, то в первую очередь утилизируется глюкоза. После полного исчерпания глюкозы происходит экспрессия ферментов метаболизма лактозы (экспрессия структурных генов лактозного оперона). Это явление получило название *катаболитной репрессии*, так как ранее полагали, что причина его состоит в подавлении биосинтеза ферментов обмена лактозы продуктами катаболизма глюкозы.

Следовательно, сущность катаболитной репрессии заключается в подавлении биосинтеза ферментов, обеспечивающих метаболизм одного источника углерода другим источником углерода.

Лактозный оперон (lac-оперон) включает структурные гены трех ферментов: X, Y и A (отвечают за взаимозависимый синтез β -галактозидазы, галактозилпермеазы и ацетилтрансферазы), контролирующих метаболизм лактозы в клетке (рис. 3.2). Экспрессия ферментов регулируется белком-репрессором — продуктом гена-регулятора (R), пространственно удаленного от гена-оператора (O). Субъединицы репрессора (38кДа \times 4) возникают с постоянной скоростью. Репрессор обладает высоким сродством к соответствующему оператору ($K \approx 10^{-12}$ моль/л). Именно белок-репрессор, будучи присоединен к гену-оператору, препятствует транскрипции структурных генов X, Y и A.

Установлено, что катаболитная репрессия опосредуется действием специального белка-активатора катаболитных генов (БАК). Об отсутствии глюкозы в среде сигнализирует цАМФ. Лишь при дефиците глюкозы формируется комплекс цАМФ и БАК, абсолютно необходимый для связывания РНК-полимеразы с зоной промотора и начала транскрипции генов. В присутствии глюкозы концентрация цАМФ недостаточна для образования комплекса. Уровень цАМФ в клетке является функцией активности аденилатциклазы, синтез которой подавляется в присутствии глюкозы:



3.3. МЕТОДОЛОГИЯ СЕЛЕКЦИИ МУТАНТОВ С ДЕФЕКТАМИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Уровень экспрессии структурных генов в той или иной степени может быть изменен в результате мутаций, осуществляемых по различным участкам оперона. Целенаправленная селекция перспективных мутантов для создания высокопродуктивных организмов — важнейшая задача биотехнологии, ибо лишь дефекты регуляции обмена веществ обеспечивают синтез целевых продуктов метаболизма.

Так, мутации по участкам цистрона, детерминирующим структуру аллостерического центра фермента, могут привести к изменению в конформации белка, которые делают молекулу фермента нечувствительной к концентрации конечного продукта. Это обеспечивает возможность образования в клетке избыточного количества целевого продукта.

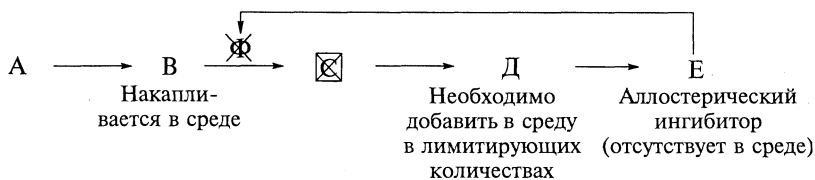
Мутации в гене-регуляторе проводят таким образом, чтобы его продукт — белок-репрессор — утрачивал способность связываться либо с индуктором, либо с оператором. В результате мутаций исче-

зает эффект катаболитной экспрессии, а индуцибельные ферменты становятся конститутивными, т.е. их экспрессия не зависит от присутствия в среде субстрата. Мутантные организмы, у которых изменены нуклеотидные последовательности в зоне гена-оператора, не могут связывать нормальный репрессор и также приобретают способность к конститутивной экспрессии структурных генов.

Мутанты с дефектами регуляторной области оперона называются *регуляторными*, их функция — биосинтез конститутивных ферментов.

Выключение механизма ретроингибирования возможно, если мутации у микроорганизмов вызывают дефект (разрыв) в последовательности биохимических реакций образования конечного продукта. Из-за отсутствия или выключения фермента (Ф), катализирующего промежуточную стадию процесса, в среде накапливается не конечный продукт, а промежуточный целевой метаболит.

Мутанты с ограниченной способностью к образованию конечных продуктов называются *ауксотрофными*. Благодаря отсутствию ингибитора (конечного продукта) использование субстрата и рост микроорганизма продолжают, но лишь при условии добавления в среду в лимитирующих количествах вещества — продукта блокированной реакции:



На практике высокопродуктивные организмы часто обладают двумя видами мутаций и являются ауксотрофно-регуляторными мутантами.

Для отбора мутантов с дефектами экспрессии генов и регуляции обмена веществ используют эффективные методы селекции. Один из них состоит в получении мутантов, устойчивых к структурным аналогам целевого продукта (см. с. 35). В основе другого метода лежит выделение ревертантов из ауксотрофных мутантов. У таких мутантов восстановлена способность к синтезу конечного продукта, однако механизм ретроингибирования у них не функционирует вследствие изменения пространственной структуры ключевого фермента.

Знание механизмов регуляции обмена веществ в клетке необходимо для сознательного управления процессами биосинтеза целевых продуктов и создания организмов-сверхпродуцентов. В последующих разделах эти положения будут проиллюстрированы на примере рассмотрения технологии получения конкретных соединений.

3.4. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

3.4.1. Производство аминокислот

Среди соединений, получаемых биотехнологическими методами, аминокислоты занимают первое место по объему производства и второе место по стоимости, уступая по последнему параметру лишь антибиотикам. Объем мирового производства аминокислот составляет более 500 тыс. т в год, из которых 300 тыс. т приходится на глутамат натрия, 100 тыс. т на лизин и 140 тыс. т на метионин. Однако указанный объем — лишь небольшая доля от требуемого количества аминокислот. По данным ВОЗ, потребность человечества всего лишь в четырех незаменимых аминокислотах составляет, млн т: для лизина — 5, метионина — 4, треонина — 3,7 и триптофана — 2.

Аминокислоты — структурные единицы белков. Природные аминокислоты вовлечены в биосинтез ферментов, ряда гормонов, витаминов, антибиотиков, алкалоидов, токсинов и других азотсодержащих соединений (пурины, пиримидины, гем и пр.). В организме животного практически половина белковых аминокислот не синтезируется. Они называются *незаменимыми аминокислотами* и должны поступать в организм с пищей. Недостаток каждой из этих аминокислот в пищевом или кормовом рационе приводит к нарушению обмена веществ, замедлению роста и развития. Сведения о ежедневной потребности человека в незаменимых аминокислотах представлены в табл. 3.2.

Пищевая ценность белка определяется сравнением доли незаменимых аминокислот в пище с этим же показателем при адекват-

Таблица 3.2

Потребность человека в незаменимых аминокислотах

Аминокислота	Потребность, мг/кг массы тела в сутки	
	младенцы	взрослые
Валин	92	14
Гистидин	33	10
Изолейцин	83	12
Лейцин	135	16
Лизин	99	12
Метионин (и цистеин)	49	10
Фенилаланин (и тирозин)	141	16
Треонин	68	8
Триптофан	21	3

ном питания. Чем ближе обе величины, тем выше качество белка. Белки яйца и молока обладают высокой пищевой ценностью и используются в качестве эталона при оценке других белков. Многие белки растительного происхождения характеризуются дефицитом некоторых незаменимых аминокислот. Так, белки пшеницы и риса обеднены лизином и треонином, а белки кукурузы — лизином и триптофаном.

Введение синтетических незаменимых аминокислот в кормовые концентраты позволяет балансировать корма сельскохозяйственных животных по уровню белка. При добавлении 2—4 дефицитных аминокислот к 1 т комбикорма общий расход кормов уменьшается на 15—20 %, выход продукции увеличивается на 20 %. Добавление к кормам аминокислот способствует переводу животноводства на промышленную основу. Данные о потребности некоторых сельскохозяйственных животных в незаменимых аминокислотах приведены в табл. 3.3.

Таблица 3.3

Потребность ряда сельскохозяйственных животных в незаменимых аминокислотах (% к сырому протеину)

Аминокислота	Свиноматки	Куры-несушки	Коровы
Лизин	5,0	5,0	4,5
Метионин	3,2	3,6	1,7
Триптофан	1,2	1,2	—
Треонин	6,0	4,0	3,4

Помимо применения в качестве пищевых добавок, приправ и усилителей вкуса аминокислоты используют как сырье в химической, парфюмерной и фармацевтической промышленности и при производстве ряда других веществ:

глицин — подсластитель, антиоксидант, бактериостатик;

аспарагиновая кислота — усилитель вкуса, сырье для синтеза аспартама;

глутаминовая кислота — усилитель вкуса, препарат для лечения психических заболеваний;

гистидин — противовоспалительное средство;

метионин — пищевая и кормовая добавки;

цистеин — фармацевтический препарат;

треонин и триптофан — пищевые и кормовые добавки;

фенилаланин — сырье для получения аспартама;

лизин — пищевая и кормовая добавки, сырье для получения искусственных волокон и пленок.

В промышленных масштабах белковые аминокислоты получают:

- 1) гидролизом природного белоксодержащего сырья;
- 2) химическим синтезом;

3) микробиологическим синтезом;

4) биотрансформацией предшественников аминокислот с помощью микроорганизмов или выделенных из них ферментов (химико-микробиологический метод).

При *гидролизе* белоксодержащее сырье (отходы пищевой и молочной промышленности) нагревают с растворами кислот или щелочей при температуре 100—105 °С в течение 20—48 ч. Чаще всего используют 20 %-й раствор соляной кислоты, обеспечивающий глубокий гидролиз белка. Кроме того, для ускорения реакции гидролиза белков используют иммобилизованные протеолитические ферменты и ионообменные смолы. В ходе кислотного гидролиза белков происходят рацемизация и разрушение некоторых составляющих их аминокислот. При кислотном гидролизе полностью разрушается триптофан и достаточно значительны потери цистеина, метионина и тирозина (10—30 %). Лучшим способом уменьшения потерь аминокислот при гидролизе является проведение его в вакууме или в атмосфере инертного газа, а также соблюдение высокого соотношения количества кислоты, взятой для гидролиза, и массы белка (200:1). Рациональное использование сырья при гидролизе, характерное для многих других биотехнологических производств, обеспечивает создание безотходных технологий и способствует оздоровлению окружающей среды. Ранее методом гидролиза получали аминокислоты исключительно для фармацевтических и научных целей. В последнее время сфера использования белковых гидролизатов существенно расширилась. Их применяют в медицине, животноводстве, пищевой и микробиологической промышленности.

Существенный недостаток методов *химического синтеза* аминокислот состоит в получении целевых препаратов в виде рацемической смеси D- и L-стереоизомерных форм. Подавляющее большинство природных аминокислот относится к L-ряду. D- α -аминокислоты обнаружены лишь в составе гликопротеинов клеточных стенок бактерий, антибиотиков и некоторых токсинов. Проницаемость L-аминокислот в клетке в 500 раз превышает таковую ее антипода. Стереоспецифичны также транспорт и метаболизм аминокислот. Исключением в этом отношении является лишь метионин, метаболизм которого нестереоизбирателен, благодаря чему данная аминокислота получается преимущественно путем химического синтеза. Разделение рацематов других аминокислот — дорогая и чрезвычайно трудоемкая процедура.

Наиболее перспективен и экономически выгоден *микробиологический синтез* аминокислот. Более 60 % всех производимых в настоящее время промышленностью высокоочищенных препаратов белковых аминокислот получают именно этим способом, главное преимущество которого в сравнении с методами химического синтеза состоит в возможности получения L-аминокислот на основе возобновляемого сырья.

В последние годы при производстве аминокислот все шире используют биотрансформацию предшественников аминокислот, особенно с помощью иммобилизованных ферментов или клеток микроорганизмов, предварительно получаемых химическим путем.

Промышленное производство аминокислот стало возможным после открытия способности у некоторых микроорганизмов выделять в культуральную среду значительные количества какой-либо одной аминокислоты (С. Киносита, 1955). При этом было замечено, что большинство из нескольких тысяч проанализированных диких штаммов микроорганизмов продуцировали аминокислоты во внешнюю среду, но в очень незначительных количествах. Не зафиксировано никакой связи между таксономическим положением микроорганизма и способностью к продуцированию той или иной аминокислоты. Так, среди возможных продуцентов глутаминовой кислоты отмечены организмы, из которых 30 % — дрожжи, 30 % — стрептомицеты, 20 % — бактерии и 10 % — микроскопические грибы. И лишь один из обследованных штаммов микроорганизмов — *Corynebacterium glutamicum* был способен к сверхсинтезу глутамата. Этот штамм использовали при организации первого в мире крупномасштабного производства глутаминовой кислоты микробиологическим методом в Токио (1956). В России изыскания в области промышленного синтеза аминокислот были начаты в 50-х годах прошлого столетия по инициативе акад. А. А. Александрова.

Перспективные штаммы продуцентов постоянно улучшают посредством селекции мутантов с измененной генетической программой и регуляторными свойствами. Распространенные объекты селекции продуцентов — микроорганизмы, относящиеся к родам *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* (табл. 3.4).

Таблица 3.4

Микроорганизмы — продуценты аминокислот
(по Н. Б. Градовой и О. А. Решетник, 1987)

Аминокислота	Микроорганизмы
Аргинин	<i>E. coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Brevibacterium flavum</i> , <i>Serratia marcescens</i>
Гистидин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>S. marcescens</i> , виды <i>Streptomyces</i>
Изолейцин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. marcescens</i>
Лейцин	<i>Brevibacterium lactofermentum</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>C. glutamicum</i>
Лизин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i>
Фенилаланин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i>
Пролин	<i>B. flavum</i>
Серин	<i>C. glutamicum</i>

Окончание табл. 3.4

Аминокислота	Микроорганизмы
Треонин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>Arthrobacter paraffinens</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. marcescens</i>
Триптофан	<i>Micrococcus</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>B. subtilis</i>
Тирозин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i>
Валин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i>

Разработка технологической схемы получения отдельной аминокислоты полностью базируется на знании путей и механизмов регуляции биосинтеза конкретной аминокислоты. Необходимого дисбаланса метаболизма, обеспечивающего сверхсинтез целевого продукта, добиваются путем строго контролируемых изменений состава и условий среды.

Микробиологические методы производства аминокислот

Производство лизина. По содержанию лизина наименее сбалансированы белки злаковых культур, у которых его дефицит составляет от 20 до 50 %. На территории России недостаток лизина в кормах не может быть восполнен за счет сои, поэтому в нашей стране производство этой аминокислоты было организовано первым. Для удовлетворения потребностей животноводства в лизине крупнотоннажное производство налажено в Испании, Франции, Японии и США.

В клетках микроорганизмов лизин синтезируется из аспарагиновой кислоты и служит конечным продуктом разветвленного метаболического пути биосинтеза, общего для трех аминокислот — лизина, метионина и треонина (рис. 3.3).

Таким образом, в процессе новообразования аминокислот из общего предшественника одновременно с лизином возникают две другие аминокислоты — метионин и треонин. В этом случае эффекта накопления в среде всего одной целевой аминокислоты добиваются путем блокирования процессов, ведущих к синтезу побочных аминокислот, возникающих в связи с разветвлением метаболического пути.

Образование лизина в клетке бактерии находится под строгим метаболическим контролем. У типичных продуцентов L-лизина — *Brevibacterium flavum* и *Corynebacterium glutamicum* — фермент аспараткиназа, открывающий метаболический путь, является аллостерическим белком, чувствительным к ингибированию по принципу обратной связи при совместном и согласованном действии побочных продуктов L-треонина и L-лизина. При накоплении треонина и лизина в избыточной концентрации ингибируется аспараткиназа и их синтез останавливается, при пониженной концентрации любой из двух аминокислот процесс активизируется.

Чтобы добиться образования лизина в больших количествах, получают мутанты двух типов. У мутантов первого типа не синтези-



Рис. 3.3. Схема биосинтеза лизина, метионина и треонина в клетках *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum*:
 --- — ингибирование по принципу обратной связи

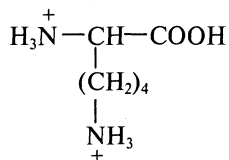
руется или не функционирует гомосериндегидрогеназа, в результате чего блокируется синтез метионина и треонина. Такие мутанты являются ауксотрофами по гомосерину или треонину (метионину); внутриклеточная концентрация треонина у них существенно снижена, что снимает блокаду с аспартаткиназы. Поэтому при выращивании мутантных штаммов в среде, где присутствуют лимитирующие концентрации метионина и треонина, они способны образовывать избыточные количества лизина. Мутанты второго типа дефектны по структурному гену, детерминирующему конформацию аспартаткиназы. В итоге фермент теряет чувствительность к высоким концентрациям аллостерического ингибитора — лизина.

Важный фактор, обеспечивающий в культуральной среде высокие концентрации аминокислоты, синтезированной внутри клетки, — проницаемость клеточных мембран. Проницаемость клеточной мембраны увеличивают либо с помощью мутаций, либо путем изменения состава питательной среды. В последнем случае в культуральной среде создают дефицит биотина (1—5 мкл/л), добавляют пенициллин (2—4 мкг/л), детергенты (твин-40 и твин-60) или производные высших жирных кислот (пальмитаты, стеараты). Биотин контролирует содержание в клеточной мембране фосфолипидов, а пенициллин нарушает биосинтез клеточных стенок бактерий, что повышает выделение аминокислот в среду.

Для культивирования штаммов микроорганизмов при производстве аминокислот как источники углерода наиболее доступны углеводы — глюкоза, сахароза и реже фруктоза и мальтоза. Для снижения стоимости питательной среды в качестве источников

углерода используют вторичное сырье: свекловичную мелассу, молочную сыворотку, гидролизаты крахмала, сульфитные щелока. Технология этого процесса совершенствуется в направлении разработки дешевых синтетических питательных сред на основе уксусной кислоты (до 1,5 %), пропионовой кислоты, метанола, этанола (до 1 %) и *n*-парафинов. В качестве источников азота применяют мочевины и соли аммония (сульфаты и фосфаты). Для успешного развития микроорганизмы нуждаются в стимуляторах роста, в качестве которых выступают экстракты кукурузы, дрожжей и солодовых ростков, гидролизаты отрубей и дрожжей, витамины группы В. Кроме того, в питательную среду добавляют необходимые для жизнедеятельности макро- и микроэлементы (Р, Са, Mg, Mn, Fe и др.). На процесс биосинтеза аминокислот существенное влияние оказывает снабжение воздухом, при этом степень аэрации индивидуальна для производства каждой конкретной аминокислоты. Стерильный воздух подается специальными турбинными мешалками (рис. 3.4). Опыты показали, что лизин появляется в культуральной среде начиная с середины экспоненциальной фазы роста культуры клеток микроорганизма и достигает максимума к ее концу. Поэтому на первой стадии технологического процесса формируют биомассу продуцента, которую выращивают в специальных посевных аппаратах в течение суток (рН 7,0—7,2; температура 28—30 °С), а затем подают в производственный ферментер, заполненный питательной средой. Лизин начинает поступать в культуральную жидкость через 25—30 ч после начала ферментации. По завершении процесса ферментации (через 55—72 ч) жидкую фазу отделяют от культуры клеток микроорганизма фильтрованием и используют для выделения из нее лизина.

Высокоочищенные препараты лизина получают после фракционирования фильтрата культуральной жидкости методом ионообменной хроматографии на катионите. С этой целью лизин переводят в форму катиона:



Для данного процесса фильтрат обрабатывают соляной кислотой до рН 1,6—2,0 (рН < рК₁). Обладая двумя положительно заряженными ионогенными группировками, лизин прочно сорбируется на смоле и элюируется с нее в виде индивидуального соединения 0,5—5 %-м раствором гидроксида аммония после выхода всех других катионов. Элюат концентрируют в вакууме при температуре 60 °С, переводят в форму монохлоргидрата, после чего высушивают и дополнительно чистят с помощью перекристаллизации. В ре-

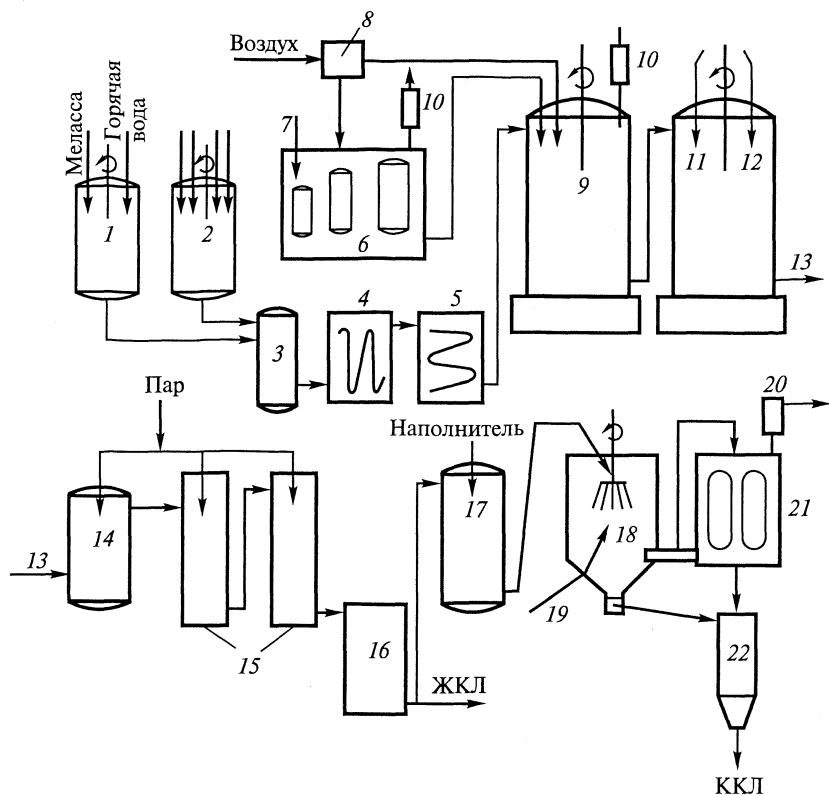


Рис. 3.4. Технологическая схема получения кормовых препаратов лизина (по В.С. Шевелухе и др., 1998):

1 — подача свекловичной мелассы; 2 — водная суспензия кукурузного экстракта и питательных солей; 3 — нагревательная колонка; 4, 5 — теплообменники; 6 — посевные аппараты; 7 — подача посевного материала; 8 — система фильтров для очистки и стерилизации воздуха; 9 — ферментер; 10 — фильтры для очистки отходящих газов; 11 — получение монохлоридгидрата лизина; 12 — подача соляной кислоты; 13, 14 — выход и подогрев монохлоридгидрата лизина; 15 — выпаривательная установка; 16 — сборник ЖКЛ; 17 — смешивание ЖКЛ с наполнителем; 18 — распылитель; 19 — подача горячего воздуха; 20 — очиститель воздуха; 21 — отделение сухого препарата лизина от воздуха; 22 — приемник ККЛ

зультате получают препараты кристаллического лизина 97—98 %-й чистоты, которые используют для повышения питательной ценности пищевых продуктов и в медицинской промышленности.

Кроме высокоочищенных препаратов лизина получают иные виды его товарной формы: жидкий концентрат лизина (ЖКЛ), сухой кормовой концентрат лизина (ККЛ) и высококонцентрированные кормовые препараты, характеризующиеся относительно меньшей степенью очистки в сравнении с первым препаратом.

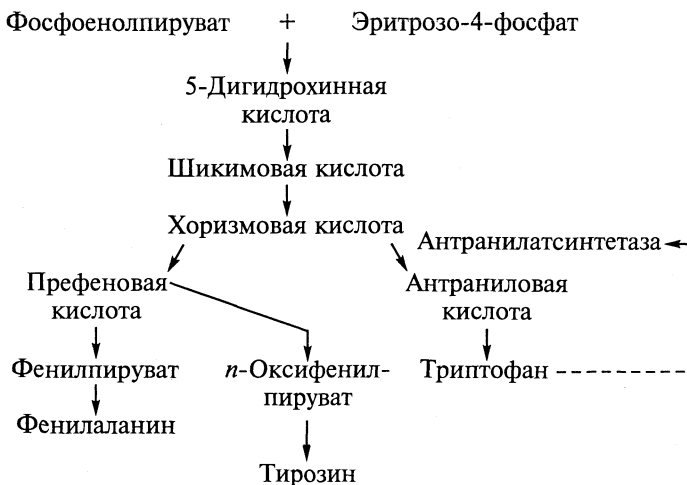
Второй по значимости незаменимой аминокислотой для питания человека и животных является *метионин*, который получают преимущественно путем химического синтеза, что экономически более выгодно в сравнении с микробиологическим способом.

Производство триптофана. Триптофан достаточно часто является лимитирующим фактором питания, так как его содержание в традиционных продуктах (рыба, молоко, кормовые дрожжи) в 3 раза ниже, чем в стандартном белке.

Подобно лизину триптофан образуется в ходе разветвленного метаболического пути, поэтому для его производства используют ауксотрофных мутантов, у которых блокированы реакции, ведущие к синтезу фенилаланина и тирозина. Однако при выращивании мутантных штаммов в среде с минимальной концентрацией этих аминокислот, не вызывающей регуляторных эффектов, избыточное накопление триптофана в среде не наблюдается, что объясняется особенностью процессов регуляции биосинтеза триптофана у микроорганизмов.

Наряду с другими ароматическими аминокислотами у микроорганизмов (подобно большинству организмов) триптофан образуется из метаболитов углеводного обмена — эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата.

Процесс новообразования ароматических аминокислот идет через шикимовую и хоризмовую кислоты. Метаболическим предшественником триптофана служит анраниловая кислота, которая возникает из хоризмовой кислоты под действием анранилатсинтетазы. Триптофан оказывает ингибирующее действие на анранилатсинтетазу, поэтому для обхода метаболического контроля синтез фермента индуцируют ступенчатым введением предшественника — анраниловой кислоты (0,1 — 0,3 %):



В связи с этой особенностью промышленное производство триптофана организовано преимущественно по двухступенчатой схеме. На первом этапе химическим способом синтезируют анраниловую кислоту, которую с помощью энзиматической системы мутантных штаммов дрожжей *Candida utilis* переводят в триптофан.

Биомассу дрожжей выращивают при температуре 30 °С в среде, содержащей свекловичную мелассу, мочевины и минеральные компоненты. Через сутки в ферментер вводят 5 %-й спиртовой раствор анраниловой кислоты и 50 %-й раствор мочевины, а через 3—4 ч после введения предшественника дополнительно добавляют источник углерода (25 %-й раствор мелассы). Анраниловую кислоту и мочевины подают через каждые 6 ч, а мелассу — через каждые 12 ч. Процесс двухступенчатой ферментации завершается через 144 ч и обеспечивает содержание триптофана в культуральной среде до 6 г/л.

Кроме триптофана микробиологическим способом с использованием предшественников получают гистидин, изолейцин, метионин, серин и треонин.

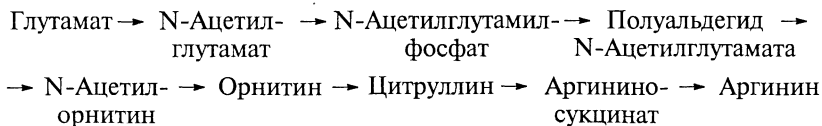
Менее распространены одноступенчатые технологии получения триптофана на основе ауксотрофных мутантов бактерии *Bacillus subtilis*, осуществляемые по схеме, близкой к способу получения лизина. Длительность одноступенчатого процесса 48 ч, а концентрация триптофана в культуральной среде составляет 10 г/л.

После сушки культуральной жидкости получают кормовой концентрат триптофана (ККТ), который включает белки, свободный триптофан, витамины В₁, В₂ и РР. Высокоочищенные кристаллические препараты триптофана образуются после дополнительной очистки культуральной жидкости методом ионообменной хроматографии на колонке, заполненной катионитом (сорбция при рН 1,0; элюция 5 %-м раствором гидроксида аммония в смеси с пропанолом-2). Элюаты кристаллизуют; кристаллы отмывают и высушивают. Кристаллический препарат содержит до 99 % триптофана.

Характерная особенность процессов получения аминокислот микробиологическим способом, равно как и других биотехнологических производств, — полное использование побочных продуктов, что превращает большинство из них в безотходные и экологически чистые технологии. Например, осадок микроорганизмов-продуцентов и промывные воды, содержащие ценные ингредиенты, такие, как белки, остатки аминокислот, витаминов, минеральных солей и микроэлементов, высушивают и используют в качестве кормовых препаратов.

Получение аргинина, глутаминовой кислоты, глутамина, треонина и пролина микробиологическим способом. Для получения аминокислот — конечных продуктов неразветвленных метаболических путей, например *аргинина*, ауксотрофные мутанты не используют. В этом случае применяют мутанты с дефектами регуляции

биосинтеза аминокислоты, т.е. регуляторные мутанты. Помимо аргинина регуляторные мутанты используют для получения серина и цитруллина:



Успешное производство с участием микроорганизмов таких аминокислот, как глутаминовая аминокислота, глутамин и пролин, обеспечивает стимуляция образования аминокислот в ответ на изменение условий внешней среды. Метаболическим предшественником при биосинтезе глутаминовой кислоты служит α -кетоглутаровая кислота, возникающая в цикле Кребса из изолимонной кислоты под действием изоцитратдегидрогеназы. При выращивании бактерий родов *Corynebacterium* или *Brevibacterium* на углеводном сырье (гидролизат крахмала, тростниковая или свекловичная меласса), на этаноле или ацетате и при дефиците биотина в культуральной среде накапливается глутаминовая кислота с концентрацией 30 г/л. Важнейшее условие для образования этой аминокислоты — подавление активности глутаматдегидрогеназы. При высоком содержании в среде биотина и солей аммония обеспечиваются условия для образования пролина, а при значительных концентрациях ионов аммония и ионов цинка в слабокислой среде — для синтеза глутамина.

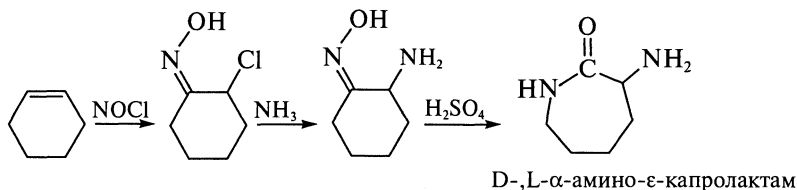
Генетическая инженерия — важнейший прогрессивный способ изменения генетической программы организма в целях создания высокопродуктивных штаммов промышленных микроорганизмов. Успехи современной генетической инженерии существенно влияют на промышленную биотехнологию. Яркий пример больших возможностей генетической инженерии — создание во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов штамма *E. coli* для получения *треонина*. В результате были изменены не только регуляторные свойства фермента аспараткиназы, но и питательные потребности штамма. Введение в геном бактерии нового гена обеспечило бактерии возможность использования в качестве источника углерода сахарозу, основного дисахарида традиционного промышленного сырья — свекловичной мелассы. Перечисленные манипуляции наряду с амплификацией плазмид, содержащих оперон *треонина*, позволили значительно увеличить производительность штамма бактерии и получить за 40 ч ферментации 100 г L-треонина на 1 л культуральной жидкости. Учитывая исключительные способности штамма *E. coli* к сверхсинтезу L-треонина, японская фирма «Адзиномото» приобрела в 1982 г. лицензию на использование российского штамма — продуцента *треонина* для организации собственного производства.

Химико-ферментативные способы получения аминокислот

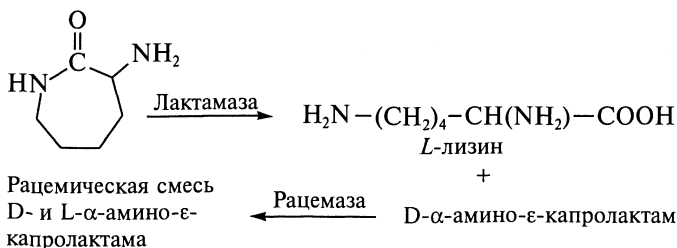
При получении ряда аминокислот химико-ферментативными способами используют ферменты, принадлежащие к разным классам. Эти процессы могут быть как одностадийными (конверсии), так и многостадийными. Источником ферментов для большинства процессов служат ферменты микроорганизмов — как индивидуальные, так и их природные смеси, содержащиеся в интактных (не растущих), высушенных и лизированных клетках, клеточных экстрактах и, наконец, в препаратах иммобилизованных клеток и ферментов. Использование иммобилизованных ферментов в биотехнологии будет рассмотрено в гл. 4.

Применение ферментов в производстве аминокислот обеспечивает стереоспецифичность процессов их синтеза, что выгодно отличает биотехнологические производства от химических. Далее будут рассмотрены примеры, иллюстрирующие эти положения.

Получение L-лизина. Процесс получения лизина основан на стереоспецифическом ферментативном гидролизе (конверсии) D-,L-α-амино-ε-капролактама, который сначала получают химическим путем из циклогексена:



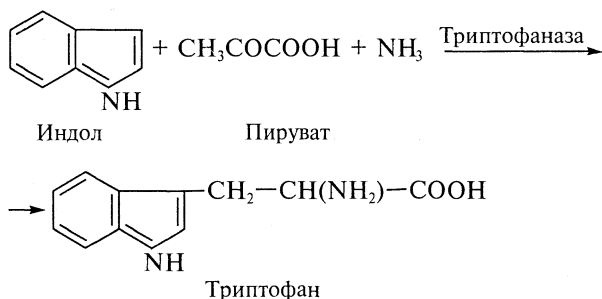
Рацемат используют в качестве субстрата, который под действием фермента L-α-амино-ε-капролактамагидролазы (лактамаза) превращается в L-лизин, а оставшаяся непрореагировавшая его часть (D-форма) переводится при воздействии рацемазы в смесь антиподов:



Лактамаза найдена у некоторых видов дрожжей, в частности у *Candida laurentii*; у них синтез фермента индуцируется добавлением субстрата (рацемической смеси), а активность фермента поддерживается при добавлении в среду ионов Mg^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} . Раце-

маза обнаружена у ряда бактерий, например у *Alcaligenes obae*. Для получения неочищенных ферментов целые клетки микроорганизмов обрабатывают поверхностно-активными веществами, вызывающими изменение проницаемости стенки клеток микроорганизмов-продуцентов. Разработаны иммобилизованные формы обоих ферментов. При производстве лизина в водный раствор D-, L- α -амино- ϵ -капролактама одновременно вводят источники лактамазы и рацемазы, содержащиеся в дрожжевых и бактериальных клетках. Процесс осуществляется при температуре 30—50 °С, pH 8,0—8,5 и оптимальном режиме аэрации. На выходе из реактора образуется преимущественно один продукт — лизин, который выделяют из смеси, очищают и сушат. Описанная технология получения лизина, распространенная в США и Японии, по завершении процесса обеспечивает содержание аминокислоты в реакционной среде свыше 150 г/л. Кроме того, созданы мутанты, у которых целевой продукт — лизин далее не вовлекается в обмен веществ, что увеличивает выход искомого продукта.

Получение триптофана. Химико-ферментативный способ получения триптофана состоит в прямой конденсации индола, аммиака и пировиноградной кислоты:



Реакцию катализирует пиридоксальзависимая триптофан-индоллиаза (триптофаназа). Фермент широко распространен в природе. Он найден у бактерий *E. coli*, *Bacillus albei*, *Proteus rettgeri* и характеризуется широкой субстратной специфичностью. Кроме L-триптофана его субстратами служат L-цистеин, S-метил-цистеин, β -хлор-L-аланин, L-серин. Триптофаназа ускоряет реакции α , β -элиминирования и β -замещения, но ее действие может быть обращено и в сторону реакции конденсации. Добавление триптофана индуцирует образование фермента, а добавление индола ингибирует его синтез у бактерий, поэтому процесс получения триптофана ведут при избытке аммиака и пирувата.

Выход аминокислоты при реализации химико-энзиматического способа получения триптофана составляет 63 г/л.

Набор энзимов, использующихся для получения аминокислот, достаточно разнообразен. К их числу относятся гидролазы, дегид-

рогеназы, лиазы, лигазы, изомеразы. Столь же разнообразен и перечень целевых аминокислот, производимых химико-ферментативным способом (L-аспарагиновая кислота, L-аланин, L-глютамин, L-лизин, L-тирозин, L-триптофан, L-цистеин, L-фенилаланин, L-метионин). Химико-энзиматический способ в сравнении с микробиологическим более специфичен, не требует процедуры очистки аминокислот от побочных продуктов и сточных потоков. Однако по стоимости сырья и ферментативных препаратов он еще уступает микробиологическому способу.

3.4.2. Производство витаминов

Витамины представляют собой группу незаменимых органических соединений различной химической природы, необходимых любому организму в ничтожных концентрациях и выполняющих в нем каталитические и регуляторные функции. Недостаток того или иного витамина нарушает обмен веществ и нормальные процессы жизнедеятельности организма, приводя к развитию патологических состояний. Витамины не образуются у гетеротрофов. Способностью к синтезу витаминов обладают лишь автотрофы, в частности растения. Многие микроорганизмы также образуют целый ряд витаминов, поэтому синтез витаминов с помощью микроорганизмов стал основой для разработки технологий промышленного производства этих биологически активных соединений.

Благодаря изучению физиологии и генетики микроорганизмов — продуцентов витаминов и выяснению путей биосинтеза каждого из них создана теоретическая основа для получения микробиологическим способом практически всех известных в настоящее время витаминов. Однако с помощью энзимов целесообразнее производить лишь особо сложные по строению витамины: B_2 , B_{12} , β -каротин (провитамин А) и предшественники витамина D. Остальные витамины либо выделяют из природных источников, либо синтезируют химическим путем. Витамины используются в качестве лечебных препаратов, для создания сбалансированных пищевых и кормовых рационов и для интенсификации биотехнологических процессов.

Получение витамина B_2 (рибофлавин). Вплоть до 30-х годов прошлого столетия рибофлавин выделяли из природного сырья. В наибольшей концентрации он присутствует в моркови и печени трески. Из 1 т моркови можно изолировать лишь 1 г рибофлавина, а из 1 т печени — 6 г. В 1935 г. обнаружен активный продуцент рибофлавина — гриб *Ermothecium ashbyii*, способный при выращивании на 1 т питательной смеси синтезировать 25 кг витамина B_2 . Сверхсинтеза рибофлавина добиваются действием на дикие штаммы мутагенов, нарушающих механизм ретроингибирования синтеза витамина B_2 , флавиновыми нуклеотидами, а также изме-

нением состава культуральной среды. Отбор мутантов ведут по устойчивости к аналогу витамина В₂ — розеофлавинолу. Вопросы биосинтеза рибофлавина и его регуляции детально изучены в работах Г. М. Шавловского.

В состав среды для роста продуцентов витамина В₂ входят достаточно сложные органические вещества — соевая мука, кукурузный экстракт, сахароза, карбонат кальция, хлорид натрия, гидрофосфат калия, витамины, технический жир. Грибы весьма чувствительны к изменению состава среды и подвержены инфицированию. Перед подачей в ферментер среду подвергают стерилизации, добавляя к ней антибиотики и антисептики. Подготавливают жидкую питательную среду и посевной материал культуры дрожжей в разных емкостях — ферментере и посевном аппарате.

В качестве посевного материала используют споры *E. ashbyii*, выращенные на пшенице (7—8 дней при 29—30 °С). После стерилизации жидкий посевной материал подается в ферментер. Процесс ферментации грибов для получения кормового рибофлавина длится 3 суток при температуре 28—30 °С. Концентрация рибофлавина в культуральной жидкости может достигать 1,4 мг/мл. По завершении процесса ферментации культуральную жидкость концентрируют в вакууме, высушивают на распылительной сушилке (влажность 5—10 %) и смешивают с наполнителями.

В 1983 г. во ВНИИ генетики микроорганизмов сконструирован рекомбинантный штамм продуцента *Bacillus subtilis*, характеризующийся увеличенной дозой оперонов, которые контролируют синтез рибофлавина. Клонированием генов рибофлавинового оперона в одной из созданных плазмид был получен производственный штамм-продуцент витамина В₂, способный синтезировать втрое больше по сравнению с *E. ashbyii* количество рибофлавина всего за 40 ч ферментации.

Получение витамина В₁₂ (Со α [α -(5,6-диметилбензимидазол)]-Со β — цианокобамид). Витамин В₁₂ открыт в 1948 г. одновременно в США и Англии. В 1972 г. в Гарвардском университете был осуществлен химический синтез корриноидного предшественника витамина В₁₂. Химический синтез корнестерона — структурного элемента корринового кольца витамина, включающий 37 стадий, в крупных масштабах не воспроизведен из-за сложности процесса.

Витамин В₁₂ регулирует углеводный и липидный обмен, участвует в метаболизме незаменимых аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, стимулирует образование предшественников гемоглобина в костном мозге; применяется в медицине для лечения злокачественной анемии, лучевой болезни, заболеваний печени, полиневрита и т. п. Добавление витамина к кормам способствует более полноценному усвоению растительных белков и повышает продуктивность сельскохозяйственных животных на 10—15 %.

Первоначально витамин В₁₂ получали исключительно из природного сырья, но из 1 т печени можно было выделить всего лишь 15 мг витамина. Единственный способ его получения в настоящее время — микробиологический синтез. Обнаружение витамина в качестве побочного продукта при производстве антибиотиков в значительной степени стимулировало поиск организмов-продуцентов витамина и изучение путей его образования. Однако механизмы регуляции биосинтеза витамина В₁₂ до настоящего времени полностью не расшифрованы. Известно, что при высоких концентрациях витамин полностью репрессирует синтез ключевых ферментов своего новообразования.

Продуцентами витамина В₁₂ при его промышленном получении служат актиномицеты, метанообразующие и фотосинтезирующие бактерии, одноклеточные водоросли. В 70-х годах XX в. интерес ученых привлекли пропионовокислые бактерии, известные еще с 1906 г. и широко использующиеся для приготовления препаратов животноводства. Выделено 14 видов пропионовокислых бактерий, продуцирующих витамин В₁₂; их физиолого-биохимическая характеристика дана Л. И. Воробьевой. Для получения высокоочищенных препаратов витамина В₁₂ пропионовокислые бактерии культивируют периодическим способом на средах, содержащих глюкозу, казеиновый гидролизат, витамины, неорганические соли, хлорид кобальта. Добавление в среду предшественника 5,6-диметилбензимидазола (способствует переводу неактивных форм в природный продукт) по окончании первой ростовой фазы (5—6 суток) стимулирует быстрый (18—24 ч) синтез витамина с выходом последнего 5,6—8,7 мг/л. Путем селекции, оптимизации состава среды и условий культивирования выход витамина В₁₂ в промышленных условиях был значительно повышен. Так, выход витамина на среде с кукурузным экстрактом и глюкозой при поддержании стабильного значения рН близ нейтральных зон достигает 21—23 мг/л. Мутант пропионовокислых бактерий продуцирует до 30 мг/л витамина. Бактерии плохо переносят перемешивание. Применение уплотняющих агентов (агар, крахмал), предотвращающих оседание бактерий, а также использование высокоанаэробных условий и автоматического поддержания рН позволяет получить наиболее высокий выход витамина — 58 мг/л.

Из культуральной жидкости витамин В₁₂ выделяют экстракцией органическими растворителями, ионообменной хроматографией с последующим осаждением из фракций в виде труднорастворимых соединений. В процессе получения витамина В₁₂ с помощью пропионовокислых бактерий применяют дорогостоящую антикоррозийную аппаратуру, сложные и дорогие питательные среды. Усовершенствование технологического процесса идет в направлении удешевления компонентов питательных сред (замена глюкозы сульфитными шелоками) и перехода с периодического куль-

тивирования на непрерывный процесс. В последние годы исследуется возможность получения витамина с использованием иммобилизованных клеток пропионовокислых бактерий.

Для нужд животноводства сотрудниками Института биохимии им. А. Н. Баха РАН разработана более простая и дешевая технология получения витамина В₁₂, в создание которой большой вклад внесли работы В. Н. Букина, В. Я. Быховского, И. С. Логоткина, Е. С. Панцхавы и др.

По указанной технологии ферментацию осуществляет сложный биоценоз термофильных микроорганизмов, производящих метановое брожение. Комплекс микроорганизмов включает целлюлозоразлагающие, углеводсбраживающие, аммонифицирующие, сульфитвосстанавливающие и метанообразующие бактерии. На первой фазе процесса (10—12 дней) развиваются термофильные углеводсбраживающие и аммонифицирующие бактерии. При этом в слабокислой среде (рН 5,0—7,0) органические соединения превращаются в жирные кислоты и аммиак. На второй фазе, когда среду подщелачивают до рН 8,5, в биоценозе преобладают метанообразующие бактерии, которые сбраживают возникающие на первой фазе продукты до метана и диоксида углерода. Именно метанообразующие бактерии — главные продуценты витамина. Обогащение сред очищенными культурами метанообразующих бактерий увеличивает выход активных форм витамина В₁₂.

Источником углерода в питательной среде служит ацетонобутиловая и спиртовая барда, которую представляют заводы, перерабатывающие зерно и мелассу. Для оптимизации питательной среды в нее добавляют соединения кобальта (хлорид кобальта — 4 г/м³), который входит в состав молекулы витамина В₁₂, и субстраты для роста метанообразующих бактерий — низшие жирные кислоты и низшие спирты, что позволяет значительно повысить выход витамина.

Подготовленное сырье освобождают в декантаторе от взвешенных частиц и непрерывно подают в нижнюю часть ферментера (метантенка) емкостью 4200 м³. Одновременно в ферментер поступает посевной материал культуры микроорганизмов, предварительно выращенный в специальных аппаратах. Для выращивания продуцента требуются облигатно анаэробные условия, ибо даже следы кислорода подавляют рост бактерий. При создании анаэробных условий в среду подают диоксид углерода или газы, выделяющиеся в процессе ферментации. Ежедневно из метантенка отбирают 25—30 % объема среды. Продукт ферментации стабилизируют, подкисляя соляной или фосфорной кислотой до рН 6,3—6,5 и добавляя 0,2—0,25 % сульфита натрия, что предотвращает разрушение витамина при тепловой обработке, особенно существенное в щелочной среде. В дальнейшем отобранная часть культуральной жидкости дегазируется, упаривается в вакууме; кон-

центрат высушивается в распылительной сушилке до влажности 10—15 % и смешивается с наполнителями. Готовый кормовой препарат, имеющий коммерческое название КМВ-12 (концентрат-микробный витамин), содержит, кроме витамина В₁₂ (2,5 %), витамины В₁, В₂, В₆, пантотеновую кислоту, фолиевую кислоту, биотин, незаменимые аминокислоты.

Процесс промышленного получения витамина В₁₂ — пример безотходной и экологически чистой технологии. Сырьем для ее реализации служат массовые отходы, а конечными продуктами — биогаз (65 % метана, 30 % диоксида углерода), использующийся как топливо, и биомасса метановых бактерий — источник биологически активных соединений, активирующих, например, рост молочнокислых бактерий.

Витамины — объекты международной торговли. Так, витамин В₁₂ российского производства экспортируют в Польшу, Германию, Чехию, Словакию и другие страны.

Получение β-каротина и витамина D₂. Важное место в обмене веществ у животных занимает β-каротин, который в печени превращается в витамин А (ретинол). В организме человека и животных каротины не образуются. Основные источники β-каротина для животных — растительные корма; человек получает β-каротин также из продуктов животного происхождения. β-Каротин можно выделить из ряда растительных объектов — моркови, тыквы, облепихи, люцерны. В начале 60-х годов XX в. разработана схема микробиологического синтеза β-каротина, которая стала основой промышленного способа его получения. Установлено, что многие микроорганизмы — фототрофные бактерии, актиномицеты, плесневые грибы, дрожжи — синтезируют каротин. Характерно, что содержание β-каротина у микроорганизмов во много раз превышает содержание этого провитамина у растений. Так, в 1 г моркови присутствует всего 60 мкг β-каротина, в то время как в 1 г биомассы гриба *Blaneslea trispora* — 3—8 тыс. мкг. Разработаны опытные установки как периодического, так и непрерывного действия для синтеза β-каротина, основной недостаток которых — высокая стоимость сырья и большая длительность процесса.

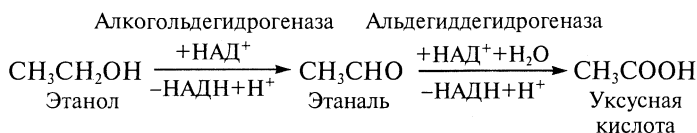
Микробиологическим способом получают и витамин D₂ (эргокальциферол), при производстве которого освоено дешевое сырье (углеводороды) и установлен стимулирующий эффект ультрафиолетовых лучей на синтез эргостерина культурой дрожжей.

В ближайшие годы ожидается расширение набора витаминов, получаемых методами биотехнологии. Для решения проблемы промышленного получения витаминов требуется внедрение непищевых малодефицитного сырья, разработка специальных режимов культивирования сверхпродуцентов, перевод процессов на непрерывные технологии, использование перспективных химико-ферментативных способов синтеза витаминов.

3.4.3. Производство органических кислот

В настоящее время биотехнологическими способами в промышленных масштабах синтезируют ряд органических кислот. Из них лимонную, глюконовую, кетоглюконовую и итаконовую кислоты получают лишь микробиологическим способом, молочную, салициловую и уксусную — как химическим, так и микробиологическим способами, а яблочную — химическим и энзиматическим путем.

Получение уксусной кислоты. Уксусная кислота имеет наиболее важное значение среди всех органических кислот. Ее используют при выработке многих химических веществ, включая каучук, пластмассы, волокна, инсектициды. Микробиологический способ получения уксусной кислоты состоит в конверсии этанола в уксусную кислоту при участии бактерий штаммов *Acetobacter* и *Gluconobacter*:



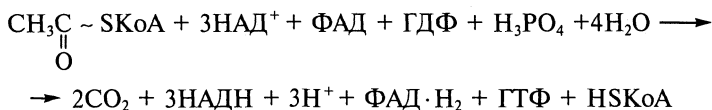
Процесс идет в анаэробных условиях в режиме непрерывного культивирования продуцента. Для роста бактерии *Acetobacter aceti* используют питательные среды, содержащие 6—12 % этилового спирта, 1 % бактериального гидролизата, 0,05 % дигидрофосфата калия, 0,1 % гидрофосфата аммония и 0,05 % сульфата магния. Максимальная удельная активность непрерывной культуры *A. aceti* (количество микрограммов субстрата, подвергшегося окислению 1мкг биомассы за 1 мин) достигается к 20-м суткам культивирования при концентрации спирта 7 % и составляет 3,0 ед./мг.

Получение лимонной кислоты. Лимонную кислоту широко используют в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. Ею заменяют фосфаты в составе детергентов, так как она полностью метаболизируется живыми организмами. Лимонная кислота образует хелаты с металлами, поэтому ее применяют для их очистки. Объем мирового производства цитрата составляет 400 тыс. т/год. Самый крупный производитель лимонной кислоты — США. Производство лимонной кислоты принадлежит к числу старейших промышленных микробиологических процессов: оно было организовано в 1893 г. С этого момента параллельно развитию фундаментальной микробиологии велись изыскания оптимальных продуцентов и технологических вариантов процесса ферментации.

Для промышленного производства лимонной кислоты используют главным образом культуру гриба *Aspergillus niger*, а также *A. wentii*.

Метаболическим источником лимонной кислоты в организме служит цикл трикарбоновых кислот — составная часть цикла Креб-

са. Суммарное уравнение химических процессов этого цикла следующее:



Реакция образования лимонной кислоты, катализируемая цитратсинтазой, открывает цикл Кребса, в котором цитрат постепенно окисляется до щавелево-уксусной кислоты (ЩУК). ЩУК снова конденсируется с ацетил-КоА, так что вновь образуется лимонная кислота (рис. 3.5). Цитратсинтаза определяет скорость реакций, составляющих цикл Кребса. Активность фермента зависит от концентрации ЩУК, содержание которой может поддерживаться за счет функционирования конститутивной пируваткарбоксилазы, обеспечивающей переключение в аэробных условиях процессов гликолиза и глиоксилевого цикла. Активность цитрат-

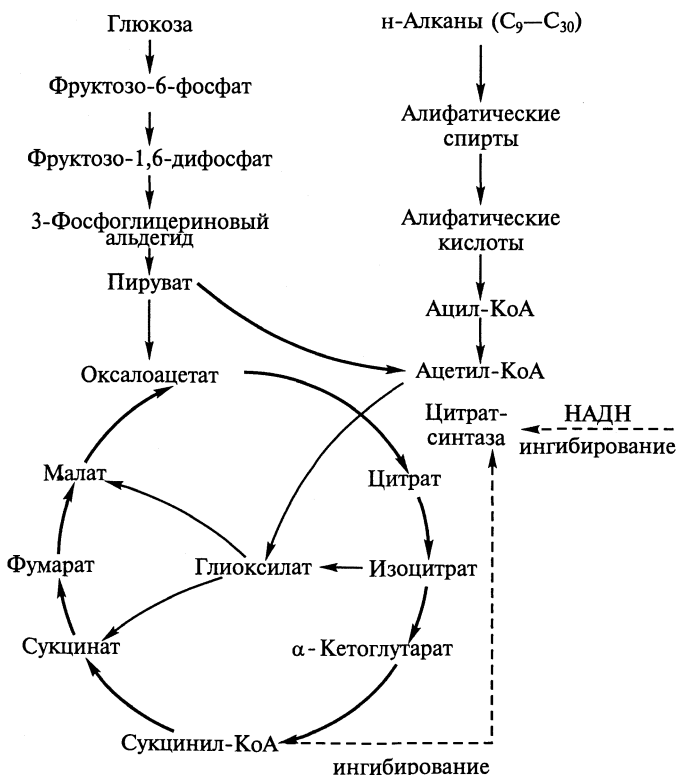


Рис. 3.5. Схема биосинтеза лимонной кислоты

синтазы тормозится НАДН и сукцинил-КоА. Скорость оборота цикла Кребса определяется поддержанием необходимого уровня окисленных форм коферментов дегидрогеназ (НАД⁺ и ФАД; см. уравнение реакции), поэтому высокий выход цитрата получается лишь при условии хорошей аэрации. Накопление в культуральной среде существенных количеств цитрата — промежуточного соединения цикла Кребса — невыгодно для организма и является следствием дисбаланса метаболизма или нарушения его генетической природы. Рост культуры грибов обычно регулируют путем изменения содержания фосфата, ионов марганца, железа и цинка в среде. Дефицит фосфата ведет к сверхпродукции цитрата. Роль ионов металлов не до конца установлена. Считают, что дефицит ионов металлов влияет на свойства клеточных мембран и морфологию гиф.

Процесс ферментации, ведущий к образованию лимонной кислоты, проводят при низких значениях pH (3—4), что облегчает поддержание стерильных условий ферментации и уменьшает возможность образования побочных продуктов. В более щелочной среде происходит накопление щавелевой и глюконовой кислот. Предполагают, что в кислой среде стимулируется гликолиз, что обеспечивает направление потока углерода в цикл Кребса.

Питательные среды для культивирования продуцентов лимонной кислоты в качестве источника углерода содержат дешевое углеводное сырье: мелассу, крахмал и глюкозный сироп. Гриб *A. niger* чаще всего выращивают на мелассе. Гриб *Trichoderma viride* синтезирует значительные количества цитрата из глюкозы, что позволяет использовать для этого процесса целлюлозу. Предложены штаммы бактерий (*Corynebacterium*, *Arthrobacterium* и *Brevibacterium*) и дрожжей рода *Candida*, осуществляющие процесс на основе *n*-парафинов (C₉—C₃₀), которые пока широко не внедрены в промышленность.

Существует несколько технологических вариантов промышленного производства лимонной кислоты. Первоначально был разработан вариант процесса, основывающийся на поверхностной ферментации, позднее — на глубинном культивировании. Последнее ведется в две стадии: на первой стадии идет рост мицелия, а на второй, после выхода культуры в стационарную фазу — интенсивный синтез лимонной кислоты. В конце ферментации массу мицелия отделяют путем фильтрования и промывают. Затем при pH < 3,0 в виде кальциевой соли осаждают щавелевую кислоту, а из маточного раствора выделяют лимонную кислоту в форме средней соли, кристаллизующейся в комплексе с четырьмя молекулами воды. Свободную кислоту выделяют из промытых кристаллов соли после их обработки сульфатом кальция. Высокоочищенные препараты лимонной кислоты получают после дополнительной процедуры очистки методом ионообменной хроматографии. Выход продукта составляет 85 %.

С 20-х годов XX в. налажено промышленное производство D-глюконовой кислоты из глюкозы при участии *A. niger*. При этом за 48 ч ферментации культуры гриба степень превращения субстрата составляет 90 %. Глюконат натрия, в виде которого обычно выделяют глюконовую кислоту, используют для извлечения металлов, борьбы со ржавчиной, как моющее средство и в качестве медицинского препарата. С участием культуры грибов из рода *Aspergillus* путем ферментации глюкозы получают с высоким выходом итаконовую кислоту, используемую для производства пластмасс и красителей.

Новые возможности для интенсификации производственных процессов получения органических кислот открывает применение иммобилизованных ферментов и клеток микроорганизмов.

3.5. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Принципы получения вторичных метаболитов основаны на особенностях их образования клетками микроорганизмов. Биосинтез вторичных метаболитов фазоспецифичен и происходит по завершении стадии роста, в идиофазе, благодаря чему их еще называют идиолитами (см. с. 32). Среди вторичных метаболитов ведущее место по объему производства занимают антибиотики.

3.5.1. Получение антибиотиков

В мире ежегодно производится антибиотиков почти на 20 млрд долларов. К числу антибиотиков относятся важнейшие противомикробные и противоопухолевые препараты. Открытие антибиотиков произвело переворот в лечении инфекционных заболеваний. Ушли в прошлое представления о неизлечимости многих бактериальных инфекций (туберкулез, сепсис, сифилис и др.). Антибиотики применяют в ряде отраслей народного хозяйства (растениеводство, животноводство, ветеринария, пищевая промышленность и др.), где они используются более широко, чем в медицине. Организация крупномасштабного производства антибиотиков сыграла решающую роль в становлении промышленной биотехнологии.

К антибиотикам относятся низкомолекулярные эффекторы изначально природного происхождения, способные подавлять рост живых клеток. Антибиотики, продуцируемые растительными объектами, называют фитонцидами. Вопрос о физиологических функциях антибиотиков, их месте в метаболизме и процессах эволюции окончательно не решен. Антибиотики возникли в борьбе за существование почвенных биоценозов, поэтому многие из них

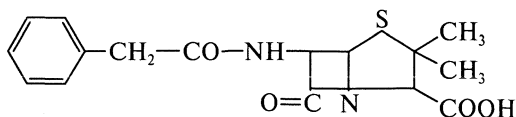
служат средствами нападения и защиты, т. е. представляют собой своеобразное химическое «оружие» клетки. Однако эти функции у антибиотиков не единственны. Известно, что они могут участвовать в процессах детоксикации вредных метаболитов, контролировать некоторые стороны обмена веществ и целые процессы развития, например дифференцировку клеток, служить запасными питательными веществами. Некоторые исследователи рассматривают антибиотики как случайные вещества, обладающие полезными свойствами, другие считают их реликтовыми молекулами, вытесненными в ходе эволюции продуктами рибосомального синтеза, но и до сих пор сохранившими способность вмешиваться в биохимические процессы.

Способность нитчатого гриба зеленой плесени *Penicillium notatum* вызывать гибель микроорганизмов впервые была установлена в 1928 г. английским микробиологом А. Флеммингом. Однако лечебные свойства этой плесени были описаны еще в 1871 г. русским дерматологом А. Г. Полотебновым. Количество открываемых антибиотиков постоянно растет. В 1940 г. было известно всего 6 антибиотиков, а в настоящее время описано более 12 000 аналогичных соединений, из которых в клинике применяют около 200 препаратов. 97 % известных антибиотиков токсичны, поэтому в практике не используются. В химическом отношении они представляют сборную группу органических веществ. В зависимости от химической природы и ряда других свойств известные антибиотики делят на ряд классов:

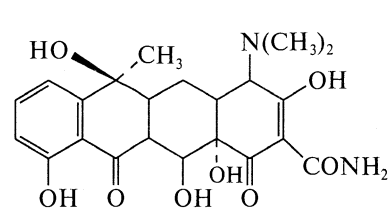
1. β-Лактамные (пенициллины, цефалоспорины) составляют более 50 % рынка антибиотиков.
2. Тетрациклины (тетрацилин, морфоцилин, метацилин).
3. Макролиды (эритромицин, олеандомицин).
4. Аминогликозиды (гентамицин, амикацин).
5. Гликопептиды (ванкомицин, ристомицин).
6. Амфениколы (левомецетин).
7. Линкосамиды (линкомицин).
8. Полиеновые [противогрибковые (нистатин, леворин)].
9. Противоопухолевые (блеомицин) и др.

Большой вклад в установление структуры ряда антибиотиков внесли М. М. Шемякин, Ю. А. Овчинников, В. Т. Иванов, А. С. Хохлов, Г. Б. Локшин, М. Н. Колосов, Ю. А. Берлин, Е. С. Есипов, А. Д. Кузовнов.

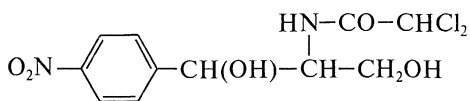
Химические формулы наиболее распространенных антибиотиков следующие:



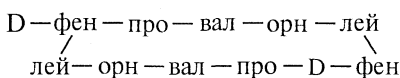
Бензилпенициллин



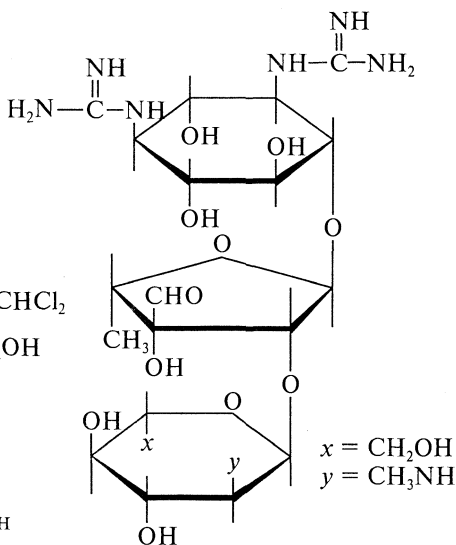
Тетрациклин



Левомецетин



Грамицидин



Стрептомицин

По типу действия антибиотики делят на бактерицидные (лактамы, аминогликозиды), вызывающие гибель микроорганизмов, и бактериостатические (макролиды, тетрациклины, левомецетин), нарушающие способность микроорганизмов делиться. По спектру действия различают антибиотики узкого и широкого действия. К последним относят тетрациклины, макролиды, аминогликозиды, которые особенно полезны в случае неидентифицированных возбудителей болезни, однако при длительном применении они вызывают у пациентов дисбактериоз.

В последние годы достигнуты большие успехи в расшифровке молекулярного механизма действия антибиотиков. Наиболее яркая особенность антибиотиков — исключительная специфичность их действия. По выражению П. Эрлиха, антибиотики — это магические пули. Специфика действия их состоит в избирательном подавлении этими эффекторами одного или нескольких процессов лишь у некоторых микроорганизмов. Таким образом, антибиотики блокируют метаболические мишени в клетках-мишенях. В зависимости от специфики действия антибиотиков на молекулярном уровне различают следующие группы соединений, вызывающие у бактерий:

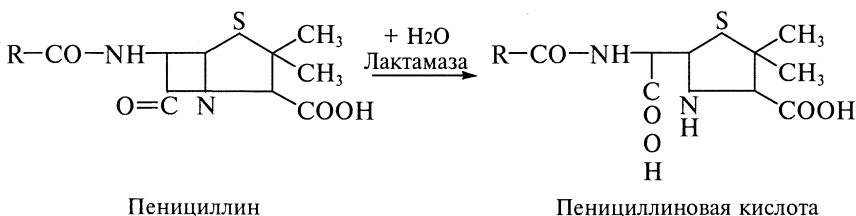
- 1) нарушение биосинтеза пептидогликанов клеточной стенки (пенициллины, ванкомицин, цефалоспорины);
- 2) нарушение отдельных этапов процессов трансляции (амфениколы, аминогликозиды, тетрациклины, макролиды, линкосамиды);
- 3) повреждения цитоплазматической мембраны (грамицидин, полимиксины);

4) нарушение биосинтеза нуклеиновых кислот (рифамицины, актиномицин D, противоопухолевые антибиотики);

5) нарушение энергетического обмена (олигомицин, хлоргексидин).

Антибиотики широко используют в качестве молекулярных инструментов при исследовании фундаментальных проблем биологии, таких, как расшифровка тончайших механизмов биосинтеза белка, нуклеиновых кислот и структуры клеточных стенок бактерий, создание моделей транспорта ионов через биологические мембраны и др.

Изыскание новых антибиотиков обусловлено как потребностями практики, так и накоплением резистентных форм микроорганизмов по отношению ко многим антибиотикам. Устойчивость бактерий к пенициллинам и цефалоспорином создает присутствующий в их клетках фермент лактамаза (пенициллиназа). Фермент гидролизует амидную связь β-лактамного цикла в молекуле антибиотика с образованием пенициллиновой кислоты, которая полностью лишена антимикробной активности:



Специальное изучение объема и потенциала защитных свойств микроорганизмов показало, что их резистентность к антибиотикам имеет глобальный характер и обеспечивается как разнообразием фенотипов резистентности, так и разнообразием и стабильностью систем горизонтального генного транспорта. Поэтому главное направление получения новых антибиотиков состоит не в открытии новых соединений, а в химической трансформации природных молекул для создания полусинтетических антибиотиков, характеризующихся значительно меньшей резистентностью и токсичностью, но более широким спектром действия, большим временем жизни, химической и биологической устойчивостью. Важный подход на пути получения устойчивых аналогов антибиотиков — использование природных ингибиторов β-лактамаз — клавулановой и оливановой кислот.

Методы получения антибиотиков путем химического синтеза чрезвычайно сложны и не могут конкурировать с их биосинтезом методами биотехнологии. Существует несколько способов получения как природных, так и полусинтетических антибиотиков. Направленный биосинтез антибиотиков осуществляется путем прямой ферментации микроорганизма — продуцента с подходящим

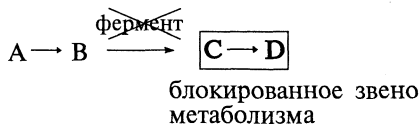
предшественником, что индуцирует синтез ферментов вторичного метаболизма в идиофазе. Точный механизм индуцирования первичными метаболитами генов, кодирующих синтез ферментов вторичного метаболизма, не расшифрован, однако выявлено, что молекулы предшественника необходимо добавлять в среду в период фазы роста микроорганизма. Установлено, что вводимый предшественник должен лимитировать скорость биосинтеза антибиотика. Например, производство бензилпенициллина в значительной степени стимулируется добавками его метаболического предшественника — фенилуксусной кислоты; пропионовая кислота и пропиловый спирт иницируют биосинтез макролидов через метилмалонилКоА; L-фенилаланин — предшественник фенилаланина — ускоряет образование грамицидина S. Аналогичный эффект вызывает использование ингибиторов метаболизма. Так, при подавлении процесса введения хлора микроорганизм *S. aureofaciens* образует тетрациклин, а не хлортетрациклин, а при ингибировании реакции метилирования им синтезируется деметилированное производное хлортетрациклина.

Другой способ получения антибиотиков состоит в использовании для их биосинтеза заблокированных мутантов, у которых отсутствует (блокировано) определенное звено в цепи реакций, ведущих к синтезу антибиотика. Блокированные мутанты не способны образовывать нужный антибиотик. Используя низкую субстратную специфичность ферментов вторичного метаболизма и вводя аналоги предшественников антибиотика, последние переводят в аналоги самого антибиотика в ходе процесса, известного как мутационный биосинтез, или мутасинтез:

а) предполагаемая последовательность реакций, ведущая к синтезу антибиотика

$$A \rightarrow B \xrightarrow{\text{фермент}} C \rightarrow D \rightarrow E \rightarrow \text{антибиотик}$$

б) отсутствие синтеза антибиотика у «блокированного» мутанта



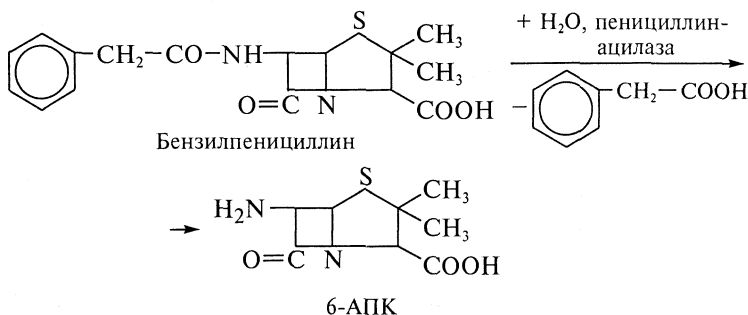
в) синтез модифицированного антибиотика после введения аналога предшественника (D*)

$$A \rightarrow B \xrightarrow{\text{фермент}} \dots D^* \rightarrow E^* \rightarrow \text{модифицированный антибиотик}$$

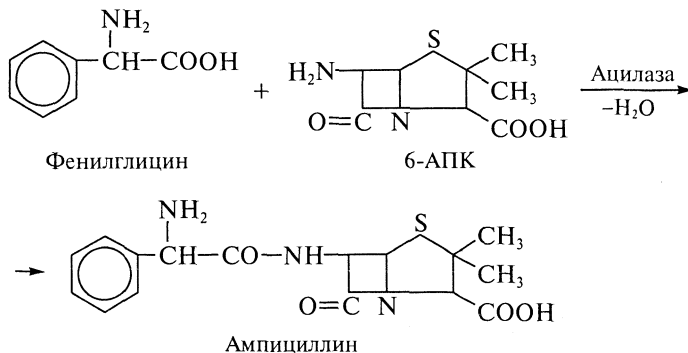
Так, мутанты *Nocardia mediterranei*, у которых нарушена способность к ацилированию, образуют аналог предшественника рифамицина В-рифамицин SV, который служит исходным веществом для получения многих синтетических рифамицинов (препараты для лечения туберкулеза и проказы).

Особенно успешны разработки в области биосинтеза полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых более эффективных аналогов пенициллина основано на измене-

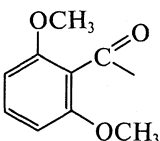
нии природы его ацильной группировки при сохранении в неизменном виде ядра пенициллина — 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК). В промышленности 6-АПК получают путем гидролиза природных пенициллинов с помощью специфического фермента — пенициллинацилазы, образующейся с высоким выходом в процессе ферментации ряда штаммов микроорганизмов. Ацилазы различают по их субстратной специфичности. Некоторые из ацилаз способны катализировать и обратные реакции — процессы ацилирования аминогруппы 6-АПК с образованием модифицированного пенициллина. Таким путем было получено более 40 000 полусинтетических пенициллинов. Существенно, что во многих случаях 6-АПК не выделяют из культуральной жидкости, например при превращении бензилпенициллина в ампициллин:

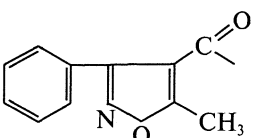


Бензилпенициллин гидролизуют ацилазой мутанта *Kluyvera citrophila* при pH 7,8 — 8,0 и температуре 40 — 50 °С. Затем в ферментер вносят мутант *Pseudomonas melanogenum* и фенолглицин. Условия ферментации изменяют таким образом (pH 5,0 — 5,5), чтобы ацилаза второго мутантного организма осуществляла синтез ампициллина:



Замена ацильного остатка приводит к синтезу других полусинтетических антибиотиков. Так, если $RC(=O)$ в молекуле пеницил-

лина представлен  , возникает метициллин, а в слу-

чае ацила  — оксациллин.

Антибиотики продуцируются плесневыми грибами, актиномицетами, зубактериями и другими микроорганизмами. Некоторые из этих организмов способны продуцировать большое количество антибиотиков. Так, 6 родов филаментозных грибов производят около 1000 различных антибиотиков, в том числе пенициллин и цефалоспорин, а три рода актиномицетов — 3000 антибиотиков. Среди актиномицетов наибольший вклад вносит род *Streptomyces*, один из видов которого — *S. griseus* синтезирует более 50 антибиотиков. В процессе образования антибиотиков задействовано значительное число генов. Массовая расшифровка первичной структуры геномов микроорганизмов показала, что эта величина равна 1—2 %. Так, у *Bacillus subtilis* число таких генов достигает 2 %, что обеспечивает микроорганизму большие возможности для защиты и адаптации. С другой стороны, это обстоятельство затрудняет анализ путей биосинтеза антибиотиков и идентификацию отдельных мутаций, способных увеличить выход продукта. Тем не менее большинство известных в настоящее время высокопродуктивных штаммов продуцентов антибиотиков получено традиционными методами мутагенеза и селекции.

Биосинтез антибиотиков, как и любых других вторичных метаболитов, возрастает в фазе замедленного роста клеточной популяции (конец трофофазы) и достигает максимума в стационарной фазе (идиофазе). Считают, что в конце трофофазы изменяется энзиматический статус клеток, появляются индукторы вторичного метаболизма, освобождающие гены вторичного метаболизма из-под влияния кatabолитной репрессии. Поэтому любые механизмы, тормозящие клеточную пролиферацию и активный рост, стрессовые ситуации, активируют процесс образования антибиотиков.

Процесс культивирования идиолиотов проходит две фазы (двухступенчатое культивирование). На первой фазе происходит накопление достаточного количества биомассы, которая выращивается на среде для роста микроорганизма. Эта фаза должна быть быстрой, а питательная среда дешевой. На второй фазе осуществляют запуск и активный синтез антибиотика. На этой фазе ферментацию ведут на продуктивной среде.

Образование антибиотиков регулируется условиями культивирования микроорганизмов. Поэтому оптимизация питательной среды является главным фактором в повышении выхода продукта.

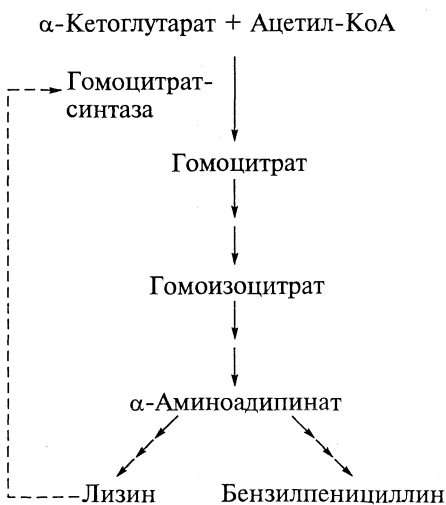
Специальные опыты показали, что выход цефалоспорина С уменьшается при переходе от использования в качестве источника углерода сахарозы к быстро усваиваемому углеводу глюкозе. Наиболее оптимальной средой для образования антибиотика культурой *Streptomyces antibioticus* оказалась смесь 0,1 % глюкозы и 1 % галактозы. При таком соотношении моносахаридов глюкоза быстро утилизируется и микроорганизм переключается на усвоение галактозы, что и инициирует идиофазу.

Многие антибиотики берут свое начало от промежуточных соединений обмена первичных метаболитов, поэтому их биосинтез регулируется путем ретроингибирования. Так, биосинтез пенициллина культурой гриба *Penicillium chrysogenum* контролируется по принципу обратной связи L-лизином. Этот эффект объясняется тем, что биосинтез как пенициллина, так и лизина осуществляется через общий предшественник — α-аминоадипиновую кислоту (см. схему ниже). Торможение лизином первого фермента биосинтеза — гомоцитратсинтазы — приводит к недостатку α-аминоадипиновой кислоты, что снижает выход антибиотика.

Добавление в питательную среду α-аминоадипиновой кислоты предотвращает ингибирующий эффект лизина и активирует биосинтез пенициллина в отсутствие лизина. Кроме ретроингибирования биосинтез многих антибиотиков тормозится высокими концентрациями своих же антибиотиков. Следует отметить, что в процессе эволюции микроорганизмы выработали механизмы защиты от действия собственных антибиотиков. Эта проблема успешно решается

в результате использования иммобилизованных ферментов.

Большинство антибиотиков получают при глубинной аэробной ферментации периодического действия в асептических условиях. Период ферментации длится 7—10 суток. В последние годы внедряются полупрерывные и непрерывные процессы ферментации. Технология завершающих стадий процесса определяется природой антибиотика, характером производства и целями дальнейшего использования антибиотиков. Для медицинских целей технология выделения и



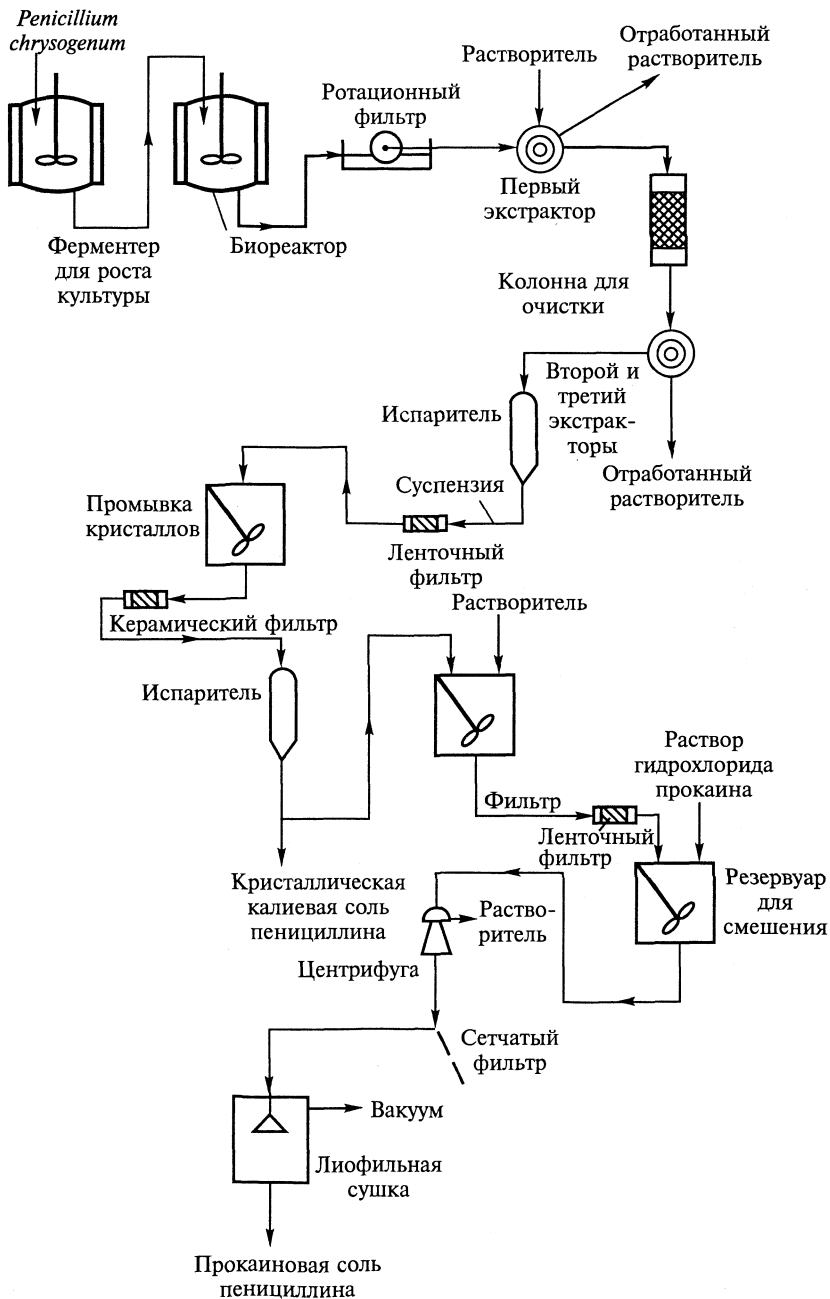
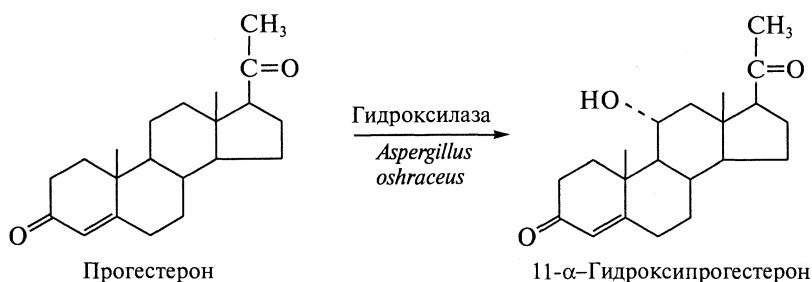


Рис. 3.6. Технологическая схема производства пенициллина (по В. Atkinson, F. Mavituna, 1983)

очистки имеет особое значение. Обычно она включает сложные многоступенчатые комбинации различных операций: экстракцию антибиотиков подходящими растворителями, осаждение и перекристаллизацию их из разных сред, фракционирование на ионообменных смолах, лиофильную и распылительную сушку готовых препаратов (рис. 3.6). Антибиотики выделяют или в виде сравнительно неочищенных препаратов (натриевая соль пенициллина), или в виде высокоочищенных веществ (прокаиновая соль пенициллина), предназначенных для клинического использования. Выход антибиотиков обычно составляет несколько десятков граммов на 1 л.

3.5.2. Получение промышленно важных стероидов

Способность клеток микроорганизмов к сложнейшим процессам биотрансформации наиболее полно реализовалась при получении промышленно важных стероидов. Использование абсолютной субстратной специфичности и стереоспецифичности биологических катализаторов, присущих целым клеткам микроорганизмов, позволило разработать условия осуществления множества химических реакций для структурных перестроек стероидов. В результате были получены новые соединения с лучшими фармакологическими свойствами. Биотрансформация стероидов обычно заключается в селективном воздействии на одно из положений стероидного скелета. Первый промышленный процесс микробной биотрансформации стероидов основывался на технологии направленного гидроксирования (11- α -гидроксирование) прогестерона:



Значимость разработанной микробной трансформации определяется тем, что процессы гидроксирования кортикостерона и его производных лежат в основе промышленного получения многих ценных продуктов: противовоспалительных и противоопухолевых препаратов, транквилизаторов, анестезирующих средств, половых гормонов и пр.

Так, производство в промышленном масштабе важнейшего противовоспалительного препарата — преднизолона — осуществля-

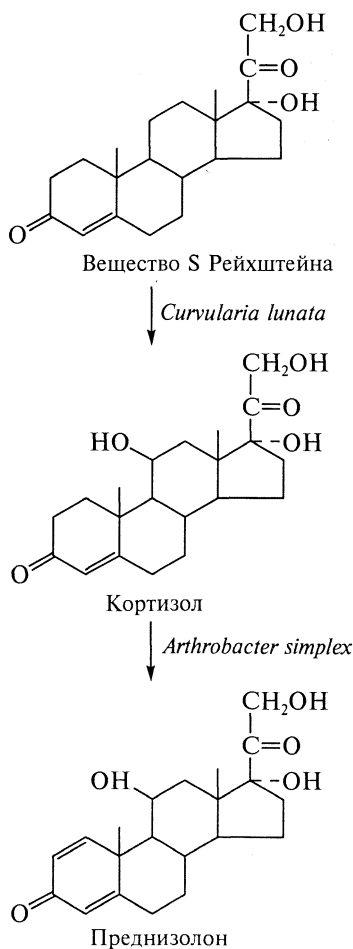
ется путем микробного гидроксилирования кортикостерона (см. схему ниже).

Правильность преобразования стероидного субстрата контролируют, сочетая химический подход со специфичностью биологической системы. Например, образование уксуснокислого эфира по С-17-субстрата стереохимически препятствует другим побочным реакциям.

Важнейший источник стероидных гормонов — культура клеток растений. Так, культура клеток диоскореи дельтовидной (*Dioscorea deltoidea*) корневого происхождения продуцирует фитостерин диосгенин и его гликозидные производные (сапонины). Существенно, что способность к сверхсинтезу фураностаноловых гликозидов ряда штаммов диоскореи, например штамма ДМ-ОГ, стабильно поддерживалась в течение 27 лет (Р.Г. Бутенко, 1999). Таким образом, культивирование клеток растений *in vitro* представляет собой новое решение проблемы промышленного получения вторичных метаболитов.

Дальнейшие успехи в производстве стероидных препаратов связывают с применением иммобилизованных клеток, использованием оптимального сочетания биологических и химических превращений, а также с совершенствованием технологии очистки получаемых соединений. Среды для биотрансформации имеют достаточно сложный состав, а реакция требует строгого контроля за каждым ее параметром (рН, время и т.д.). Так, среда для осуществления реакции окисления кортизола в преднизолон культурой клеток *Arthrobacter simplex* включает пептон, глюкозу и кукурузный экстракт. Через сутки к смеси добавляют вещество S Рейхштейна. Процесс ведут строго в нейтральной среде при температуре 28 °С в течение 120 ч. Выход преднизолона составляет 93 %.

Разработка крупномасштабного производства преднизолона путем биотрансформации стероидов позволила снизить стоимость этого препарата в 200 раз.



Глава 4

БИОИНДУСТРИЯ ФЕРМЕНТОВ

4.1. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты сохраняют свои уникальные свойства (эффективность, специфичность действия) вне клеток, поэтому их традиционно широко применяют в практике. Биологические катализаторы нетоксичны, работают в мягких условиях, используют доступное сырье (в том числе и отходы), в связи с чем их применение в промышленности выгодно с экономической и экологической точек зрения.

По объему производства ферменты занимают третье место после аминокислот и антибиотиков. Из более чем 2000 известных в настоящее время ферментов в промышленности используется около 30. Основная часть ферментов, поступающих на мировой рынок, приходится на долю гидролаз, из которых 60 % составляют пептидогидролазы (в основном щелочные и нейтральные протеазы), использующиеся в качестве детергентов в производстве синтетических моющих средств, а 30 % — гликозидазы, применяющиеся в производстве кондитерских изделий, фруктовых и овощных соков. Ферменты находят применение в текстильной, кожевенной, целлюлозно-бумажной, медицинской, химической промышленности (табл. 4.1).

По прогнозам ученых, основным потребителем ферментов в ближайшем будущем остается пищевая промышленность. Главное место среди этих энзимов занимают глюкоизомераза и глюкоамилаза, применяющиеся для приготовления обогащенных фруктозой кукурузных сиропов и составляющие около 50 % рынка пищевых энзиматических препаратов.

Все большее развитие получают технологические процессы с участием сложных энзиматических систем, включающих коферменты. Так, созданы ферментные мембранные реакторы, катализирующие непрерывные процессы с регенерацией НАДН (восстановительное аминирование кетокислот, восстановление α -кетокислот в α -гидроксикислоты). Разработаны системы разделения рацематов посредством стереоспецифического активного транспорта. Например, мембрана, содержащая гексокиназу и фосфата-

Таблица 4.1

Применение ферментов

Название и шифр фермента	Источники фермента	Химический и биотехнологический процессы. Область использования
Амилазы (КФ 3.2.1.1 КФ 3.2.1.2 КФ 3.2.1.3)	Бактерии, грибы (<i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i>)	Гидролиз крахмала до декстринов, мальтозы и глюкозы. Спиртовая, пивоваренная промышленность, хлебопечение, получение патоки, глюкозы
Глюкоизомераза (КФ 5.3.1.18)	Более 80 видов микроорганизмов (<i>Bacillus</i> sp., <i>Streptomyces albus</i> , <i>S. griseus</i>)	Изомеризация D-глюкозы в D-фруктозу. Кондитерская, ликероводочная, безалкогольная промышленность, хлебопечение
Глюкооксидаза (КФ 1.1.3.4) и каталаза (КФ 1.11.1.6)	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. casei</i> , <i>P. nigricans</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P. vitale</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Corynebacterium</i> spp.)	Удаление кислорода и глюкозы (из яичного порошка, мясных и других продуктов). Виноделие, пивоваренная, консервная, соковая и безалкогольная промышленность
Липазы (КФ 3.1.1.3)	Поджелудочные железы животных, семена растений, микроорганизмы (<i>Candida lipolytica</i> , <i>Streptomyces flavogriseus</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Saccharomyces lipolytica</i>)	Гидролиз жиров и масел. Пищевая, легкая, медицинская промышленность, сельское хозяйство, коммунальное хозяйство, бытовая химия
Пектиназа (КФ 3.2.1.15)	Многие микроорганизмы (<i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp. и др.)	Гидролиз галактуронана, осветление вина и фруктовых соков
Пептидогидролазы (КФ 3.4)	Поджелудочные железы и слизистая желудка животных; плоды, побеги, отходы переработки некоторых растений (дынное дерево, инжир, ананас), микроорганизмы (<i>Bacillus</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.)	Лизис белка. Получение аминокислот, производство и получение сыра, мягчение мясных и рыбных изделий, выделка кожи, активизация пищеварения. Пивоварение, виноделие, хлебопечение, пищевая промышленность, сельское хозяйство, медицина

Окончание табл. 4.1

Название и шифр фермента	Источники фермента	Химический и биотехнологический процессы. Область использования
Целлюлазы (КФ 3.2.1.4)	Микроорганизмы: <i>Clostridium</i> spp., <i>Trichoderma reesei</i> , <i>T. viridae</i> , <i>Alternaria tenuis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Fusarium culmorum</i>	Гидролиз целлюлозы до глюкозы. Производство пищевых и кормовых белковых препаратов, этанола, глюкозо-фруктозных сиропов. Спиртовая, пивоваренная, пищевконцентратная промышленность, хлебопечение, кормопроизводство
Фруктофуранозидаса (КФ 3.2.1.26)	Микроорганизмы: <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Cercospora beticola</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Streptococcus mutans</i>	Инверсия сахарозы. Кондитерская, ликероводочная, безалкогольная промышленность, сиропопроизводство

зу, функционирует как насос, избирательно прокачивающий лишь D-глюкозу. Применение сопряженных ферментативных реакций с участием алкогольоксидазы и каталазы дрожжей *Hansenella polymorpha* и формальдегиддисмутазы бактерии *Pseudomonas putida* позволило осуществить окисление метанола в муравьиную кислоту с выходом 88—94 %. В промышленности большое будущее имеют ферменты, способные катализировать химические реакции в органической фазе, в частности липазы. Существенно, что каталитическая активность панкреатической липазы свиньи сохраняется при концентрации воды в реакционной среде, составляющей всего 0,015 %, и при температуре 100 °С. Препараты липазы используют для синтеза оптически чистых сложных эфиров и феромонов, применяющихся в парфюмерии и медицине.

Для деградации и модификации антропогенных органических соединений, поступающих в окружающую среду, используют ферменты разных классов и в том числе лакказу, лигниназу, тирозиназу, монооксигеназу, диоксигеназу и др. Перспективна для очистки сточных вод новая технология, основанная на использовании реакции пластеинообразования, открытой А. Я. Данилевским в 1886 г. Сущность работ Данилевского состоит в экспериментальном доказательстве обращения протеолиза и возможности синтеза белковоподобных веществ (пластеинов) под действием ряда протеолитических ферментов. Сточные воды содержат аминокислоты и пептиды, концентрация которых возрастает в результате гидролиза белковых компонентов отходов под воздействием пептидогидролаз микроорганизмов. Данная технология, активно внедряющаяся во

Франции, нацелена на производство в промышленных масштабах кормовых белков из аминокислот и пептидов сточных вод.

Ферменты широко используют в медицине, например в заместительной терапии в составе лечебных препаратов. Пероральное введение фенилаланин-аммиак-лиазы снижает уровень фенилаланина в крови при фенилкетонурии. Протеолитические ферменты, амилазу и липазу применяют при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени. В последние годы накопились данные об эффективности применения протеиназ в энзимотерапии злокачественных новообразований. Это объясняется большей проницаемостью мембран раковых клеток для гидролитических ферментов в сравнении с нормальными клетками, благодаря чему опухолевые клетки быстро лизируются при введении смеси протеиназ (препарат «папайотин»). Протеолитические ферменты — плазмин и активирующие его стрептокиназу и урокиназу используют для растворения тромбов в кровеносных сосудах; коллагеназу — для рассасывания рубцовых образований; эластазу — для задержки развития атеросклероза; лизоцим — для лечения конъюнктивитов; дезоксирибонуклеазу из стрептококка (стрептодорназа) — для лечения заболеваний верхних дыхательных путей и роговицы глаза.

Важнейшую область применения ферментов в медицине составляет энзимодиагностика — тестирование патологии того или иного органа человека по уровню активности фермента или соотношению его множественных форм и изоферментов. Так, аспаратаминотрансфераза, изоцитратдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа и альдолаза служат для выявления инфаркта миокарда; аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза и лактатдегидрогеназа — для диагностики заболеваний печени; глутамилтрансфераза — для блокировки отторжения органов при их пересадке и т.д.

Таким образом, производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к тем ее отраслям, объем продукции которых постоянно растет, а сфера применения неуклонно расширяется. По объему производства ферментов доминируют страны Западной Европы. Резкий рост этой индустрии наблюдается в США и Японии.

4.2. ИСТОЧНИКИ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты присущи всем живым существам, однако для их выделения используют те природные объекты, в которых содержание искомого фермента составляет не менее 1%. Для крупномасштабного получения ферментов пригодны только некоторые растительные организмы на определенной фазе их развития (проросшее зерно различных злаков и бобовых, латекс и сок зеленой массы ряда растений), а также отдельные ткани и органы живот-

ных (поджелудочная железа, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта, сычуг крупного рогатого скота, семенники половозрелых животных). Практически неограниченный источник ферментов — микроорганизмы (бактерии, грибы, дрожжи), содержащие набор большинства известных в настоящее время энзимов, количество которых можно повысить в десятки и сотни раз методами мутагенеза, селекции и индукции биосинтеза.

4.3. ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ — ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ

В зависимости от источника технология получения ферментных препаратов имеет свои особенности. При извлечении ферментов из растительного сырья и животных тканей технология сводится к экстракции энзимов и очистке их от сопутствующих балластных веществ. Технология ферментных препаратов микробного происхождения более сложная, так как дополнительно включает этапы культивирования микроорганизмов — продуцентов ферментов, в том числе этапы получения посевного материала и производственной культуры соответствующего микроорганизма.

Для производства посевного материала используют исходный штамм продуцентов, получаемый из лабораторных чистых культур, который выращивают разными способами на предварительно стерилизованной твердой или жидкой питательной среде до определенного возраста. Посевной материал консервируют (высушиванием или хранением при низких температурах) вплоть до дальнейшего использования. Производственные культуры продуцента получают, выращивая посевной материал микроорганизмов как на поверхности твердых или жидких сред, так и в глубине жидких питательных сред.

Поверхностный метод выращивания продуцентов, предложенный И. Такаmine еще в 1894 г., состоит в культивировании микроорганизмов на поверхности увлажненных стерилизованных отрубей, размещенных в кюветах, к которым иногда добавляют солодовые ростки, древесные опилки, свекловичный жом. Инкубацию микроорганизмов ведут в специальном термостатируемом цехе при постоянном контроле в нем температуры, влажности и подачи воздуха.

В последние 15 лет для выращивания продуцентов ферментов чаще используют более экономный — *глубинный метод* культивирования (рис. 4.1). В промышленных условиях для этих целей применяют ферментеры из нержавеющей стали, снабженные приспособлениями для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха. Сначала ферментер заполняют питательной средой, автоклавируют, а затем засевают чистой культурой, подаваемой из специального генератора. Для предотвращения инфекции в ферментере поддерживают повышенное давле-

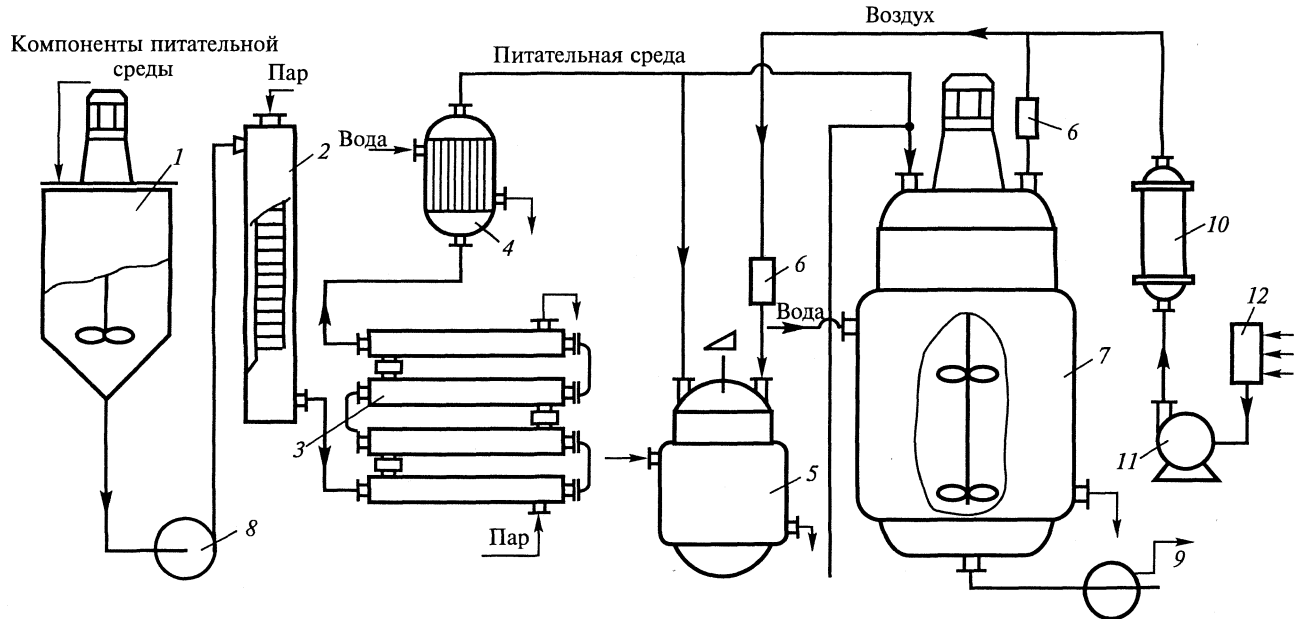


Рис. 4.1. Принципиальная технологическая схема глубинного культивирования микроорганизмов (по А.А. Свитцову и др., 1986):

1 — смеситель питательной среды; 2 — стерилизатор в непрерывном режиме потока питательной среды; 3, 4 — теплообменники; 5 — посевные аппараты; 6, 10, 12 — фильтры для очистки воздуха; 7 — ферментер; 8, 9 — насосы; 11 — компрессор

ние наряду с оптимальными значениями рН, температуры, редокс-потенциала и другими условиями культивирования.

В настоящее время наиболее прогрессивным признан *проточный метод* культивирования микроорганизмов, который обеспечивает непрерывную подачу в ферментер как питательной среды, так и посевного материала. Размножение микроорганизмов и биосинтез фермента регулируют при использовании этого метода по мере поступления питательной смеси в ферментер. Такой ферментер представляет собой вращающийся трубкообразный реактор, через один конец которого в него поступает питательная среда и культура микроорганизмов, а из другого — выводятся ферменты, продукты жизнедеятельности и бактериальная масса. Основное достоинство метода — возможность длительное время поддерживать в автоматическом режиме рост культуры микроорганизма. Например, культура ацетонобутиловых бактерий находилась в таком реакторе в состоянии непрерывного размножения в течение 200 суток (И.Д. Иерусалимский с сотр., 1986).

Важнейшим фактором эффективности технологии ферментных препаратов является качество питательной среды. Основное требование к качеству питательной среды состоит в полноценности ее состава, обеспечивающей рост продуцента и биосинтез целевого фермента. Микроорганизмы нуждаются прежде всего в соединениях, содержащих углерод, азот, водород и кислород. К ним относятся органические вещества, соли аммония и вода. Кроме того, в состав питательной среды должны быть включены минеральные соединения, содержащие Mg, Ca, P, S, Fe, K и другие макро- и микроэлементы, витамины, ростовые вещества (биотин, инозит) и пр. Питательные среды в зависимости от состава делятся на синтетические и комплексные. Синтетическими считают те среды, которые состоят из определенного по качественному и количественному составу набора индивидуальных веществ. В комплексные среды входят различные природные продукты, часто отходы пищевых производств. К их числу относятся различные жмыхи, барда спиртовых заводов, картофельная мезга, кукурузный экстракт, меласса, отруби и прочие продукты. Благодаря использованию отходов комплексные питательные среды доступны, дешевы и обеспечивают безотходность биотехнологических производств.

4.4. ТЕХНОЛОГИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Выделение и очистка фермента как из культуры микроорганизма (выращенного любым способом), так и из других природных источников весьма трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому, если фермент можно использовать в виде неочищенно-

го препарата, его не очищают. В промышленности широко применяют коммерческие препараты ферментов, чистота которых составляет всего 0,1 % (т.е. 99,9 % составляют примеси). К таким отраслям относятся спиртовая, кожевенная, текстильная промышленность, а также сельское хозяйство, производство бытовой химии. Например, ферментный препарат, употребляемый в пивоварении, представляет собой высушенную биомассу плесневых грибов. В большинстве отраслей пищевой промышленности, практике научных исследований и особенно в медицине используют только очищенные препараты ферментов, частично или полностью освобожденные от балластных веществ и полностью охарактеризованные в отношении их специфичности и физико-химических свойств. Исходным материалом для получения препаратов ферментов служат: биомасса продуцента, фильтрат культуральной жидкости, экстракт из культуры микроорганизма или из тканей и органов растений и животных, из которых готовят препараты различной степени очистки.

Неочищенные ферментные препараты получают путем высушивания в мягком режиме культуры микроорганизмов вместе с остатками питательной среды. Такие препараты получают и путем упаривания экстракта из культуры продуцента, выращенного поверхностным способом, или из фильтрата культуральной жидкости (в случае глубинного выращивания микроорганизмов). Распространен также метод ацетоновых порошков, состоящий в осаждении и быстром обезвоживании при температуре не выше -10°C тканей или вытяжек из них, содержащих ферменты. Технические препараты ферментов представляют собой либо высушенные до порошкообразного состояния продукты, либо жидкие концентраты, обычно характеризующиеся 50 %-м содержанием сухой массы веществ.

Для успешного выделения ферментов из клеточного содержимого необходимо очень тонкое измельчение исходного материала вплоть до разрушения субклеточных структур: лизосом, митохондрий, ядер и др., которые имеют в своем составе многие индивидуальные ферменты. Для этого используют специальные мельницы и гомогенизаторы, а также ультразвук, метод попеременного замораживания и оттаивания ткани. Для высвобождения ферментов из мембранных структур клетки к гомогенатам добавляют небольшие количества детергентов (твин, тритон X-100) или обрабатывают их энзимами — лизоцимом, целлюлазой, лецитиназой С. Особое внимание при выделении ферментов уделяют проведению всех операций в условиях, исключающих денатурацию белка (нейтральные значения рН, стабилизирующие добавки в виде белков, солей и специальных соединений).

Пример, иллюстрирующий получение частично очищенного препарата β -галактозидазы из мутанта *E. coli*, представлен на рис. 4.2. Схема очистки включает отделение клеток микроорганизма по

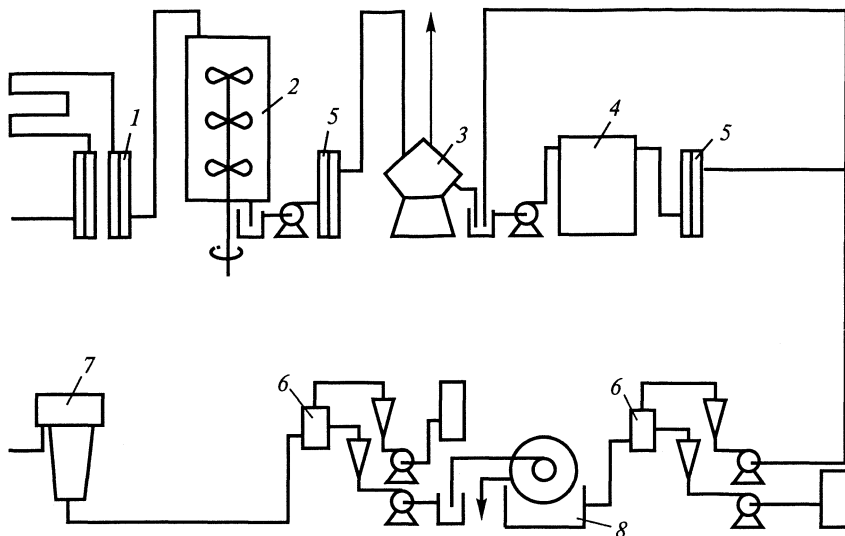


Рис. 4.2. Технологическая схема непрерывного получения β-галактозидазы из клеток *E. coli* ML308 (по P. P. Gray et al., 1972):

1 — стерилизатор среды; 2 — ферментер; 3, 7 — центрифуги; 4 — гомогенизатор; 5 — теплообменник; 6 — смесительные камеры; 8 — ротационный вакуум-фильтр

выходе их из ферментера от культуральной жидкости посредством центрифугирования и последующее разрушение клеток в гомогенизаторе высокого давления. Для освобождения белков от нуклеиновых кислот полученный гомогенат обрабатывают сульфатом марганца до конечной концентрации этой соли в смеси, равной 0,05 М. Осадок нуклеиновых кислот отделяется с помощью ротационной вакуум-фильтрации, а в образовавшийся фильтрат добавляют сульфат аммония до 45 % от его насыщения. Возникший осадок белков, содержащий β-галактозидазу, собирают с помощью центрифугирования или вакуум-фильтрации. Вся процедура очистки энзима от момента подачи бактерий в систему до момента получения осадка β-галактозидазы занимает всего 1 ч.

В зависимости от свойств выделяемого фермента и сопутствующих ему балластных веществ при получении очищенных препаратов ферментов комбинируют различные приемы и методы (рис. 4.3), такие, как термическое фракционирование, осаждение органическими растворителями, солями и тяжелыми металлами, фильтрация на молекулярных ситах, ионообменная хроматография, электрофорез, изоэлектрофокусирование.

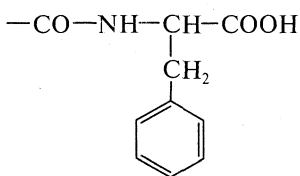
На заключительных этапах очистки часто используют аффинную хроматографию (биоспецифическая хроматография, хроматография по сродству), которая основана на способности ферментов избирательно связывать те или иные лиганды — субстраты,



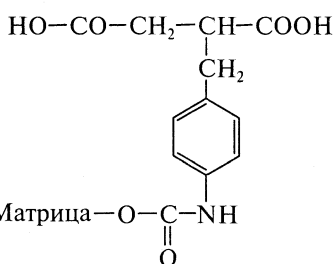
Рис. 4.3. Схема получения ферментных препаратов из культур микроорганизмов (по Дж. Бейли, Д. Оллис, 1989)

коферменты, конкурентные ингибиторы, аллостерические эффекторы и т. п. Такое связывание весьма специфично ($K_s < 10^{-4}$ М), что позволяет выделить тот или иной фермент из множества других белков. Например, из желудочного сока человека методом одноэтапной аффинной хроматографии выделена кислая липаза, используемая в заместительной терапии при заболеваниях печени.

Для синтеза аффинного сорбента, соответствующего специфичности данного фермента, лиганд (субстрат или его аналог) присоединяют к инертной матрице (макропористые гидрофильные гели, синтетические полимеры, неорганические носители). Для уменьшения пространственных трудностей при взаимодействии фермента с матрицей лиганд присоединяют к носителю через промежуточное звено (вставку, ножку, спейсер). Присоединение лигандов к поперечносшитой агарозе — сефарозе обычно проводят, активируя ее бромцианом (см. с. 91). Связывание с сефарозой, активированной бромцианом, *n*-амино-бензилянтарной кислотой, используемой в качестве лиганда, обеспечивает взаимодействие сорбента с каталитическим центром только карбоксипептидазы благодаря сходству лиганда с субстратами карбоксипептидазы:

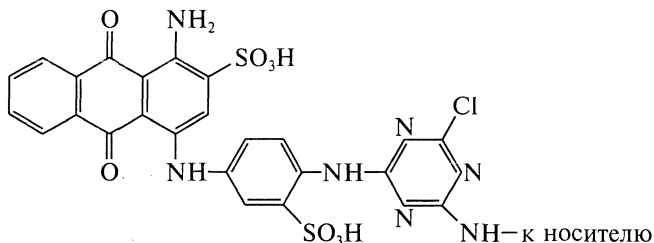


С-концевой остаток
фенилаланина в субстрате
карбоксипептидазы



Аффинный сорбент с лигандом.
Бензилянтарная кислота изостерична
структуре остатка фенилаланина

Сорбенты, содержащие цибакрон голубой и некоторые другие красители антрахинонового ряда, используют для аффинной хроматографии НАД-зависимых дегидрогеназ, а носители, имеющие циклопептидный антибиотик грамицидин, — для протеолитических ферментов:



Аффинный сорбент, содержащий антрахиноновый краситель

Таблица 4.2

Схема очистки глюкоамилазы из культуры *Endomycopsis* ssp. 20-9 (по И.М.Грачевой, 1987)

Стадия очистки	Объем, мл	Общее количество белка, мг	Глюкоамилазная активность				Амилолитическая активность		Трансглюкозидазная активность
			общая, ед. (Е)	удельная, Е/мг	выход, %	степень очистки	общая, ед.(Е)	выход, %	
Исходная культуральная жидкость	1200	13 600	28 500	2,1	100,0	1,0	9500	100	Глюкоза, изомальтоза
Отделение биомассы, концентрирование, отделение балласта	560	11 100	25 600	2,3	90,0	1,1	8500	89,0	То же
Осаждение ацетоном, растворение в воде	350	2040	19 800	9,7	69,5	4,6	1050	11,3	—
Ультрафильтрация	55	1610	18 200	11,3	64,0	5,4	860	9,10	—
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	555	298	15 000	50,4	52,5	24,5	30,0	0,35	—
Ультрафильтрация	16	250	13 450	54,0	47,2	25,7	27,5	0,29	—
Гель-фильтрация через акрилекс П-100	100	140	11 400	76,5	40,5	36,5	22,8	0,24	—
Обессоливание, лиофилизация	0,1	92	7150	77,0	25,0	37,0	14,3	0,15	—

В процессе выделения повышается доля фермента в массе тотальных белков, т. е. увеличивается его удельная активность. В табл. 4.2 представлены данные, характеризующие процедуру очистки от сопутствующих ферментов и балластных белков глюкоамилазы из культуры *Endomycopsis* ssp. 20-9. Анализ таблицы показывает, что чистота глюкоамилазы в препарате возросла в 37 раз и в полученном препарате отсутствует активность двух ферментов углеводного обмена — гликозилтрансферазы и α -амилазы.

В производственных условиях активность получаемого ферментного препарата оценивается количеством субстрата, преобразованного 1 мг (1кг) препарата при оптимальных условиях за 1 мин, и измеряется в Е/мг, моль/мг или каталах/кг белка.

Очищенные ферментные препараты хранят при низкой температуре (до -80°C). Для стабилизации ферментов в их препараты добавляют коферменты и субстраты. Ферментные препараты для промышленного применения стабилизируют, добавляя глицерин, моносахариды, дисахариды (глюкоза, сахароза, лактоза), HS-соединения (цистеин, глутатион, меркаптоэтанол, дитиотреитол и др.), отдельные аминокислоты, желатину и другие белки-наполнители.

Существенно, что из 2003 включенных в список известных в настоящее время ферментов более 1500 выделено и в той или иной степени очищено; это служит не только базой для изучения физико-химических основ ферментативного катализа, но и фундаментом для совершенствования химического производства и промышленности.

4.5. ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ, ЕЕ ЗАДАЧИ

Развитие прикладной энзимологии долгое время сдерживалось дороговизной чистых ферментных препаратов, неустойчивостью их при хранении и невозможностью многократного использования. Принципиально новые перспективы открылись перед прикладной энзимологией в 60-е годы XX в. в результате появления на стыке химии и биологии новой отрасли — инженерной энзимологии. Ее задачи заключаются в развитии прогрессивных методов выделения ферментов, их стабилизации и иммобилизации; конструировании катализаторов с нужными свойствами и разработке научных основ их применения.

В частности, методами белковой инженерии, сущность которых состоит в изменении первичной структуры природной молекулы фермента посредством химической модификации самого энзима или его гена, удается принципиально трансформировать структуру активного центра и его функцию, модулировать субстратную специфичность и физико-химические свойства фермен-

та. Так, замена остатка глутамина-102 в молекуле лактатдегидрогеназы на аргинин превратила фермент в высокоактивную малатдегидрогеназу. Описанным способом получены термостабильные формы лизоцима Т-4 и субтилизина (каталитическая константа субтилизина изменена в 100 раз), созданы гибридные формы ферментной системы, ценной в иммуноферментном анализе, сочетающие в себе свойства β -галактозидазы и β -галактокиназы.

Многие проблемы технологии синтеза органических соединений, пищевой и медицинской промышленности, мониторинга человека и окружающей среды, защиты окружающей среды, энергетики не могут быть решены без использования методов современной инженерной энзимологии.

Важным этапом развития инженерной энзимологии стала разработка способов получения и использования иммобилизованных ферментов.

4.6. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Иммобилизованными ферментами называются ферменты, искусственно связанные с нерастворимым носителем, но сохраняющие свои каталитические свойства.

Еще в 1916 г. Дж. Нельсон и Е. Гриффин показали, что сахароза, сорбированная на угле, сохраняла свою каталитическую активность, но лишь в 1953 г. Н. Грубхофер и Д. Шлейт впервые осуществили ковалентные связывания амилазы, пепсина, РНКазы и карбоксипептидазы с нерастворимым носителем.

В 1971 г. на первой конференции по инженерной энзимологии был узаконен термин «иммобилизованные ферменты». Однако в понятие «иммобилизация» в настоящее время вкладывают более широкий смысл, чем связывание на нерастворимом носителе, а именно — полное или частичное ограничение свободы движения белковых молекул.

Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в сравнении со свободными молекулами. Прежде всего такие ферменты, представляя собой гетерогенные катализаторы, легко отделяются от реакционной среды, могут использоваться многократно и обеспечивают непрерывность каталитического процесса. Кроме того, иммобилизация ведет к изменению свойств фермента: субстратной специфичности, устойчивости, зависимости активности от параметров среды. Иммобилизованные ферменты долговечны и в тысячи и десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов. Так, происходящая при температуре 65 °С термоинактивация лактатдегидрогеназы, иммобилизованной в 60 %-м полиакриламидном геле, замедлена в 3600 раз по сравнению с нативным ферментом. Все перечисленное обеспечивает высокую экономичность,

эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные ферменты.

4.6.1. Носители для иммобилизации ферментов

По Дж. Порату (1974), идеальные материалы, используемые для иммобилизации ферментов, должны обладать следующими основными свойствами: нерастворимостью; высокой химической и биологической стойкостью; значительной гидрофильностью; достаточной проницаемостью как для ферментов, так и для коферментов, субстратов и продуктов реакции; способностью носителя легко активироваться (переходить в реакционноспособную форму).

Естественно, ни один из используемых в настоящее время в качестве носителя материал не отвечает полностью перечисленным требованиям. Тем не менее существует широкий набор носителей, пригодных для иммобилизации определенных энзимов в конкретных условиях.

В зависимости от природы носители делятся на органические и неорганические материалы.

Органические полимерные носители. Иммобилизация многих ферментов осуществляется на полимерных носителях органической природы. Существующие органические полимерные носители можно разделить на два класса: природные и синтетические полимерные носители. В свою очередь, каждый из классов органических полимерных носителей подразделяется на группы в зависимости от их строения. Среди природных полимеров выделяют белковые, полисахаридные и липидные носители, а среди синтетических — полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные.

К преимуществам природных носителей следует отнести их доступность, полифункциональность и гидрофильность, а к недостаткам — биodeградируемость и достаточно высокую стоимость.

Из полисахаридов для иммобилизации наиболее часто используют целлюлозу, декстран, агарозу и их производные. Для придания химической устойчивости линейные цепи целлюлозы и декстрана поперечно сшивают эпихлоргидрином. В полученные сетчатые структуры довольно легко вводят различные ионогенные группировки. Химической модификацией крахмала сшивающими агентами (формальдегид, глиоксаль, глутаровый альдегид) синтезирован новый носитель — губчатый крахмал, обладающий повышенной устойчивостью к гликозидазам.

Из природных аминсахаридов в качестве носителей для иммобилизации применяют хитин, который в значительных количествах накапливается в виде отходов в процессе промышленной переработки крабов и креветок. Хитин химически стоек и имеет хорошо выраженную пористую структуру.

Среди белков практическое применение в качестве носителей нашли структурные протеины, такие, как кератин, фиброин, коллаген и продукт переработки коллагена — желатина. Эти белки широко распространены в природе, поэтому доступны в значительных количествах, дешевы и имеют большое число функциональных групп для связывания фермента. Белки способны к биодеградации, что очень важно при конструировании иммобилизованных ферментов для медицинских целей. К недостаткам белков как носителей в этом случае следует отнести их высокую иммуногенность.

Синтетические полимерные носители. Благодаря разнообразию и доступности материалы этой группы широко используются как носители для иммобилизации. К ним относятся полимеры на основе стирола, акриловой кислоты, поливинилового спирта; полиамидные и полиуретановые полимеры. Большинство синтетических полимерных носителей обладают механической прочностью, а при образовании обеспечивают возможность варьирования в широких пределах величины пор, введения различных функциональных групп. Некоторые синтетические полимеры могут быть произведены в различных физических формах (трубы, волокна, гранулы). Все эти свойства полезны для разных способов иммобилизации ферментов.

Носители неорганической природы. В качестве носителей наиболее часто применяют материалы из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, силикагеля, а также силохромы, оксиды металлов. Их можно подвергать химической модификации, для чего носители покрывают пленкой оксидов алюминия, титана, гафния, циркония или обрабатывают органическими полимерами. Основное преимущество неорганических носителей — легкость регенерации. Подобно синтетическим полимерам неорганическим носителям можно придать любую форму и получать их с любой степенью пористости.

Итак, к настоящему времени создано огромное число разнообразных носителей для иммобилизации ферментов. Однако для каждого индивидуального фермента, используемого в конкретном технологическом процессе, необходимо подбирать оптимальные варианты как носителя, так и условий и способов иммобилизации.

4.6.2. Методы иммобилизации ферментов

Существуют два принципиально различных метода иммобилизации ферментов: без возникновения ковалентных связей между ферментом и носителем (физические методы иммобилизации) и с образованием ковалентной связи между ними (химические методы иммобилизации). Каждый из этих методов осуществляется разными способами (рис. 4.4).

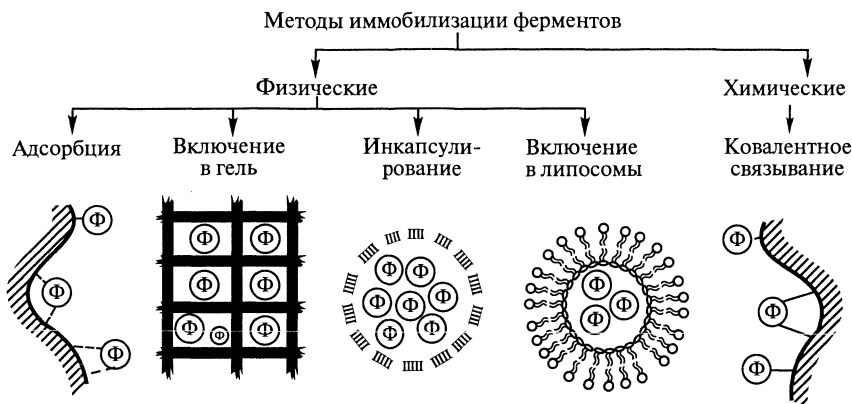


Рис. 4.4. Методы иммобилизации ферментов: ф-фермент

Физические методы иммобилизации ферментов реализуются посредством адсорбции фермента на нерастворимом носителе, путем включения энзимов в поры поперечносшитого геля, в полупроницаемые структуры или двухфазные системы.

Адсорбция ферментов на нерастворимых носителях. При адсорбционной иммобилизации белковая молекула удерживается на поверхности носителя за счет электростатических, гидрофобных, дисперсионных взаимодействий и водородных связей. Адсорбция была первым методом иммобилизации ферментов (Дж. Нельсон, Э. Гриффин, 1916), но и сейчас не потеряла своего значения и стала наиболее широко распространенным способом получения иммобилизованных ферментов в промышленности. В литературе описано получение адсорбционным способом более 70 иммобилизованных ферментов с использованием главным образом таких носителей, как кремнезем, активированный уголь, графитовая сажа, различные глины, пористое стекло, полисахариды, синтетические полимеры, оксиды алюминия, титана и других металлов. Последние применяются наиболее часто. Эффективность адсорбции молекулы белка на носителе определяется удельной поверхностью (плотностью центров сорбции) и пористостью носителя. Процесс адсорбции ферментов на нерастворимых носителях отличается крайней простотой и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем (статистическим способом, при перемешивании, динамическим способом с использованием колонок). С этой целью раствор фермента смешивают со свежим осадком, например, гидроксида титана, и высушивают в мягких условиях. Активность фермента при таком варианте иммобилизации сохраняется практически на 100 %, а удельная концентрация белка достигает 64 мг на 1 г носителя.

К недостаткам адсорбционного метода следует отнести невысокую прочность связывания фермента с носителем. При изменении условий иммобилизации могут происходить десорбция фермента, его потеря и загрязнение продуктов реакции. Существенно повысить прочность связывания фермента с носителем может предварительная его модификация (обработка ионами металлов, полифункциональными агентами — полимерами, белками, гидрофобными соединениями, монослоем липида и пр.). Иногда, наоборот, модификации подвергается молекула исходного фермента, однако зачастую это ведет к снижению его активности.

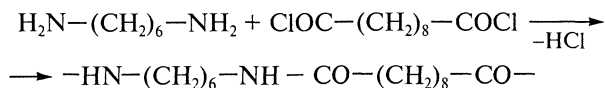
Иммобилизация ферментов путем включения в гель. Способ иммобилизации ферментов путем включения в трехмерную структуру полимерного геля широко распространен благодаря своей простоте и уникальности. Метод применим для иммобилизации не только индивидуальных ферментов, но и мультиэнзимных комплексов и даже интактных клеток. Иммобилизацию ферментов в геле осуществляют двумя способами. В первом случае фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой возникает пространственная структура полимерного геля с включенными в его ячейки молекулами фермента. Во втором случае фермент вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние. Для первого варианта используют гели полиакриламида, поливинилового спирта, поливинилпирролидона, силикагеля, для второго — гели крахмала, агар-агара, каррагинана, агарозы, фосфата кальция.

Иммобилизация ферментов в гелях обеспечивает равномерное распределение энзима в объеме носителя. Большинство гелевых матриц обладает высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью и обеспечивает возможность многократного использования фермента, включенного в его структуру. Однако метод непригоден для иммобилизации ферментов, действующих на водонерастворимые субстраты.

Иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры. Сущность этого способа иммобилизации заключается в отделении водного раствора фермента от водного раствора субстрата с помощью полупроницаемой мембраны, пропускающей низкомолекулярные молекулы субстратов и кофакторов, но задерживающей большие молекулы фермента. Разработано несколько модификаций этого метода, из которых интерес представляет микрокапсулирование и включение ферментов в липосомы.

Первый способ предложен Т. Чангом в 1964 г. и состоит в том, что водный раствор фермента включается внутрь замкнутой микрокапсулы, стенки которой образованы полупроницаемым полимером. Один из механизмов возникновения мембраны на поверхности водных микрокапсул фермента заключается в реакции меж-

фазной поликонденсации двух соединений, одно из которых растворено в водной, а другое — в органической фазе. Примером может служить образование на поверхности раздела фаз микрокапсулы, получаемой путем поликонденсации гексаметилендиамина-1,6 (водная фаза) и галогенангидрида себациновой кислоты (органическая фаза):



Размер получаемых капсул составляет десятки или сотни микрометров, а толщина мембраны — сотые доли микрометра.

Достоинства метода микрокапсулирования — простота, универсальность, возможность многократного использования нативного фермента (фермент может быть отделен от непрореагировавшего субстрата и продуктов реакции процедурой простого фильтрования). Особенно существенно, что методом микрокапсулирования могут быть иммобилизованы не только индивидуальные ферменты, но и мультиэнзимные комплексы, целые клетки и отдельные фрагменты клеток. К недостаткам метода следует отнести невозможность инкапсулированных ферментов осуществлять превращения высокомолекулярных субстратов.

Близким к инкапсулированию методом иммобилизации можно считать включение водных растворов ферментов в липосомы, представляющие собой сферические или ламеллярные системы двойных липидных бислоев. Впервые данный способ был применен для иммобилизации ферментов Дж. Вайсманом и Дж. Сессом в 1970 г. Для получения липосом из растворов липида (чаще всего лецитина) упаривают органический растворитель. Оставшуюся тонкую пленку липидов диспергируют в водном растворе, содержащем фермент. В процессе диспергирования происходит самосборка бислоевых липидных структур липосомы, содержащих включенный раствор фермента.

Ферменты, иммобилизованные путем включения в структуру липосом, используют преимущественно в медицинских и научных целях, ибо значительная часть ферментов в клетке локализована в составе липидного матрикса биологических мембран, поэтому изучение липосом имеет большое значение для понимания закономерностей процессов жизнедеятельности в клетке.

Другие приемы иммобилизации ферментов, основанные на физических методах, менее распространены по сравнению с рассмотренными выше.

Химические методы иммобилизации ферментов. Иммобилизация ферментов путем образования новых ковалентных связей между ферментом и носителем — наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов.

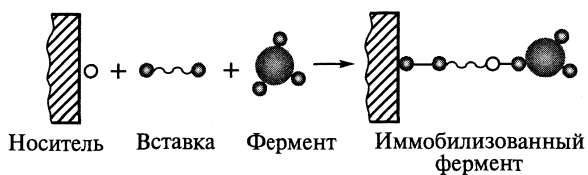


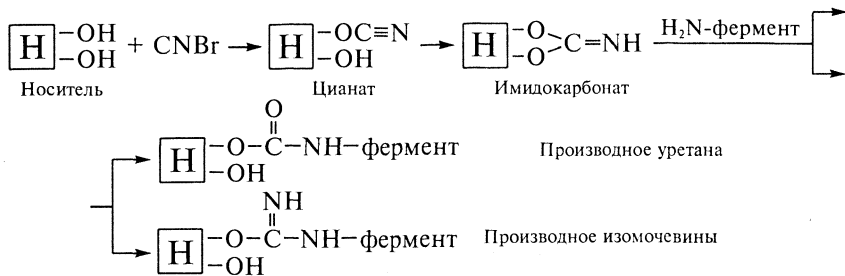
Рис. 4.5. Схема иммобилизации фермента химическим методом (по Н. В. Березину с сотр., 1987)

В отличие от физических методов этот способ иммобилизации обеспечивает прочную и необратимую связь фермента с носителем и часто сопровождается стабилизацией молекулы энзима. Однако расположение фермента относительно носителя на расстоянии одной ковалентной связи создает стерические трудности в осуществлении каталитического процесса. Фермент отделяют от носителя с помощью вставки (сшивка, спейсер), в роли которой чаще всего выступают бифункциональные и полифункциональные агенты (бромциан, гидразин, сульфурилхлорид, глутаровый диальдегид и др.). Например, для выведения галактозилтрансферазы из микроокружения носителя между ним и ферментом вставляют последовательность $-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-$. В этом случае структура иммобилизованного фермента включает носитель, вставку и фермент, соединенные между собой ковалентными связями (рис. 4.5).

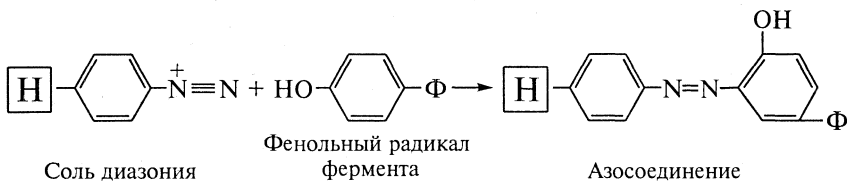
Принципиально важно, чтобы в иммобилизации фермента участвовали функциональные группы, не существенные для его каталитической функции. Так, гликопротеины обычно присоединяют к носителю через углеводную, а не через белковую часть молекулы фермента.

Число методических приемов, разработанных для осуществления ковалентной иммобилизации ферментов, исключительно велико. Все методы химической иммобилизации классифицируют в зависимости от природы реакционной группы носителя, вступающей во взаимодействие с молекулой фермента. Ниже представлен ряд примеров, иллюстрирующих некоторые способы химической иммобилизации ферментов.

Иммобилизация ферментов на носителях, обладающих гидроксo-группами. Наиболее распространенным методом образования ковалентной связи между ферментом и полисахаридным носителем или синтетическим диольным соединением является бромциановый метод, который был предложен Р. Аксеном, Дж. Поратом и С. Эрнбаком в 1967 г. При обработке носителя бромцианом возникают реакционноспособные цианаты и имидокарбонаты, которые при взаимодействии с нуклеофильными аминогруппами фермента образуют производные изомочевины и уретанов:

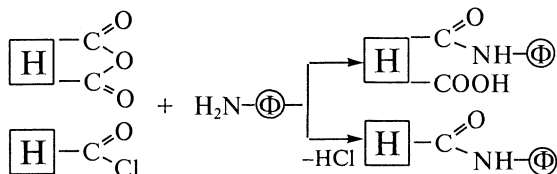


Иммобилизация ферментов на носителях, обладающих аминогруппами. Первичные аминогруппы носителя, связанные с ароматическим кольцом, предварительно превращают в соли диазония, которые затем подвергают разнообразным реакциям сочетания. В реакции сочетания вступают фенольные, имидазольные, аминные, гуанидиновые, тиольные группы белков. Так, в щелочной среде фенольные радикалы тирозина образуют прочные азосоединения, в составе которых белок связан с носителями:



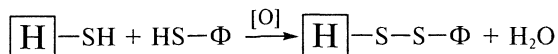
Существенно, что *p*-аминофенильные функции могут быть легко введены в разнообразные носители.

Иммобилизация на носителях, обладающих активированными производными карбоксильной группы. Наиболее часто для соединения аминогрупп белка с ацильными группировками носителя используют ангидриды, галогенангидриды, активированные эфиры и другие производные карбоновых кислот. Например,



Реакционная способность производных карбоновых кислот в реакциях ацилирования аминогрупп фермента уменьшается от галогенангидридов до эфиров.

Иммобилизация на носителях, обладающих сульфгидрильными группами. Сульфгидрильные группы носителя и фермента легко окисляются с образованием дисульфидных связей под действием кислорода воздуха:



Иммобилизация путем химического присоединения биокатализатора к носителю отличается высокой эффективностью и прочностью связи. Несмотря на это, методы ковалентной иммобилизации ферментов все еще малодоступны для промышленного использования в связи со сложностью и дороговизной их применения. Однако они остаются незаменимыми инструментами в практике проведения научных и лабораторных исследований по созданию энзимов с контролируемыми свойствами.

4.6.3. Иммобилизация клеток

Методы иммобилизации универсальны для всех видов иммобилизованных биокатализаторов — индивидуальных ферментов, клеток, субклеточных структур, комбинированных препаратов.

Наряду с иммобилизацией ферментов в последнее время все большее внимание уделяется иммобилизации клеток и субклеточных структур. Это объясняется тем, что при использовании иммобилизованных клеток отпадает необходимость выделения и очистки ферментных препаратов, применение кофакторов; создается возможность получения полиферментных систем, осуществляющих многостадийные непрерывно действующие процессы.

В промышленных процессах чаще используют покоящиеся клетки. Действительно, многие хозяйственно-ценные продукты синтезируются главным образом в стационарной фазе развития клеточных культур. Растущие клетки нарушают структуру носителя. Образующиеся при делении дочерние клетки, покидая носитель, загрязняют целевой продукт. Для подавления роста иммобилизованных клеток растений используют дефицит фитогормонов, а рост клетки бактерий тормозят добавлением антибиотиков.

Иммобилизованные клетки микроорганизмов применяют для биотрансформации органических соединений, разделения рацемических смесей, гидролиза ряда сложных эфиров, инверсии сахарозы, восстановления и гидроксирования стероидов. Иммобилизованные хроматофоры используют в лабораторных установках для синтеза АТФ, а пурпурные мембраны — для создания искусственных фотоэлектрических преобразователей — аналогов солнечных батарей. Разрабатывается реактор на основе иммобилизованных клеток дрожжей для получения этанола из мелассы, в котором дрожжи сохраняли бы способность к спиртовому брожению в течение 1800 ч. Из более чем 2000 известных в настоящее время ферментов иммобилизована и используется для целей инженерной энзимологии примерно десятая часть (преимущественно оксидоредуктазы, гидролазы и трансферазы).

Для осуществления химических процессов с помощью иммобилизованных ферментов применяют колоночные, трубчатые, пластинчатые и танкерные реакторы разного объема и производительности. Иммобилизованные ферментные системы функционируют в биореакторе в виде неподвижной фазы, через которую протекает среда с субстратом, подлежащим химическому превращению (гетерогенный катализ). В таких реакторах наряду с непрерывным режимом используется и периодический. Для эффективного перемешивания и газообмена биореактор снабжают мешалкой. Повреждающее действие мешалки на биокатализатор устраняют, закрепляя определенным образом его гранулы. Например, в биореакторе «корзиночного» типа мешалка вращается в полом цилиндра из сетчатой структуры (корзина), в ячейках которой закреплен иммобилизованный фермент. Во внутреннем объеме трубчатых реакторов рыхло расположены полые волокна, заполненные биокатализатором. Степень превращения субстрата в продукт (например, fumarata аммония в аспарат) в таких реакторах достигает 90 %.

4.6.4. Промышленные процессы с использованием иммобилизованных ферментов и клеток

Сочетание уникальных каталитических свойств энзимов с преимуществами иммобилизованных ферментов как гетерогенных катализаторов позволило создать новые промышленные технологические процессы. Следует отметить, что все они относятся к производству пищевых продуктов и лекарственных препаратов.

В настоящее время в мире разработаны следующие крупномасштабные производства с использованием иммобилизованных ферментов и клеток:

1. Получение глюкозофруктозных сиропов.
2. Получение оптически активных L-аминокислот из их рацемических смесей.
3. Синтез L-аспарагиновой кислоты из fumarata аммония.
4. Синтез L-аланина из L-аспарагиновой кислоты.
5. Синтез L-яблочной кислоты из fumarовой кислоты.
6. Получение безлактозного молока.
7. Получение сахаров из молочной сыворотки.
8. Получение 6-аминопенициллановой кислоты.

В качестве примера рассмотрим некоторые из них.

Получение глюкозофруктозных сиропов. Фруктоза (фруктовый, плодовый или медовый сахар) — важнейший в физиологическом и технологическом отношении природный моносахарид. Превращаясь в печени и кишечнике млекопитающих в глюкозу, фруктоза включается в пластический и энергетический обмен клетки. Она в 2,5 раза слаще глюкозы и в 1,7 раза слаще тростникового сахара (сахароза), благодаря чему фруктоза — менее калорийный пище-

вой продукт по сравнению с последними. В отличие от глюкозы обмен фруктозы не контролируется инсулином, поэтому фруктовый сахар может потребляться больными диабетом. Фруктоза практически не вызывает кариеса зубов. В смеси с глюкозой фруктоза не кристаллизуется, поэтому широко используется для производства кондитерских изделий.

Объем производства сахарозы за последние 100 лет возрос в 15 раз и составляет, по разным оценкам, 30—40 кг в год на человека. Однако, несмотря на явные преимущества использования фруктозы, первая промышленная установка для превращения глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованной глюкоизомеразы была запущена лишь в 1973 г. (компания «Клинтон Корн», США). Исходным сырьем для этого процесса служит глюкоза, которую получают при гидролизе кукурузного или картофельного крахмала в присутствии минеральных кислот. Для конструирования промышленного биокатализатора глюкозоизомеразу сорбируют на пористых неорганических носителях или ионообменных смолах. Во многих случаях используют иммобилизованные клетки разного происхождения (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *S. olivaceus*, *S. venezuelae*). Коммерческие препараты иммобилизованной глюкоизомеразы имеют вид гранул, шариков, волокон или аморфной массы. Наиболее эффективными биореакторами для получения фруктозы признаны аппараты колонного типа высотой около 5 м, в которых по сравнению с реакторами перемешивания расход фермента минимален. Производительность такого реактора варьирует от 600 до 9000 кг глюкозофруктозного сиропа на 1 кг иммобилизованного фермента в зависимости от чистоты исходного сырья, а время полуинактивации катализатора — 20—50 суток. Возникающий в результате каталитического процесса глюкозофруктозный сироп содержит 42—45 % фруктозы, около 51 % глюкозы, небольшое количество олигосахаридов и по сладости соответствует инвертному сахару, получаемому при гидролизе сахарозы. Эти смеси постепенно вытесняют инвертированный сахар в промышленности и медицине. Глюкозофруктозную смесь широко применяют для производства тонизирующих напитков, консервированных фруктов, кондитерских изделий, хлеба, мороженого и пр. Экономические расчеты показали, что производство глюкозофруктозных сиропов с использованием иммобилизованной глюкоизомеразы в 1,5 раза выгоднее получения сахарозы из сахарной свеклы по традиционной технологии. Благодаря этому обстоятельству производство глюкозофруктозных сиропов в мире постоянно растет. Так, в 1980 г. 10 % потребляемого населением Японии сахара заменено на глюкозофруктозную смесь. В США эта доля к началу нового столетия достигла 40 %.

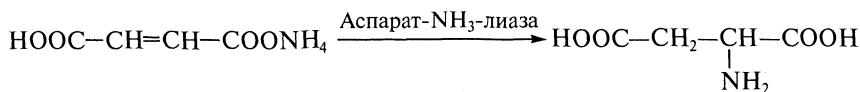
Получение L-аминокислот из их рацемических смесей. Наряду с микробиологическими способами важное значение имеют

химические методы промышленного получения природных аминокислот, в том числе незаменимых. Однако в результате химических реакций, используемых для синтеза аминокислот, содержащих асимметрические атомы углерода, с одинаковой скоростью образуются как D-, так и L-стереоизомеры, т. е. всегда возникает рацемическая смесь. Между тем в живых клетках обмену подвергаются лишь L-аминокислоты. Разделение рацемических смесей на составляющие их оптические изомеры (представляющее труднейшую задачу) явилось первым промышленным процессом с использованием иммобилизованных ферментов. Этот процесс был осуществлен в Японии в 1969 г. (компания «Танабе Сейяку») с помощью аминокацилазы, иммобилизованной на ДЕАЕ-целлюлозе. В качестве исходных соединений в данном превращении используют N-ацилированные производные D-,L-аминокислот, получаемые с помощью химического синтеза. Вследствие своей стереоспецифичности аминокацилаза гидролизует лишь N-ацил-L-стереоизомер, отщепляя от него ацильный радикал, в результате чего растворимость образующейся L-аминокислоты резко возрастает и ее легко можно отделить от своего антипода физико-химическими методами. При нагревании оставшаяся N-ацил-D-аминокислота рацемизируется, т. е. превращается в исходную смесь, которая вновь подвергается воздействию фермента:



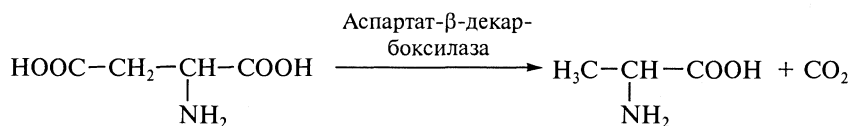
Аминокацилаза строго специфична к структуре только ацильной части субстрата, поэтому одна и та же установка с иммобилизованным ферментом используется для получения различных аминокислот, в том числе L-валина, L-метионина, L-фенилаланина и L-триптофана. Время полуинактивации иммобилизованного энзима составляет 65 суток; на японских предприятиях он используется без замены более 8 лет и обеспечивает снижение стоимости производства аминокислот на 40 % по сравнению с технологией, где применяются свободные молекулы фермента.

Получение L-аспарагиновой кислоты. Аспарагиновая кислота широко употребляется в качестве пищевой добавки (подсластитель и подкислитель). Первая в мире промышленная установка для синтеза L-аспарагиновой кислоты из получаемого химическим путем фумарата аммония была запущена в 1973 г. в Японии (фирма «Танабе Сейяку»); в ней использованы иммобилизованные в полиакриламидном геле клетки кишечной палочки *E. coli*, содержащие аспартат-аммиак-лиазу:



Полиакриламидный гель с иммобилизованными микробными клетками формируют в виде кубиков размером 2—3 мм, которыми заполняют колонку объемом 1 м³. Через колонку пропускают раствор фумарата аммония. При подкислении выходящего из колонки элюата до pH 2,8 и охлаждении до 15 °С из него выкристаллизовывается аспарагиновая кислота в виде препарата 100 %-й чистоты. Процесс получения аспартата полностью автоматизирован и осуществляется в непрерывном режиме. Производительность процесса — 1700 кг чистой аспарагиновой кислоты в сутки на реактор. Иммобилизованные клетки кишечной палочки сохраняют активность фермента на 80 % в течение 120 дней и на 50 % в течение 600 дней работы реактора, в то время как свободные клетки — всего на протяжении 10 дней с уровнем активности 25 % от исходной. В Армении был налажен промышленный процесс получения аспартата особой степени чистоты с использованием иммобилизованной аспартат-аммиак-лиазы на базе научных разработок химфака МГУ им. М. В. Ломоносова (1974).

Получение L-аланина. В настоящее время основной промышленный способ получения L-аланина — ферментативное декарбокислирование L-аспарагиновой кислоты:



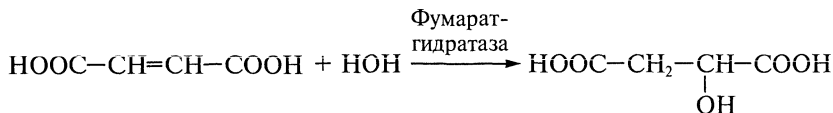
Процесс превращения L-аспартата в L-аланин катализируется аспартат-β-декарбоксилазой ряда микроорганизмов (*Pseudomonas dacunhae*, *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter pestifier*), иммобилизованных в полиакриламидном геле, каррагинане или полиуретане. Установка, разработанная японской фирмой «Танабе Сейяку», производит этим способом 10 т аланина в месяц. Усовершенствование процесса связано с использованием в качестве сырья фумарата аммония. В данном случае процесс получения L-аланина становится двухстадийным и реализуется в двух последовательно расположенных реакционных колонках. На первом этапе фумарат аммония превращается в L-аспарагиновую кислоту, которая без выделения из реакционной среды на втором этапе претерпевает β-декарбокислирование с образованием аланина.

С помощью иммобилизованных клеток *Serratia marcescens* из треонина и глюкозы синтезируют L-изолейцин, а с помощью иммобилизованных клеток *Corynebacterium glutamicum* — L-глутаминовую кислоту из L-глюкозы; L-триптофан — из индола; L-орнитин — из L-аргинина.

Таким образом, расширение производства аминокислот стало возможным благодаря изменению технологии получения промышленных биокатализаторов и снижению затрат при их производстве.

Получение L-яблочной кислоты. Яблочная кислота — заменитель лимонной в продуктах питания и лекарственных препаратах.

Яблочную кислоту получают, используя иммобилизованные в полиакриламидном геле клетки, содержащие фумаратгидратазу. В присутствии этого фермента происходит присоединение воды по двойной связи в молекуле фумаровой кислоты:



В интактных клетках время полуинактивации фумаратгидратазы составляет 6 суток, в иммобилизованных в полиакриламидном геле — 55 суток, а в иммобилизованных в геле на основе каррагинана — 160 суток.

Получение 6-аминопенициллановой кислоты. 6-Аминопенициллановая кислота (6-АПК) — ценное исходное соединение для получения эффективных полусинтетических аналогов природных пенициллинов. Получение 6-АПК в промышленности путем химического гидролиза бензилпенициллина сопряжено с большими трудностями в связи с крайней неустойчивостью лактамного цикла его молекулы. Так, при щелочном гидролизе бензилпенициллина выход 6-АПК составляет всего 1 %. Продуктивность этого процесса удалось значительно повысить благодаря применению для гидролиза иммобилизованных бактериальных клеток, содержащих пенициллинамидазу.

Со второй половины 70-х годов XX в. вся 6-АПК, выпускаемая в России, и значительная часть 6-АПК, получаемая в Италии, производится с помощью иммобилизованных ферментов. На итальянских фирмах применяют фермент, иммобилизованный путем включения клеток *E. coli* в волокна триацетата целлюлозы, а на российских предприятиях используют бактериальные клетки, иммобилизованные в полиакриламидном геле. Переход к технологии, применяющей иммобилизованные бактериальные клетки, обеспечивает высокий выход 6-АПК, составляющий 80—85 %. По данным японских исследователей, время полуинактивации пенициллинамидазы, содержащейся в иммобилизованных в полиакриламидном геле бактериальных клетках, равно 42 суткам при 30 °С или 17 суткам при 40 °С.

Внедрение в промышленность биокаталитической технологии производства 6-АПК привело к существенному увеличению выпуска полусинтетических пенициллинов и снижению их себестоимости.

Изложенное далеко не исчерпывает перечень химических производств, базирующихся на использовании иммобилизованных ферментов и клеток. Список ряда биотехнологических процессов с применением иммобилизованных биокатализаторов, разработанных на уровне промышленных и опытных установок, представлен в табл. 4.3.

Таблица 4.3

Применение иммобилизованных ферментов

Название и шифр фермента	Источник фермента, способ иммобилизации	Биотехнологический процесс
Ацилнейтраминат-9-фосфатсинтаза (КФ 4.1.3.20)	Фермент <i>E. coli</i> . Включение в полиакриламидный гель	Синтез сиаловых кислот
β -Галактозидаза (КФ 3.2.1.23)	Фермент <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>K. lactis</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> . Включение в нити ацетата целлюлозы, полиакриламидный гель; адсорбция на фенолформальдегидной смоле, модифицированных керамике и кремнеземе	Гидролиз лактозы; получение безлактозного молока, глюкозы и галактозы
Глюкоамилаза (КФ 3.2.1.33)	Фермент <i>Aspergillus niger</i> . Хелатирование целлюлозой, стеклом, нейлоном; ковалентное связывание с клетками <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i>	Превращение олигосахаридов в глюкозу
3-Кетостероид- Δ' дегидрогеназа	Клетки <i>Mycobacterium globiformis</i> . Включение в полиакриламидный гель	Трансформация гидрокортизона в преднизолон
Пероксидаза (КФ 1.11.1.7)	Фермент из хрена, сополимеризованный с тирозином и включенный в гель альгината	Окисление фенола в сточных водах
Протеазы (КФ 3.4)	Ферменты <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. thermoproteolyticus</i> , <i>Mucor pusillus</i> . Включение в полиакриламидный гель, силикагель; хелатирование на поверхности стекла, микроорганизмов	Получение белковых гидролизатов
Пуллуназа (КФ 3.2.1.9)	Клетки <i>Aureobacidium pullulan</i> , <i>Arthrobacter</i> . Ковалентное связывание с биогелем	Расщепление α -1,6-гликозидных связей в амилопектине. Получение декстринов

Окончание табл. 4.3

Название и шифр фермента	Источник фермента, способ иммобилизации	Биотехнологический процесс
Термолизин (КФ 3.4.24.4)	Клетки <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> , включенные в полиуретан	Реакция конденсации L-аспарагиновой кислоты и метилового эфира L-фенилаланина с образованием пептидного заменителя сахарозы аспартама (в 100 раз слаще сахарозы)
Тирозинфеноллизаз (КФ 4.1.99.2)	Клетки <i>Erwinia herbicola</i> , <i>E. intermedia</i> . Включение в полиакриламидный гель	Синтез тирозина из ПВК, NH ₃ и фенола; L-серина и фенола. Синтез ДОФА из ПВК, NH ₃ и пирокатехина
Триптофаназа (КФ 4.1.99.1)	Клетки <i>E. coli</i> . Включение в нити триацетата целлюлозы и гель каррагинана	Получение триптофана из L-серина и индола

4.6.5. Ферментативная конверсия целлюлозы в глюкозу

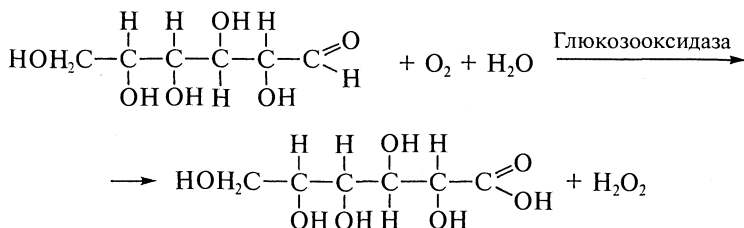
В связи со значительным истощением углеводородного сырья насущной проблемой для дальнейшего развития биотехнологии становится освоение новых сырьевых источников. По существу неисчерпаемый и одновременно возобновляемый источник сырья представляет собой растительная биомасса (многолетние растения, вторичные продукты и отходы их промышленной и сельскохозяйственной переработки), основным компонентом которой служит целлюлоза (клетчатка). Ежегодно на Земле создается около 100 млрд т целлюлозы.

Благодаря плотной упаковке линейно построенных полигликозидных цепей целлюлоза устойчива к действию большинства растворителей и химических агентов, в том числе сильных кислот. В природе существуют так называемые целлюлолитические организмы (бактерии, плесневые грибы) и некоторые виды насекомых, содержащие полиферментные комплексы целлюлаз, обеспечивающие гидролиз клетчатки до глюкозы. Целлюлазный комплекс ферментов включает эндо-1,4-β-глюканазу, экзоцеллобиогидролазы, целлюбиазы и экзо-1,4-β-глюкогидролазу, механизм действия которых на клетчатку оказался одинаковым для всех исследованных целлюлазных комплексов независимо от их происхождения. Попадая на целлюлозосодержащие материалы, микроорганизмы выделяют целлюлазы, которые, сорбируясь (иммобили-

зуюсь) на субстрате, постепенно расщепляют его до глюкозы. В последние годы разработаны технологические схемы для непрерывного ферментативного гидролиза целлюлозы на уровне опытных установок. Процесс протекает в противоточных реакторах колонного типа, плотно заполненных целлюлозой. Расчеты показывают, что перевод процесса на промышленный уровень обеспечивает получение 24 т глюкозы в сутки. Дальнейшее совершенствование эффективности метода конверсии целлюлозосодержащего сырья в глюкозу и далее в этанол и углеводороды позволит создать альтернативные пути получения ценных моносахаридов и жидкого топлива из возобновляемого сырья, а также решить еще одну важную проблему — утилизацию экологически опасных отходов производства.

4.6.6. Биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов

Высокая эффективность биологических катализаторов и специфичность их действия делают ферменты идеальными реагентами для аналитической химии. Благодаря этим особенностям с помощью ферментов обнаруживаются вещества при предельно низкой концентрации в присутствии множества других соединений. К настоящему времени созданы искусственные аналитические системы различных конструкций (биосенсоры, датчики, ферментные электроды, проточные анализаторы), содержащие иммобилизованные ферменты и клетки и предназначенные для автоматического детектирования продуктов энзиматического превращения. Например, если использовать иммобилизованную глюкозооксидазу, то концентрацию окисляемой кислородом глюкозы определяют, регистрируя количество выделившегося в ходе реакции пероксида водорода:



В зависимости от концентрации анализируемых веществ выбирают тот или иной способ их детекции. Так, количественное содержание пероксида водорода (ммоль/л) можно определить одним из нижеследующих методов:

Полярографический (накопление H ₂ O ₂)	0,1
Колориметрический (H ₂ O ₂ + O-дианизидин	
дин $\xrightarrow{\text{пероксидаза}}$ окрашенный продукт)	0,1 · 10 ⁻³

Люминесцентный ($H_2O_2 + \text{люминол} \longrightarrow$
 \longrightarrow хемилюминесцентный продукт, $\lambda_{\text{макс}} = 425 \text{ нм}$) $0,1 \cdot 10^{-6}$

Начаты разработки новых поколений биодатчиков на базе аффинных взаимодействий (биосродства) типа фермент-ингибитор, антитело-антиген, агонист (антагонист)-клеточный рецептор, а также на основе полупроводниковых структур и мезоэлектрического эффекта. Последние два биодатчика дают возможность создавать сенсоры, чувствительные к газам, что имеет существенное значение для создания роботов, реагирующих на изменения внешних воздействий.

Технологические варианты реакторов с иммобилизованными ферментами весьма разнообразны — колонки, трубки, полые волокна и пр. С их помощью на практике определяют концентрацию широкого спектра соединений — глюкозы, аминокислот, мочевины, пенициллина, АТФ, НАДН, ФМН, стероидов, триглицеридов, желчных кислот и многих других (J. Aylott, R. Korelman, 2000). Так, американскими исследователями сконструирован микродатчик на основе глюкозооксидазы и рутениевого красителя, иммобилизованных в полиакриламидной матрице с использованием субмикронных оптических волокон. Микробиосенсор, не вызывая повреждений, может быть введен в клетку и даже в отдельные ее компартменты для измерения содержания в них глюкозы и кислорода. Предложены датчики на базе иммунодетекции для проведения экспресс-анализов на присутствие производных диоксиана (Nomura et. al., 2000) и оценки содержания биогенных аминов (с помощью моноаминоксидазы) в пищевых продуктах в связи с процессами их старения. Для определения мочевины ферментным электродом требуется всего 30 с.

Биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов помогают выполнять десятки быстрых и точных анализов при диагностике заболеваний, контролировать содержание вредных веществ (инсектицидов, пестицидов, удобрений) в пищевых продуктах и в воздухе. Биосенсоры нашли применение в решении аналитических задач в химической и микробиологической промышленности, а также в научных исследованиях.

4.6.7. Иммобилизованные ферменты в медицине

Иммобилизованные ферменты имеют огромное значение для медицины. В частности, большой рынок сбыта занимают тромболитические ферменты, предназначенные для борьбы с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Так, в отечественную клиническую практику внедрен препарат «стрептодеказа», содержащий стрептокиназу — активатор предшественника протеиназы плазмينا, предотвращающий образование тромба в кровеносной системе.

Ферменты, разрушающие некоторые незаменимые аминокислоты (например, аспарагиназа), используют для борьбы со злокачественным ростом опухолей. Протеолитические ферменты (трипсин, химо tripsин, субтилизин, коллагеназа), иммобилизованные на волокнистых материалах (целлюлоза, полиамидные волокна, декстран и др.), применяют для эффективного лечения ран, язв, ожогов, абсцессов, а их белковые ингибиторы — в заместительной терапии для лечения эмфиземы и панкреатитов.

Исключительно важны с практической точки зрения работы, посвященные направленному транспорту лекарственных веществ. В этом отношении особенно выгодны инкапсулированные ферменты типа искусственной клетки. Так, микрокапсулы, стенки которых представлены оболочкой эритроцита («тень эритроцита»), а их содержимое заполнено ферментом аспарагиназой, переносятся кровотоком к зонам скопления аспарагина и поэтому применяются для лечения аспарагинзависимых опухолей, в частности саркомы. Колонки, заполненные микрокапсулами с ферментом, используют для диализа в аппарате «искусственная почка», которая работает в 100 раз эффективнее обычного аппарата.

Таким образом, использование иммобилизованных ферментов во многих жизненно важных отраслях народного хозяйства становится все более массовым. Выгодное сочетание избирательности и эффективности с долговечностью и стабильностью иммобилизованных ферментов в корне меняет химическое производство, способы добывания сырья, способствует созданию новых биотехнологических процессов и методов терапии, совершенствует медицинскую диагностику, анализ, органический синтез и оказывает огромное влияние на образ жизни человека.