Лесова Ж.Т.

ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебное пособие

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

АЛМАТИНСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Лесова Ж.Т.

ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебное пособие

Курс лекций для магистрантов специальности «Биотехнология»

АЛМАТЫ 2011

УДК 577 (075.8)

ББК 30.16я73
Л50

Рекомендовано и одобрено к печати Учебно-методическим советом АТУ

Рецензенты:

Изтаев А.И. – академик НАН РК
Таева А.М. . –к.т.н., профессор АТУ

Лесова Ж.Т.
Промышленная биотехнология. Курс лекций для магистрантов специальности «Биотехнология», Алматы, 2011, 109 стр.

ISBN 978-601-263-112-8

Данный курс лекций по дисциплине «Промышленная биотехнология» предназначен для магистрантов, обучающихся по специальности «Биотехнология» для изучения теоретических основ и практического применения биотехнологии в промышленности.

В данном пособии учебный материал изложен с учетом требований подготовки магистрантов технологических ВУЗов пищевого профиля и государственного образовательного стандарта.

УДК 577 (075.8)
ББК 30.16я73
Л50

ISBN 978-601-263-112-8

©Л50 Лесова Ж.Т., 2011

СОДЕРЖАНИЕ

Введение……4
Лекция 1. Использование биотехнологии в пищевой промышленности…6
Лекция 2. Биотехнология молочных продуктов……...10
Лекция 3. Производство биомассы……15
Лекция 4. Производство спиртов и полиолов…… 18
Лекция 5. Производство вторичных метаболитов……21
Лекция 6. Биотрансформация……26
Лекция 7. Производство ферментов, использование ферментных
препаратов в пищевой промышленности……...30
Лекция 8. Производство аминокислот, органических кислот, витаминов.51
Лекция 9. Биоконверсия лигноцеллюлозных объектов……...55
Лекция 10. Использование грибов в пищевой биотехнологии……...64
Лекция 11. Простейшие в биотехнологии……77
Лекция 12. Использование водорослей в биотехнологии……82
Лекция 13. Растения в промышленной биотехнологии……92
Лекция 14. Основные принципы промышленной организации……..
биотехнологических процессов……..98
Лекция 15. Этапы биотехнологического производства……..103
Список использованной литературы…… 109

Введение

В настоящее время условно можно выделить следующие основные направления биотехнологии: биотехнология пищевых продуктов, препаратов для сельского хозяйства, препаратов и продуктов для промышленного и бытового использования, лекарственных препаратов, средств диагностики и реактивов, биотехнология также включает выщелачивание и концентрирование металлов, защиту окружающей среды от загрязнения, деградацию токсических отходов и увеличение добычи нефти.

Люди выступали в роли биотехнологов тысячи лет: пекли хлеб, варили пиво, делали сыр, другие молочнокислые продукты, используя различные микроорганизмы и даже не подозревая об их существовании. Собственно сам термин "биотехнология" появился в нашем языке не так давно, вместо него употреблялись слова "промышленная микробиология", "техническая биохимия" и др. Вероятно, древнейшим биотехнологическим процессом было брожение. В пользу этого свидетельствует описание процесса приготовления пива, обнаруженное в 1981 г. при раскопках Вавилона на дощечке, которая датируется примерно 6-м тысячелетием до н. э. В 3-м тысячелетии до н. э. шумеры изготовляли до двух десятков видов пива. Не менее древними биотехнологическими процессами являются виноделие, хлебопечение и получение молочнокислых продуктов. В традиционном, классическом, понимании биотехнология — это наука о методах и технологиях производства различных веществ и продуктов с использованием природных биологических объектов и процессов.

Биотехнология - одно из ключевых направлений качественного технологического развития в целом ряде отраслей экономики. Потенциал возможностей и спектр применения биотехнологии превратил отрасль наряду с нанотехнологиями в ведущий фактор развития экономик отдельных государств и мирового сообщества в целом.

В широком смысле биотехнология представляет собой пограничную между биологией и техникой научную дисциплину и сферу практики, изучающую пути и методы изменения окружающей человека природной среды в соответствии с его потребностями.

В узком смысле биотехнология - совокупность методов и приемов получения полезных для человека продуктов и явлений с помощью биологических агентов. В состав биотехнологии входят генная, клеточная и экологическая инженерии.

Поскольку биотехнология используется в различных отраслях промышленности и затрагивает многие сферы жизни человека, в мире принята следующая "цветовая" классификация биотехнологии:

"красная" биотехнология – биотехнология, связанная с обеспечением здоровья человека и потенциальной коррекцией его генома, а также с производством биофармацевтических препаратов (протеинов, ферментов, антител);

"зеленая" биотехнология - направлена на разработку и создание генетически модифицированных (ГМ) растений, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам, определяет современные методы ведения сельского и лесного хозяйства;

"белая" - промышленная биотехнология, объединяющая производство биотоплива, биотехнологии в пищевой, химической и нефтеперерабатывающей промышленности;

"серая" - связана с природоохранной деятельностью, биоремедиацией;

"синяя" биотехнология – связана с использованием морских организмов и сырьевых ресурсов.

Годовой оборот мировой биоиндустрии составляет в настоящее время более 160 млрд. долларов США.

Крупнейшим биотехнологическим рынком в мире являются США, где создается половина мирового объема биотехнологической продукции. Вторым по размерам рынком является Азиатско-Тихоокеанский регион, где наиболее динамично развивают биотехнологии Австралия, Китай, Индия и Япония. Замыкает тройку лидеров Европа.

В соответствии с принятой классификацией биотехнологических направлений более половины мирового производства относится к продукции "красной" биотехнологии (биофармацевтические препараты и биомедицина), (6-%), 12% - к "зеленой" (агропищевая продукция), остальное – биоматериалы промышленного назначения ("белая" биотехнология).

В данном учебном пособии рассмотрены основные направления промышленной биотехнологии.

Лекция 1. Использование биотехнологии в пищевой промышленности

План лекции

1. Роль микроорганизмов в синтезе белка.
2. Незаменимые аминокислоты.
3. Использование аминокислот в пищевой промышленности.

Последние статистические данные ООН по вопросам продовольствия и сельского хозяйства свидетельствуют о том, что проблема обеспечения населения нашей планеты продуктами питания внушает серьезные опасения. По этим данным, более половины населения Земли не обеспечено достаточным количеством продуктов питания, примерно 500 млн. людей голодают, а около 2 млрд. питаются недостаточно или неправильно. К концу XX в. население нашей планеты с учетом контроля рождаемости составило 7,5 млрд. человек. Следовательно, тяжелое уже сейчас положение с продуктами питания может принять в недалеком будущем для некоторых народов угрожающие масштабы.

Пища должна быть разнообразной и содержать белки, жиры, углеводы и витамины. Источники энергии — жиры и углеводы в определенных пределах взаимозаменяемы, причем их можно заменить и белками, но белки нельзя заменить ничем. Проблема питания людей, в конечном счете, заключается в дефиците белка. Там, где сегодня люди голодают, не хватает, прежде всего, белка. Установлено, что ежегодный дефицит белка в мире, по самым скромным подсчетам, оценивается в 15 млн. т.

Наибольшую популярность как источники белка приобрели семена масличных культур — сои, семян подсолнечника, арахиса и других, которые содержат до 30 процентов высококачественного белка. По содержанию некоторых незаменимых аминокислот он приближается к белку рыбы и куриных яиц и перекрывает белок пшеницы. Белок из сои широко уже используется в США, Англии и других странах как ценный пищевой материал.

Эффективным источником белка могут служить водоросли. Увеличить количество пищевого белка можно и за счет микробиологического синтеза, который в последние годы привлекает к себе особое внимание. Микроорганизмы чрезвычайно богаты белком — он составляет 70—80 процентов их веса. Скорость его синтеза огромна.

Микроорганизмы примерно в 10—100 тысяч раз быстрее синтезируют белок, чем животные. Здесь уместно привести классический пример: 400-килограммовая корова производит в день 400 граммов белка, а 400 килограммов бактерий — 40 тысяч тонн. Естественно, на получение 1 кг белка микробиологическим синтезом при соответствующей промышленной технологии потребуется средств меньше, чем на получение 1 кг белка животного. Да к тому же технологический процесс куда менее трудоемок, чем сельскохозяйственное производство, не говоря уже об исключении

сезонных влияний погоды, как заморозков, дождей, суховеев, засух, повышенной засоленности почв, освещенности, солнечной радиации и т. д.

Применяя обычные технологические линии по производству синтетических волокон, можно получать из искусственных белков длинные нити, которые после пропитки их формообразующимн веществами, придания им соответствующего вкуса, цвета и запаха могут имитировать любой белковый продукт. Таким способом уже получены искусственное мясо (говядина, свинина, различные виды птиц), молоко, сыры и другие продукты. Они уже прошли широкую биологическую апробацию на животных и людях и вышли из лабораторий на прилавки магазинов США, Англии, Индии, стран Азии и Африки. Только в одной Англии их производство достигает примерно 1500 тонн в год. Интересно, что белковую часть школьных обедов в США уже разрешено на 30 процентов заменять искусственным мясом, созданным на основе соевого белка.

Используемое в питании больных Ричмондского госпиталя (США) искусственное мясо получило высокую оценку главного диетолога. Правда, когда больным давали антрекот из искусственного мяса, они жаловались на его тестоватую структуру, хотя и не знали и даже не догадывались о том, что получали не естественный продукт. А когда мясо подавалось в виде мелко нарезанных кусочков, нареканий не было. Обслуживающий персонал также употреблял искусственное мясо, не догадываясь о подделке. Они воспринимали его как натуральную говядину. Врачи госпиталя отмечали также положительное влияние рациона на здоровье пациентов и особенно больных атеросклерозом. В состав такого мяса обязательно включают специально обработанный искусственный белок, небольшое количество яичного альбумина, жиры, витамины, минеральные соли, природные красители, ароматизаторы и прочее, что дает возможность «лепить» изделие с заданными свойствами, учитывая при этом физиологические особенности организма, для которого продукт предназначен. Это особенно важно в диете детей и людей пожилого возраста, больных и выздоравливающих, когда необходимо лимитировать питание по целому ряду пищевых компонентов, что весьма трудно сделать, используя традиционные продукты. Такое мясо можно резать, замораживать, консервировать, сушить или прямо использовать для приготовления различных блюд.

Как известно, аминокислоты - органические соединения состоящие из углерода, водорода, кислорода, азота и др. Все живые организмы для построения белковых (мышцы и другие ткани тела, ферменты, гормоны) молекул используют 20 аминокислот, которые делятся на незаменимые и заменимые.

Незаменимые аминокислоты не могут быть синтезированы организмом и должны быть получены из внешней среды с пищей.

Заменимые — могут синтезироваться из незаменимых и из друг друга. Аминокислоты не запасаются организмом и должны поступать постоянно. В противном случае организм расходует собственные мышцы для нужд

жизнедеятельности. Чем больший спектр аминокислот (особенно незаменимых) содержится в продукте, тем выше его биологическая ценность.

К незаменимым аминокислотам относятся: изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, валин, фенилаланин.

Аминокислоты — это не только питательные вещества, но также ароматические и вкусовые агенты, и потому они широко используются в пищевой промышленности.

Как питательную добавку в пищу чаще всего вносят лизин и метионин. Глутамат натрия и глицин употребляют как ароматические вещества для усиления и улучшения вкуса пищи. У глицина освежающий, сладкий вкус. Его вводят в сладкие напитки, и кроме того, он проявляет там бактериостатическое действие. Цистеин предотвращает подгорание пищи, улучшает пекарские процессы и качество хлеба. Благодаря некоторым бактериям удается получать около 100 г/л глутаминовой аминокислоты.

Ежегодно в мире производят микробиологическим способом 270 000 т этой аминокислоты, основная часть которой идет в пищевую промышленность. По объему продукции второе место после глутаминовой кислоты занимает лизин — 180 000 т в год. Другие аминокислоты производят в гораздо меньших количествах.

Рисунок 1 – Пищевые добавки с содержанием аминокислот

В организме человека без перерывов идут процессы роста новых клеток. Различные органы и клетки каждое мгновение вырабатывают белковые ферменты и гормоны. А так как наш организм построен из аминокислот, важно обеспечивать организм аминокислотами. Особенно при повышенных силовых нагрузках. Этого можно добиться с помощью дозированного, регулярного (каждые 3-4 часа) приема аминокислот, либо с помощью долго усваивающихся протеинов, на основе белка казеина, например Protein 80. У человеческого организма есть такие моменты в течение дня, когда ему требуется больше аминокислот. Это утренние часы, потому что за ночь организм усвоил все свободные аминокислоты. Также очень высока потребность в аминокислотах после интенсивной силовой тренировки и во время нее. Силовые тренировки «разрушают» мышцы, и им

требуется строительный материал (аминокислоты) для восстановления разрушений.

Аминокислоты в большом количестве применяют как добавку к растительным кормам, которые дефицитны по метионину, треонину, триптофану и особенно по лизину. Если в животных белках содержится 7—9 % лизина, то в белках пшеницы — только около 3 %. Внесение в корма лизина до содержания 0,3 % позволяет сократить их расход больше чем на 20 %. За последние 8 лет количество аминокислот, добавляемых в корма, выросло в 14 раз. Во многих странах метионин добавляют к соевой муке — белковой добавке кормов.

Главная область практического применения аминокислот — обогащение кормов. Около 66% общего количества аминокислот, получаемых в промышленности, используют в кормах, 31 % — в пище и 4 % — в медицине, косметике и как химические реактивы.

На основе аминокислот готовят искусственный подсластитель — метиловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина, который в 150 раз слаще, чем глюкоза.

Вопросы для самоконтроля

1. Как используется биотехнология в промышленности?
2. Каково значение белка в питании человека?
3. Как используются аминокислоты в пищевой промышленности?

Лекция 2. Биотехнология молочных продуктов

План

1. Белки молока.
3 Минеральный состав молока.
3. Технология переработка молока.
4. Биологические принципы обработки молочного сырья.

Спектр продуктов питания, получаемых при помощи микроорганизмов, обширен. Это продукты, получаемые в результате брожения - хлеб, сыр, вино, пиво, творог и так далее. До недавнего времени биотехнология использовалась в пищевой промышленности с целью усовершенствования освоенных процессов и более умелого использования микроорганизмов, но будущее здесь принадлежит генетическим исследованиям по созданию более продуктивных штаммов для конкретных нужд, внедрению новых методов в технологии брожения.

Получение молочных продуктов в пищевой промышленности построено на процессах ферментации. Основой биотехнологии молочных продуктов является молоко. Молоко (секрет молочных желез) - уникальная естественная питательная среда. Она содержит 82-88% воды и 12-18% сухого остатка. В состав сухого молочного остатка входят белки (3,0-3,2%), жиры (3,3-6,0%), углеводы (молочный сахар лактоза - 4,7%), соли (0,9-1%), минорные компоненты (0,01%): ферменты, иммуноглобулины, лизоцим и т.д.

Рисунок 2 – Виды молочных продуктов

Молочные жиры очень разнообразны по своему составу. Основные белки молока - альбумин, казеин. Благодаря такому составу молоко представляет собой прекрасный субстрат для развития микроорганизмов. В сквашивании молока обычно принимают участие стрептококки и молочнокислые бактерии. Путем использования реакций, которые сопутствуют главному процессу сбраживания лактозы получают и другие продукты переработки молока: сметану, йогурт, сыр и т.д. Свойства конечного продукта зависят от характера и интенсивности реакций ферментации. Те реакции, которые сопутствуют образованию молочной кислоты, определяют обычно особые свойства продуктов. Например, вторичные реакции ферментации, идущие при созревании сыров, определяют вкус отдельных их сортов. В таких реакциях принимают участие пептиды, аминокислоты и жирные кислоты, находящиеся в молоке.

Все технологические процессы производства продуктов из молока делятся на две части: 1) первичная переработка - уничтожение побочной микрофлоры; 2) вторичная переработка. Первичная переработка молока включает в себя несколько этапов. Сначала молоко очищается от механических примесей и охлаждается, чтобы замедлить развитие естественной микрофлоры. Затем молоко сепарируется (при производстве сливок) или гомогенизируется. После этого проводят пастеризацию молока, при этом температура поднимается до 80°C, и оно закачивается в танки или ферментеры. Вторичная переработка молока может идти двумя путями: с использованием микроорганизмов и с использованием ферментов. С использованием микроорганизмов выпускают кефир, сметану, творог, простокваши, казеин, сыры, биофруктолакт, биолакт, с использованием ферментов - пищевой гидролизат казеина, сухую молочную смесь для коктейлей и т.д.

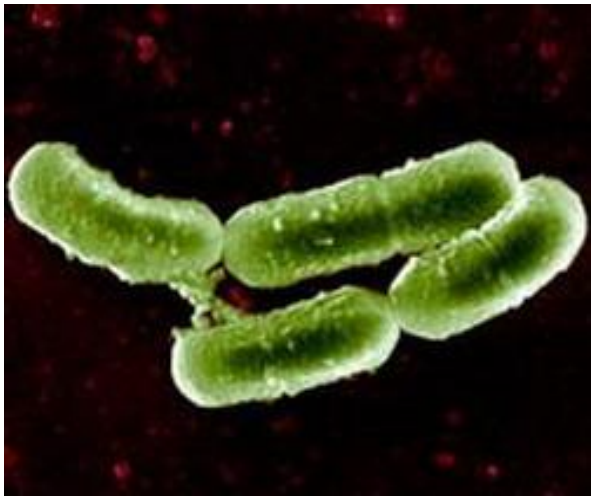
Рисунок 3- Продукция переработки молока

При внесении микроорганизмов в молоко лактоза гидролизуется до глюкозы и галактозы, глюкоза превращается в молочную кислоту, кислотность молока повышается, и при pH 4-6 казеин коагулирует.

Молочнокислое брожение бывает гомоферментативным и гетероферментативным. При гомоферментативном брожении основным продуктом является молочная кислота. При гетероферментативном брожении образуются диацетил (придающий вкус сливочному маслу), спирты, эфиры, летучие жирные кислоты. Одновременно идут протеолитические и липолитические процессы, что делает белки молока более доступными и обогащает дополнительными вкусовыми веществами.

Для процессов ферментации молока используются чистые культуры микроорганизмов, называемые закваскамии.

Лактобактерии



А

Б

Рисунок 4 – Виды молочнокислых бактерий:

А- Лактобактерии (лат. Lactobacillus) — род грамположительных анаэробных неспорообразующих молочнокислых бактерий.

Б- Лактобактерии ацидофильные (лат. Lactobacillus acidophilus) — вид грамположительных анаэробных неспорообразующих

Исключение составляют закваски для кефиров, которые представляют естественный симбиоз нескольких видов молочнокислых грибков и молочнокислых бактерий. Этот симбиоз в лабораторных условиях воспроизвести не удалось, поэтому поддерживается культура, выделенная из природных источников. При подборе культур для заквасок придерживаются следующих требований:

- состав заквасок зависит от конечного продукта (например, для получения ацидофилина используется ацидофильная палочка, для производства простокваши - молочнокислые стрептококки);

- штаммы должны отвечать определенным вкусовым требованиям;
- продукты должны иметь соответствующую консистенцию, от ломкой крупитчатой до вязкой, сметанообразной;
- определенная активность кислотообразования;
- фагорезистентность штаммов (устойчивость к бактериофагам);
- способность к синерезису (свойству сгустка отдавать влагу);
- образование ароматических веществ;
- сочетаемость штаммов (без антагонизма между культурами);
- наличие антибиотических свойств, т.е. бактериостатическое действие по отношению к патогенным микроорганизмам;
- устойчивость к высушиванию.

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

Производство сыра, или сыроделие (сыроварение) - один из древнейших процессов, основанных на ферментации. Сыры бывают самые разнообразные - от мягких до твердых. Мягкие сыры содержат много воды, 50-60%, а твердые - мало, 13-34%. На первом этапе идет подготовка молока (первичная обработка). На втором - готовится культура молочнокислых бактерий. Микроорганизмы подбираются в определенной пропорции, обеспечивающей наилучшее качество. Набор бактерий также зависит от температуры термообработки. Третья стадия - стадия ферментации, - в сыроварении в некоторых случаях происходит в 2 этапа, до и после стадии выделения. Сначала молоко инокулируют определенными штаммами микроорганизмов, приводящими к образованию молочной кислоты, а также добавляют сычужный фермент реннин. Реннин ускоряет превращение жидкого молока в сгусток (створаживание) в несколько раз. Эта реакция активируется молочной кислотой, вырабатываемой бактериями. Функции реннина могут выполнять и другие протеиназы, но реннин также участвует в процессах протеолиза, происходящих в сыре при созревании. После образования сгустка сыворотку отделяют, а полученную творожистую массу подвергают термообработке и прессуют в формах. Далее сгусток солят и ставят на созревание. Иногда полученная масса происходит дополнительную обработку, которая заключается в следующем: заражение спорами голубых плесневых грибов при производстве рокфора; нанесение на поверхность спор белых плесневых грибов при производстве камамбера и бри; нанесение бактерий, необходимых для созревания некоторых сыров. Некоторые сыры после выделения должны подвергнуться дальнейшей ферментации (стадия созревания). Микроорганизмы и ферменты в ходе этого процесса гидролизуют жиры, белки и некоторые другие вещества молодого сыра. В результате их распада образуются вещества, придающие сырам характерный вкус.

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

Вопросы для самоконтроля

1. Каков состав молока и его значение в питании человека?
2. Как используется процесс ферментации при получении молочных продуктов?
3. Каковы основные этапы технологического процесса производства получения молочных продуктов?

Лекция 3 . Производство биомассы

План

1. Основные типы биопроцессов.
2. Виды производственных дрожжей.
3. Доступное, дешевое сырье кормовых дрожжей.

В настоящее время существуют следующие основные типы биопроцессов:

- производство биомассы (например, белок одноклеточных);
- клеточных компонентов (ферменты, нуклеиновые кислоты и т.д.)
- метаболитов (химические продукты метаболической активности), включая первичные метаболиты, такие как этанол, молочная кислота;
- вторичные метаболиты;
- односубстратные конверсии (превращение глюкозы во фруктозу);
- многосубстратные конверсии (обработка сточных вод, утилизация лигноцеллюлозных отходов).

Человек традиционно получает белки, жиры и углеводы (основные компоненты пищи) из животных и растительных источников. Уже сегодня эти источники не покрывают все увеличивающиеся потребности человечества. Выяснилось, что белки, и жиры микроорганизмов с успехом могут заменить белки и жиры традиционного происхождения. Преимущества микроорганизмов как продуцентов белка состоит в высоком содержании белка в биомассе и высокой скорости роста микроорганизмов.

Термин белок одноклеточных (БОК) был предложен в 1966 г. для обозначения биомассы различных микроорганизмов (бактерий, дрожжей, грибов и водорослей). Кроме высокого содержания белка микробная биомасса содержит также жиры, нуклеиновые кислоты, витамины и минеральные компоненты. Источниками получения пищевого белка могут стать также белковые изоляты из различных видов зеленой биомассы, в том числе и из табака.

Для получения БОК используют самые разнообразные субстраты, включая парафины нефти, метан, водород, метанол, этанол, уксусную кислоту, углекислый газ, молочную сыворотку, мелассу, крахмал и целлюлозосодержащие отходы промышленности и сельского хозяйства.

Для промышленного использования перспективными являются термофильные (растущие при высоких температурах до 50° С) микроорганизмы. Качество биомассы оценивается по высокому содержанию белка, низкому содержанию нуклеиновых кислот и отсутствию вредных веществ.

Как пример промышленного производства биомассы можно привести получение хлебопекарных дрожжей. В производстве хлебопекарных дрожжей используют специально отобранные расы *Saccharomyces cerevisiae*. При отборе культуры принимают во внимание способность дрожжей сбраживать тесто, они должны обладать хорошей подъемной силой и

ферментативной активностью, хорошо расти на мелассной среде в условиях глубинной ферментации и давать высокий выход биомассы. Клетки дрожжей должны легко отделяться от культуральной жидкости сепарированием или фильтрацией и хорошо сохраняться в прессованном виде. Подъемную силу дрожжей выражают в минутах, в течение которых определенное количество дрожжей развиваясь в определенном количестве теста, увеличивает его объем на предусмотренную стандартом величину. Для хороших дрожжей подъемная сила не должна превышать 75 мин.

Хлебопекарные дрожжи обладают и бродильной активностью, но чтобы направить использование углеводов субстрата только на образование биомассы, спиртовое брожение ограничивают всеми доступными средствами. Это достигается интенсивной аэрацией среды, а также поддержанием низкой концентрации сахара в ней (0,5—1,5%). При высокой концентрации сахаров наблюдается катаболитная репрессия ферментов цикла Кребса и переключение энергетического метаболизма преимущественно на брожение. Чтобы избежать этого, сахар в среду подают непрерывно с постоянной или возрастающей скоростью притока. Чтобы предотвратить чрезмерное размножение побочной микрофлоры, особенно так называемых диких дрожжей, удельная скорость роста которых выше, чем у хлебопекарных дрожжей, процесс ферментации обычно ведут по периодической схеме в течение 10—20 ч.

Товарные дрожжи обычно получают в три этапа. Сначала размножают первый посевной материал (задаточные дрожжи), затем вторые задаточные дрожжи и из них получают товарные дрожжи. Получение первых задаточных дрожжей идет без притока среды; длительность процесса 6—7 ч. На втором этапе стремятся полностью исключить спиртовое брожение, поэтому дрожжи выращивают в условиях очень интенсивной аэрации, лимитируя концентрацию сахара в среде, по проточному методу культивирования.

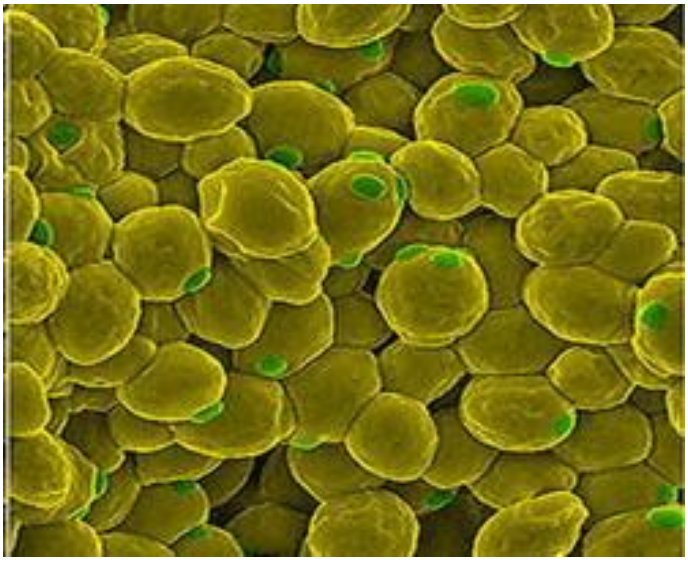


Рисунок 5- Дрожжи

Чаще всего длительность этого этапа 10 - 12 ч. Последний этап производства товарных дрожжей длится 10 - 24 ч. Биомассу дрожжей отделяют от культуральной жидкости, используя сепарирование, в три этапа, при двукратной промывке суспензии клеток водой для удаления остатков среды, бактерий и примесей.

Получают концентрат дрожжей, содержащий 80—120 г/л сухой биомассы. Его охлаждают до 8—10°С, фильтруют на вакуум-фильтрах или фильтр-прессах и получают дрожжевую пасту с 70—75%-ной влажностью. После кондиционирования пасты водой до стандартной (75%) влажности, дрожжи фасуют в плитки массой 50, 100, 500, 1000 г и упаковывают. Хранят прессованные дрожжи при температуре 0 - 4°С до 10 суток. Хлебопекарные дрожжи можно высушивать при температуре 30—40°С до влажности 8% и хранить до 6 мес.

Кормовые дрожжи получают с помощью Candida и Trichosporon. Выбирая культуру, надо следить, чтобы скорость ее роста в соответствующей среде была максимальной, в состав биомассы входило бы много белков, витаминов, чтобы культура в определенных условиях была вирулентной (могла конкурировать с сопутствующей микрофлорой). Кормовые дрожжи получают из доступных, дешевых, содержащих углерод видов сырья:

- углеводсодержащее сырье (гидролизаты древесных и сельскохозяйственных отходов, меласса, сульфитный щелок целлюлозной промышленности);
- природные и синтетические субстраты, содержащие органические кислоты, спирты и другие окисленные соединения углерода (отходы спиртовой промышленности — барда, отходы производства синтетических моющих веществ и др.);
- углеводороды (нефть, парафины, природные газы).

При производстве кормового белка не требуется получение жизнеспособной микробной массы, поэтому требования при выделении клеток более просты.

Живая биомасса молочнокислых бактерий, которая широко используется в молочной промышленности, в пищевой промышленности, в сельском хозяйстве и в ветеринарии, называется *молочнокислые закваски*. Кроме этого, живые клетки микроорганизмов используются для получения *бактериальных удобрений*, *микробных инсектицидов*.

Вопросы для самоконтроля

1. Каковы пути получения белка?
2. Как можно получать промышленным путем биомассу?
3. Как получают товарные дрожжи?

Лекция 4. Производство спиртов и полиолов

План

1. Микроорганизмы, используемые в производстве этилого спирта.
2. Технология производства спирта.

Этиловый спирт используется для технических нужд - для производства синтетического каучука, как растворитель, для синтеза других веществ, а также на изготовление напитков и медицинские нужды. Спиртовое брожение — хорошо изученный биохимический процесс. Спиртовое брожение вызывают чаще всего дрожжи, реже некоторые бактерии (*Sarcina*) и плесневые грибы (*Mucor*). В промышленности дрожжи обычно разделяют на верховые и низовые.

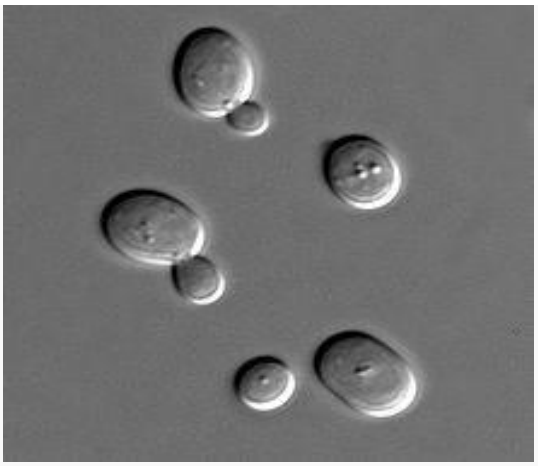


Рисунок 6- Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* под микроскопом.

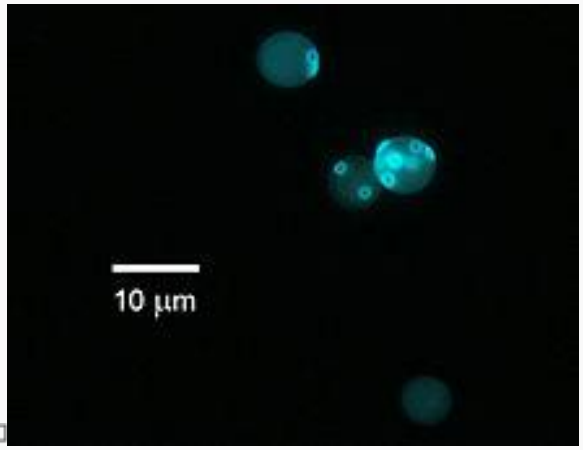


Рисунок 7- Клетки пекарских дрожжей, флюоресцентная микроскопия, краситель — Калькофлюор белый.

Верховые дрожжи интенсивно ведут брожение и труднее осаждаются. К ним принадлежат спиртовые и хлебопекарные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, а также винные дрожжи из вида *Saccharomyces elipsoideus*. К

низовым дрожжам относятся виды, используемые в пивоваренной промышленности. В производстве процесс брожения ведут 2 - 3 суток.

В ходе брожения углеводы распадаются в конечном итоге до этилового спирта, углекислого газа и воды. Промежуточный продукт - ацетальдегид. Если к питательной среде добавить сульфиты, которые связывают ацетальдегид, при брожении можно получить значительное количество глицерина, что и применяется в промышленности. В этом случае основной конечный продукт брожения - трехатомный спирт глицерин. В процессе спиртового брожения могут накапливаться изоамиловый, амиловый и изобутиловый спирты (сивушные масла). Некоторые дрожжи и бактерии способны продуцировать бутанол, а также 2,3-бутандиол. Эти продукты обычно синтезируют из нефти, однако микробное получение этанола и других спиртов вызывает все больший интерес.

В мире большая часть этанола получается микробиологическим путем из растительного сырья. Сырьем могут быть гидролизаты древесины, меласса, крахмал, молочная сыворотка. Отходы производства этанола содержат белки, углеводы, рибофлавин и др. витамины, и могут использоваться как кормовая добавка.

При получении спирта из древесины перед гидролизом древесину размельчают до стружек толщиной 3 мм, шириной 10 - 70 мм и длиной 25 мм. Гидролиз идет в больших (до 50 кубометров) гидролизных аппаратах, которые наполняют стружкой, добавляют 0,5%-ный раствор H_2SO_4 и вводят пар давлением 1-1,2 МПа. Варка идет 40—50 мин. Выход сахара 45— 48% от сухой массы древесины. Реакция среды полученного гидролизата кислая, pH 1,8—2,2, поэтому гидролизат нейтрализуют известковым молоком, в котором содержится 1,1 —1,2 кг/л извести; в гидролизате сравнительно мало азота и фосфора, поэтому предварительно к каждому кубическому метру гидролизата добавляют 0,3 кг суперфосфата и 0,15 кг сульфата аммония. При температуре 85°С через гидролизат продувают воздух, pH среды 5-6. Гипс осаждают, а прозрачную часть гидролизата после охлаждения используют для сбраживания.
Спирт получают и из мелассы. Предварительная подготовка питательной среды очень проста - мелассу разбавляют и добавляют питательные соли. Для приготовления напитков используют *спирт*, полученный только из пищевого сырья. Для технических нужд используют спирт, полученный из гидролизатов древесины, сульфитного щелока.

Сдвиг в сторону получения микробиологического этанола наблюдается в разных странах. Найдены бактерии Zymomonas mobilis, которые вдвое эффективнее сбраживают углеводы в этанол, чем дрожжи. В Бразилии производство топливного спирта вносит наибольший вклад в энергобаланс страны и составляет миллиарды литров.

Ферментация мелассы различными видами Clostridium acetobutilicum, другими бактериями, вызывающими маслянокислое брожение, может быть использована для получения не только этанола, но и ацетальдегида, уксусной кислоты, этилацетата и диэтилового эфира. Субстратом для такого брожения

могут быть зерновые, мелассно-зерновые заторы или меласса. Если среду готовят из зерна, например, кукурузы, то сначала получают муку грубого помола, ее смешивают с водой из расчета 6—8 кг муки на 100 л воды. Затем затор варят 2 ч под давлением 0,2 МПа и стерилизуют. Охлажденную до 37—42°С массу сбраживают в течение 2 суток, pH среды 5-7. В процессе брожения из глюкозы образуется смесь, содержащая 6 частей бутилового спирта, 1 часть этилового спирта и 3 части ацетона. Разработаны методы получения ацетона и бутилового спирта из сульфитного щелока и гидролизатов древесины. В ацетоно-бутиловом брожении в первый период образуется уксусная и масляная кислоты, выделяется водород и углекислый газ. Затем масляная кислота восстанавливается до бутилового спирта.

Штаммы-продуценты первичных метаболитов получают путем индуцированного мутагенеза, так как в природе мутации, ведущие к сверхпродукции одного из метаболитов вредны. Нарушения в обмене веществ приводят к снижению конкурентоспособности и жизнеспособности микроорганизмов. Первичные метаболиты синтезируются природными микроорганизмами в количествах, необходимых лишь для удовлетворения их потребностей. Мутантные формы микроорганизмов могут синтезировать аминокислоты вплоть до концентрации 100 г/л (для сравнения - организмы дикого типа накапливают аминокислоты в количествах, исчисляемых миллиграммами).

Вопросы для самоконтроля

1. Каковы методы получения этанола?
2. Как используется этанол в промышленности?

Лекция 5 . Производство вторичных метаболитов

План

1. Общая характеристика вторичных метаболитов.
2. Антибиотики, образуемые бактериями.
3. Выделение и очистка антибиотиков.

Из всех продуктов, получаемых с помощью микробных процессов, наибольшее значение имеют вторичные метаболиты. Вторичные метаболиты, называемые также идиолитами, это низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре. Они производятся ограниченным числом таксономических групп и часто представляют собой смесь близкородственных соединений, относящихся к одной и той же химической группе. Если вопрос о физиологической роли вторичных метаболитов в клетках-продуцентах был предметом серьезных дискуссий, то их промышленное получение представляет несомненный интерес, так как эти метаболиты являются биологически активными веществами: одни из них обладают антимикробной активностью, другие являются специфическими ингибиторами ферментов, третьи - ростовыми факторами, многие обладают фармакологической активностью. К вторичным метаболитам относятся **антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений и токсины.** Фармацевтическая промышленность разработала сверхсложные методы скрининга (массовой проверки) микроорганизмов на способность продуцировать ценные вторичные метаболиты.

Получение такого рода веществ послужило основой для создания целого ряда отраслей микробиологической промышленности. Первым в этом ряду стало производство пенициллина; микробиологический способ получения пенициллина был разработан в 1940-х годах и заложил фундамент современной промышленной биотехнологии.

Рисунок 8 – Различные виды антибиотиков

Антибио́тики (от др.-греч. anti — против, bios — жизнь) — вещества природного или полусинтетического происхождения, подавляющие рост живых клеток, чаще всего прокариотических или простейших. Антибиотики природного происхождения чаще всего продуцируются актиномицетами, реже — немицелиальными бактериями. Некоторые антибиотики оказывают сильное подавляющее действие на рост и размножение бактерий и при этом относительно мало повреждают или вовсе не повреждают клетки макроорганизма, и поэтому применяются в качестве лекарственных средств;

Некоторые антибиотики используются в качестве цитостатических (противоопухолевых) препаратов при лечении онкологических заболеваний.

Антибиотики не воздействуют на вирусы, и поэтому бесполезны при лечении заболеваний, вызываемых вирусами (например, грипп, гепатиты А, В, С, ветряная оспа, герпес, краснуха, корь).

Организация крупномасштабного производства антибиотиков сыграла решающую роль в становлении промышленной биотехнологии. К антибиотикам относятся низкомолекулярные эффекторы изначально природного происхождения, способные подавлять рост живых клеток. 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 ещё 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. Изыскание новых антибиотиков обусловлено как потребностями практики, так и накоплением резистентных форм микроорганизмов по отношению ко многим антибиотикам.

Молекулы антибиотиков очень разнообразны по составу и механизму действия на микробную клетку. При этом в связи с возникновением устойчивости патогенных микроорганизмов к старым антибиотикам постоянно существует потребность в новых. В некоторых случаях природные микробные антибиотические продукты химическим или энзиматическим путем могут быть превращены в так называемые полусинтетические антибиотики, обладающие более высокими терапевтическими свойствами.

Огромное разнообразие антибиотиков и видов их воздействия на организм человека явилось причиной классифицирования и разделения антибиотиков на группы. По характеру воздействия на бактериальную клетку антибиотики можно разделить на три группы:

бактериостатические (бактерии живы, но не в состоянии размножаться),

бактерициды (бактерии умертвляются, но физически продолжают присутствовать в среде),

бактериолитические (бактерии умертвляются, и бактериальные клеточные стенки разрушаются).

Классификация по химической структуре, которую широко используют в медицинской среде, состоит из следующих групп:

Бета-лактамные антибиотики, делящиеся на две подгруппы:

Пенициллины — вырабатываются колониями плесневого грибка Penicillinum;

Цефалоспорины — обладают схожей структурой с пенициллинами. Используются по отношению к пенициллинустойчивым бактериям.

Макролиды — антибиотики со сложной циклической структурой. Действие — бактериостатическое.

Тетрациклины — используются для лечения инфекций дыхательных и мочевыводящих путей, лечения тяжелых инфекций типа сибирской язвы, туляремии, бруцеллёза. Действие — бактериостатическое.

Аминогликозиды — обладают высокой токсичностью. Используются для лечения тяжелых инфекций типа заражения крови или перитонитов.

Левомицетины — Использование ограничено по причине повышенной опасности серьезных осложнений — поражении костного мозга, вырабатывающего клетки крови. Действие — бактерицидное.

Гликопептиды антибиотики нарушают синтез клеточной стенки бактерий. Оказывают бактерицидное действие, однако в отношении энтерококков, некоторых стрептококков и стафилококков действуют бактериостатически.

Линкозамиды оказывают бактериостатическое действие, которое обусловлено ингибированием синтеза белка рибосомами. В высоких концентрациях в отношении высокочувствительных микроорганизмов могут проявлять бактерицидный эффект.

Противогрибковые — разрушают мембрану клеток грибков и вызывают их гибель. Действие — литическое. Постепенно вытесняются высокоэффективными синтетическими противогрибковыми препаратами.

Антибиотики — органические соединения. Они синтезируются живой клеткой и способны в небольших концентрациях замедлить развитие или полностью уничтожить чувствительные к ним виды микроорганизмов. Их продуцируют не только клетки микроорганизмов и растений, но и клетки животных. Антибиотики растительного происхождения называют фитонцидами. Это хлорелин, томатин, сативин, получаемый из чеснока, и алин, выделяемый из лука.

Механизмы биологического действия антибиотиков. Нарушение синтеза клеточной стенки посредством ингибирования синтеза пептидогликана (пенициллин, цефалоспорин, монобактамы), образования димеров и их переноса к растущим цепям пептидогликана (ванкомицин, флавомицин) или синтеза хитина (никкомицин, туникамицин). Антибиотики, действующие по подобному механизму обладают бактерицидным действием, не убивают покоящиеся клетки и клетки, лишенные клеточной стенки.

Нарушение функционирования мембран: нарушение целостности мембраны, образование ионных каналов, связывание ионов в комплексы, растворимые в липидах, и их транспортировка. Подобным образом действуют нистатин, грамицидины, полимиксины.

Подавление синтеза нуклеиновых кислот: связывание с ДНК и препятствование продвижению РНК-полимеразы (актидин), сшивание цепей ДНК, что вызывает невозможность её расплетания (рубомицин), ингибирование ферментов.

Нарушение синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин, саркомицин).

Нарушение синтеза белка: ингибирование активации и переноса аминокислот, функций рибосом (стрептомицин, тетрациклин, пуромицин).

Ингибирование работы дыхательных ферментов (антимицины, олигомицины, ауровертин).

Рост микроорганизмов можно охарактеризовать как S - образную кривую. Первая стадия - стадия быстрого роста, или логарифмическая, для которой характерен синтез первичных метаболитов. Далее наступает фаза медленного роста, когда увеличение биомассы клеток резко замедляется. Микроорганизмы, производящие вторичные метаболиты, вначале проходят стадию быстрого роста, тропофазу, во время которой синтез вторичных веществ незначителен. По мере замедления роста из-за истощения одного или нескольких необходимых питательных веществ в культуральной среде микроорганизм переходит в идиофазу; именно в этот период синтезируются идиолиты. Идиолиты, или вторичные метаболиты, не играют явной роли в процессах метаболизма, они вырабатываются клетками для адаптации к условиям окружающей среды, например, для защиты. Их синтезируют не все микроорганизмы, а в основном нитчатые бактерии, грибы и спорообразующие бактерии. Таким образом, продуценты первичных и вторичных метаболитов относятся к разным таксономическим группам.

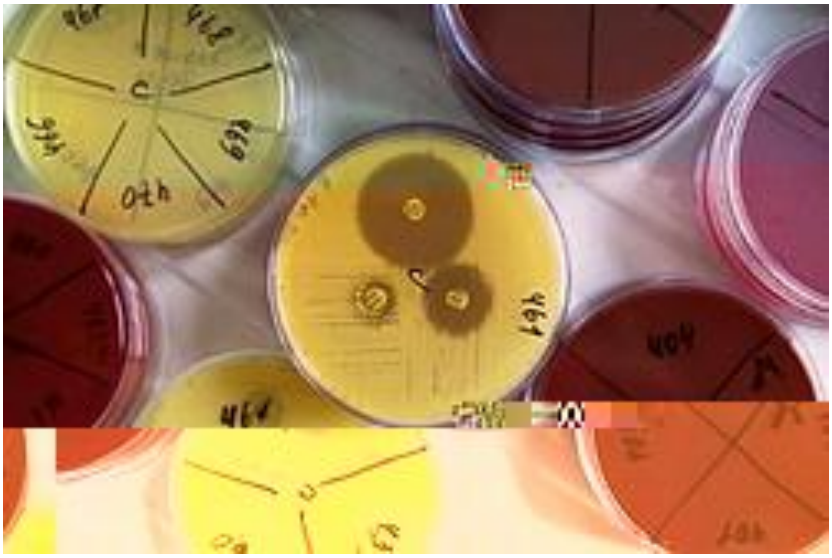


Рисунок 9- Рост микроорганизмов на питательной среде с антибиотиками

Особенности культурального роста этих микроорганизмов необходимо учитывать при производстве. Например, в случае антибиотиков большинство микроорганизмов в процессе тропофазы чувствительно к

собственным антибиотикам, однако во время идиофазы они становятся к ним устойчивыми.

Чтобы уберечь микроорганизмы, продуцирующие антибиотики, от самоуничтожения, важно быстро достичь идиофазы и затем культивировать микроорганизмы в этой фазе. Это достигается путем варьирования режимов культивирования и составом питательной среды на стадиях быстрого и медленного роста.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие вещества относятся к вторичным метаболитам?
2. Как можно синтезировать вещества вторичного метаболизма?
3. Что представляют собой антибиотики?
4. Какие основные виды фитогормонов?
5. К каким классам веществ относятся регуляторы роста?

Лекция 6 . Биотрансформация

План

1. Процессы микробиологической трансформации органических соединений.
2. Подбор культур микроорганизмов для микробиологической трансформации определенных соединений по заданному типу реакции.

Микроорганизмы можно использовать для превращения тех или иных соединений в структурно сходные, но более ценные вещества. Поскольку микроорганизмы могут проявлять свое каталитическое действие в отношении лишь каких-то определенных веществ, протекающие при их участии процессы более специфичны, чем чисто химические. Наиболее известный процесс биотрансформации - получение уксуса в результате превращения этанола в уксусную кислоту. Но среди продуктов, образующихся при биотрансформации, есть и такие высокоценные соединения, как стероидные гормоны, антибиотики, простагландины

Микроорганизмы способны осуществлять реакции трансформации (изменение отдельных участков в молекулах органических веществ), превращая те или другие соединения в новые продукты. Условия протекания этих реакций мягкие, и во многих случаях микробиологические трансформации предпочтительнее химических.

Пример существующих крупномасштабных промышленных биоконверсий - производство уксуса из этанола, глюконовой кислоты из глюкозы. Широко используется микробная модификация стероидов, которые являются сложными полициклическими липидами. Теперь с использованием биоконверсии получают кортизон, гидрокортизон, преднизолон и целый ряд других стероидов. Применение и совершенствование микробной технологии в сотни раз снижает себестоимость производства стероидов.

В отличие от процессов биосинтеза и брожения, в которых участвует большое количество ферментов, в микробиологической трансформации обычно работает один определенный фермент, катализирующий окисление, декарбоксилирование, метилирование или какую-либо другую реакцию. Чтобы провести трансформацию какого-либо вещества, вначале размножают культуру соответствующего микроорганизма до количества, равного 5-10% объема трансформируемого раствора. Раствор для трансформации вещества готовят, учитывая, что в нем надо растворить максимально возможное количество трансформируемого вещества (обычно 10-25%) и надо использовать минимальное количество необходимых для развития культуры питательных солей, в таком виде, чтобы не было затруднено химическое выделение вещества. Если трансформируемое вещество не растворяется в воде, его предварительно растворяют в нейтральном органическом растворителе и затем, при интенсивном перемешивании, смешивают с основной средой. Трансформацию ведут в стерильных условиях при

оптимуме pH, температуры и других условий. Длительность процесса обычно 1-2 суток. После микробиологической трансформации следует химическое выделение вещества из раствора. Процессы микробиологической трансформации органических соединений можно разделить на следующие группы:

- реакции окисления: гидроксилирование неактивированного углерода, окисления олефинов, окисление аллильной группы, микробиологическое гидроксилирование ароматического кольца, окисления ароматических соединений с разрывом кольца, -окисление жирных кислот, дегидрирование, окисление карбинольной группы в карбонильную и карбоксильную, альдегидной в карбоксильную, метильной в карбоксильную, дегидрогенизация циклических спиртов, окисление аминогруппы в нитрогруппу, окисление циклопарафинов до циклокетонов, смешанные типы окисления;
- реакции восстановления: восстановление альдегидов до первичных спиртов, восстановление кетонов и дикетонов, гидрирование двойных связей, восстановление нитрогруппы, восстановление первичных и вторичных спиртов, трансформация альдегидов в меркаптосоединения и др.;
- декарбоксилирование: декарбоксилирование органических кислот с образованием концевой метильной группы, окислительное декарбоксилирование кетокислот с образованием карбоновых кислот, восстановительное декарбоксилирование кетокислот в спирты, декарбоксилирование аминокислот с образованием аминов и аминокислот, превращение моноаминокислот в спирты и оксикислоты, смешанные типы декарбоксилирования;
- реакции дезаминирования: аминокислот в карбоновые кислоты, аминокислот в кето- и оксикислоты, амидов в спирты, окислительное дезаминирование аминов в альдегиды и кетоны, аминов до соответствующих карбоновых кислот и смешанные типы дезаминирования;
- образование гликозидов, например синтез мальтозы из глюкозы дрожжами;
- гидролиз: омыление эфиров, гидролиз гликозидной связи, гидролиз амидов, гидролиз белков и др.;
- реакции метилирования;
- этерификация, в том числе фосфорилирование и ацетилирование;
- дегидратация;
- реакции конденсации;
- аминирование и амидирование;
- реакции диметоксилирования;
- нуклеотизация;
- галогенирование;
- деметилирование;
- ассиметризация;

- рацемизация;
- изомеризация.

Подбор культур микроорганизмов для микробиологической трансформации определенных соединений по заданному типу реакции осуществляется эмпирическим путем.

В настоящее время для биотрансформации широко используются методы генной инженерии как технологию рекомбинантных ДНК, изменение с помощью биохимических и генетических методик хромосомного материала - основного наследственного вещества клеток. Хромосомный материал состоит из дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Биологи изолируют те или иные участки ДНК, соединяют их в новых комбинациях и переносят из одной клетки в другую. В результате удается осуществить такие изменения генома, которые естественным путем вряд ли могли бы возникнуть. Методом генной инженерии получен уже ряд препаратов, в том числе инсулин человека и противовирусный препарат интерферон. И хотя эта технология еще только разрабатывается, она сулит достижение огромных успехов и в медицине, и в сельском хозяйстве. В медицине, например, это весьма перспективный путь создания и производства вакцин. В сельском хозяйстве с помощью рекомбинантной ДНК могут быть получены сорта культурных растений, устойчивые к засухе, холоду, болезням, насекомым-вредителям и гербицидам.

Теперь умеют уже синтезировать гены, и с помощью таких синтезированных генов, введенных в бактерии, получают ряд веществ, в частности гормоны и интерферон. Их производство составило важную отрасль биотехнологии. Интерферон - белок, синтезируемый организмом в ответ на вирусную инфекцию, изучают сейчас как возможное средство лечения рака и СПИДа. Понадобились бы тысячи литров крови человека, чтобы получить такое количество интерферона, какое дает всего один литр бактериальной культуры. Ясно, что выигрыш от массового производства этого вещества очень велик. Очень важную роль играет также получаемый на основе микробиологического синтеза инсулин, необходимый для лечения диабета. Методами генной инженерии удалось создать и ряд вакцин, которые испытываются сейчас для проверки их эффективности против вызывающего СПИД вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). С помощью рекомбинантной ДНК получают в достаточных количествах и человеческий гормон роста, единственное средство лечения редкой детской болезни - гипофизарной карликовости. Еще одно перспективное направление в медицине, связанное с рекомбинантной ДНК, - т.н. генная терапия. В этих работах, которые пока еще не вышли из экспериментальной стадии, в организм для борьбы с опухолью вводится сконструированная по методу генной инженерии копия гена, кодирующего мощный противоопухолевый фермент. Генную терапию начали применять также для борьбы с наследственными нарушениями в иммунной системе. В сельском хозяйстве удалось генетически изменить десятки продовольственных и кормовых культур. В животноводстве использование гормона роста, полученного

биотехнологическим путем, позволило повысить удои молока; с помощью генетически измененного вируса создана вакцина против герпеса у свиней.

Получение промышленно важных стероидов. Способность клеток микроорганизмов к сложнейшим процессам биотрансформации наиболее полно реализовалась при получении промышленно важных стероидов. Биотрансформация стероидов обычно заключается в селективном воздействии на одно из положений стероидного скелета. Первый промышленный процесс (1937 г.) микробной биотрансформации стероидов основывался на технологии направленного гидроксилирования (11-α-гидроксилирование) прогестерона.

.

Вопросы для самоконтроля

1. Что представляет собой биоконверсия?
2. Какие продукты биоконверсии используются в промышленности?
3. Что представляет собой биотрансформация?
4. Как используются продукты генной инженерии?

Лекция 7 . Производство ферментов

План

1. Классификация ферментов, характеристика, использование ферментов в пищевой промышленности.
2. Получение ферментов с помощью микроорганизмов.
3. Иммобилизация и получение связанных ферментных препаратов.

В настоящее время установлены аминокислотные последовательности в молекулах многих ферментов, созданы компьютерные базы данных, позволяющие установить гомологии (идентичные последовательности) в строении различных ферментов. При этом оказалось проще идентифицировать последовательности нуклеотидов на уровне гена, чем последовательности аминокислот на уровне закодированного этим геном белка. Следует отдать должное английскому исследователю Ф. Сенгеру, единственному ученому, дважды получившему Нобелевскую премию по химии: в 1958 году за разработку метода определения первичной структуры белков и в 1980 году (совместно с У. Гилбертом и П. Бергом) за экспресс-метод установления последовательности нуклеотидов в молекулах нуклеиновых кислот.

К настоящему времени для сотен ферментов полностью определена трехмерная пространственная структура с высоким разрешением (0,15 - 0,20 нм) расположения отдельных атомов. Изучены кинетические характеристики и механизмы действия многих ферментов. Результатом всей этой деятельности явился пессимизм в середине восьмидесятых годов. Венгерский энзимолог Петер Фридрих в 1984 году в интересной и содержательной книге "Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы" писал: "Многие биологи придерживаются мнения, что энзимология пережила себя, горячие точки биохимии уже не связаны с энзимологией, и поэтому энзимологи постепенно окажутся в стороне от общего прогресса". "Не пора ли сказать: "Энзимология сделала свое дело, она является уже завершенной главой биохимии, и биохимик-энзимолог должен уступить место биохимику-технологу или клеточному биологу", - продолжили эту мысль в 1986 году редакторы русского перевода книги С.Е. Северин и Н.Б. Гусев. Однако ни сам автор, ни редакторы перевода не разделяли такой мрачной точки зрения, а видели перспективу дальнейших исследований в переходе от энзимологии in vitro (в пробирке) к энзимологии in vivo (в организме). То есть в переходе от изучения изолированных ферментов к поиску путей исследования их поведения в целой клетке. Что нового произошло за последние 10 лет? Имеющиеся сведения постепенно убеждают нас в том, что ферменты in vivo образуют структурные комплексы и ансамбли как друг с другом, так и с участками клеточных и внутриклеточных мембран, с элементами цитоскелета и/или другими молекулами. Даже секретируемые в просвет кишечника внеклеточные ферменты а-химотрипсин и трипсин адсорбируются (связываются) на поверхности щеточной каемки

эпителиальных клеток кишечника. Функциональное значение существования таких ассоциатов пока не ясно, но можно полагать, что образование межмолекулярных и надмолекулярных комплексов изменяет (регулирует) активность ферментов. Учитывая многообразие и сложность внутриклеточных механизмов регуляции действия ферментов, можно себе представить, как далеки мы от полного понимания согласованности этих механизмов. Помочь разобраться в этих вопросах могут новые направления в энзимологии: 1) разработка методов и подходов для исследования ферментов в интактной (неразрушенной) клетке, 2) изучение поведения ферментов в различных модельных системах, 3) ферментная инженерия (конструирование и реконструкция ферментных комплексов и ансамблей, химическая модификация молекул ферментов, получение искусственных ферментов).

Важную информацию о биологических функциях того или иного фермента дают так называемые "молекулярные болезни". Термин этот был введен Л. Полингом в пятидесятых годах для обозначения очень редких наследственных заболеваний, вызываемых генетически обусловленными изменениями (нарушениями) строения белковых молекул. О том, что такие болезни существуют, поведал миру А. Гаррод еще в 1908 году. Однако долгое время оставалось тайной то обстоятельство, что их причиной являются мутации в молекуле ДНК и соответствующие замены в аминокислотной последовательности кодируемого белка при переходе с четырехбуквенного языка нуклеиновых кислот (4 азотистых основания) на 20-буквенный язык белков (20 аминокислот). Некоторые из этих мутаций являются летальными (смертельными) еще на эмбриональной стадии, и мы ничего о них не знаем. Другие мутации никак себя не проявляют, и о них мы тоже не догадываемся. В редких случаях удается проследить всю цепочку нарушений: замена нуклеотида в молекуле ДНК соответствующая аминокислотная замена в белке-ферменте видоизмененный фермент отсутствие или нарушение ферментативной реакции патологические изменения в клетках и тканях заболевание организма.

Довольно часто нарушения действия фермента не связаны с изменением его каталитической активности. Изменена его способность к регуляции и/или взаимодействию с другими внутриклеточными партнерами протекающей реакции. При определении активности такого фермента в пробирке, в изолированной от клеточного содержимого среде, не всегда удается выявить такие отклонения, поскольку они могут проявляться только внутри клетки. Рассмотрим более подробно один из таких случаев, который характеризует сложные структурно-функциональные взаимоотношения в живом организме.

Существуют ферменты, требующие для проявления своей активности кроме белковой части (апофермента) наличие небелкового компонента (кофермента), предшественником которого часто служат витамины. Активностью обладает только комплекс апофермент-кофермент, называемый холоферментом. Эффект недостаточности такого фермента (вернее, его активности) может наблюдаться в отсутствие кофермента, а также в случае, если затруднено образование активного холофермента. Причины разные, но

конечный результат один и тот же. Возможно ли определение активности ферментов непосредственно в клетках организма? Это исключительно сложная задача. Можно приблизительно судить об уровне внутриклеточной активности ферментов (в очень редких случаях), определяя в моче или сыворотке крови непосредственные или отдаленные продукты их деятельности (обычно продукты тут же подвергаются дальнейшим превращениям и определить их уже нельзя). Иногда удается использовать следующий прием. В организм вводят искусственный субстрат определенного фермента, подобранный с таким расчетом, чтобы продукт его каталитического превращения не подвергался дальнейшим изменениям и полностью выводился из организма в неизменном виде. Часто в таких экспериментах используют радиоактивные изотопы водорода, углерода или фосфора.

Как правило, фермент in vivo может катализировать превращение разных субстратов. Совпадает ли субстратная специфичность фермента (избирательность его действия на соединения определенного химического строения) в пробирке и в клетке? Например, фермент гликолиза (реакций последовательного расщепления глюкозы), окисляющий D-глицеральдегид-3-фосфат, может действовать и на другие альдегиды. В мышечных клетках содержание этого фермента очень велико и намного превосходит концентрацию его субстратов (обычно концентрация катализатора низкая). Возможно, это объясняется тем, что необходимо быстро окислить очень активные альдегиды, которые самопроизвольно могут вступать в побочные (нежелательные) химические реакции.

С этим широко распространенным ферментом, называющимся глицеральдегидфосфатдегидрогеназой, легко образуют молекулярные комплексы другие ферменты и внутриклеточные белки. Имеет ли это обстоятельство функциональное значение? Меняется ли субстратная специфичность фермента? Или это неспецифические белок-белковые взаимодействия? Ответить на эти вопросы трудно, так как выделенные из клетки как индивидуальные белки, так и их комплексы могут оказаться артефактом (от лат. artefactum - искусственно сделанное), результатом либо распада естественного комплекса, либо, наоборот, нехарактерного объединения изначально изолированных ферментов. Сами методы очистки - разведение, изменение состава среды - могут изменить естественное состояние фермента и его способность к регулирующим воздействиям. Постепенно накапливаются факты, убеждающие нас в реальности существования надмолекулярной структурной организации ферментов в живой клетке. В научной литературе все чаще можно встретить термин "метаболон" (введен в 1985 году П. Шрером) для обозначения комплексов функционально связанных ферментов основных метаболических путей. В этом направлении проводятся интенсивные научные исследования.

Выявить в клетке какой-либо фермент, даже с нарушенной каталитической активностью, можно иммунными методами, получив предварительно высокоспецифичные для данного фермента антитела (по принципу

образования комплекса антиген-антитело). Такая техника сейчас хорошо разработана. Еще проще оказалось судить о наличии определенного фермента по соответствующей данному белку нуклеотидной последовательности молекул нуклеиновых кислот.

На основе гибридизационного поиска фрагментов ДНК разработаны чувствительные методы дородового выявления возможных наследственных патологий, связанных с нарушениями биосинтеза ферментов. Для этой цели с помощью специальных ферментов - рестриктаз, "разрезающих" молекулу ДНК в строго определенных местах - проводят картирование (идентификацию) участков ДНК, извлеченной из зародышевых клеток, взятых из околоплодной жидкости путем довольно несложной операции. Таким образом, удается проверить, будет ли синтезироваться интересующий нас фермент и если будет, то нет ли нарушений в его аминокислотной последовательности. Установлено, что белки с подобными нарушениями (ошибки биосинтеза) разрушаются внутри клетки значительно быстрее, чем белки с нормальной последовательностью аминокислот.

Современная биотехнология позволяет оперировать генами и получать штаммы микроорганизмов и линии мышей, у которых отсутствует тот или иной фермент. Наблюдающиеся при этом отклонения помогают проследить функцию отсутствующего фермента. Однако, к удивлению исследователей, довольно часто не удается выявить изменений у организмов, лишенных какого-либо фермента. Скорее всего, это объясняется либо тем, что неизвестно, где и когда искать нарушения, либо "запуском" в клетке дублирующих механизмов, которые позволяют компенсировать отрицательные последствия, вызванные отсутствием данного фермента.

Технология рекомбинантных ДНК (со встроенными участками чужеродной ДНК), чаще называемая генной инженерией, позволяет уже сейчас получать биокатализаторы, не существующие в природе. Такого же результата можно добиться путем направленного мутагенеза. Для энзимологов весьма плодотворным оказался молекулярно-генетический прием, позволяющий осуществлять строго заданные единичные замены в нуклеотидных последовательностях, кодирующих аминокислотную последовательность белков. Такой метод получения специфических мутаций в нормальных белках называется мутагенез, индуцированный нуклеотидами, или сайт (от англ. site - место) направленный (или сайт-специфический) мутагенез. Применение этого метода показало, что многие мутации несущественны для функционирования белков, но иногда одна единственная аминокислотная замена в белке может изменить его функцию. Путем сайт-специфического мутагенеза удается иногда повысить устойчивость некоторых ферментов к действию высокой температуры, изменениям pH, присутствию пероксида водорода и других денатурирующих агентов.

В сознании специалистов, изучавших биологию до середины семидесятых годов, укоренилось представление о ферментах как о крайне неустойчивых, малодоступных и дорогостоящих соединениях. С тех пор многое изменилось. Усовершенствование способов очистки ферментов

снизило их стоимость и повысило доступность. Основные успехи, позволившие широко использовать ферменты, связаны с получением иммобилизованных ферментных препаратов, стабильность которых повышена в сотни и тысячи раз. Достигается такая стабилизация молекул ферментов в результате их "обездвиживания" при соединении с матрицей носителя.

Поиск подходящих матриц и составлял основную сложность технологии воплощения идеи, появившейся еще в конце сороковых годов и реализованной только в начале семидесятых. Как правило, это полимерные молекулы, к которым фермент "пришивается" химическим путем ковалентными связями. В ряде случаев такое соединение возможно за счет электростатических или гидрофобных связей. Способы связывания фермента подбирают с таким расчетом, чтобы сохранить его ферментативную активность. Иногда можно просто инкапсулировать фермент внутрь полимерного микроконтейнера, липидного бислойного пузырька (липосомы) или обволакивающего гелеобразного соединения. Матрица может быть как растворимой в воде, так и нерастворимой. Нерастворимые носители позволили использовать ферменты в технологических процессах для производства различных продуктов, которые легко можно отделять от ферментов, а последние использовать вновь и вновь в непрерывном промышленном режиме. Можно иммобилизовать и целые клетки, содержащие технологически нужный фермент. Например, иммобилизованные клетки дрожжей используют при ферментации в производстве этилового спирта. Могли ли мечтать о таких возможностях Л. Пастер и Ю. Либих?

Использование иммобилизованных ферментов помогло в познании деталей ферментативного катализа. Оказалось, что путем иммобилизации можно менять не только стабильность ферментов, но их активность, оптимальные значения температуры и pH, субстратную специфичность и само сродство к субстрату. Методом иммобилизации удалось исследовать структуру олигомерных (состоящих из нескольких полипептидных цепей) ферментов и ферментных комплексов.

Эти работы подготовили почву для принципиально новых подходов к исследованию ферментов в гетерогенных модельных системах, в той или иной степени имитирующих ситуацию внутри живой клетки. Перспективным оказалось использование микрогетерогенных систем, включающих в себя поверхностно-активные вещества (структурные аналоги природных липидов), воду и органические растворители. В таких системах фермент работает на границе раздела фаз, внутри так называемых "обращенных" (вывернутых наизнанку) мицелл, окруженных органическим растворителем. Появилось новое направление исследований - "мицеллярная энзимология".

Классификация ферментов основана на механизме их действия и включает 6 классов.

Ферменты как биокатализаторы обладают рядом уникальных свойств, например, таких как высокая каталитическая активность и избирательность

действия. В ряде случаев ферменты обладают абсолютной специфичностью, катализируя превращение только одного вещества. Для каждого фермента существует свой оптимум pH, при котором его каталитическое действие максимально. При резком изменении pH ферменты инактивируются из-за необратимой денатурации. Ускорение реакции при повышении температуры также лимитировано определенными пределами, поскольку уже при температуре 40-50°C многие ферменты денатурируют. Эти свойства ферментов приходится учитывать при разработке технологии нового препарата.

Поскольку ферменты - вещества белковой природы, в смеси с другими белками их количество определить практически невозможно. Наличие фермента в препарате может быть установлено лишь по протеканию той реакции, которую катализирует фермент. При этом количественную оценку содержания фермента можно дать, определив либо количество образовавшихся продуктов реакции, либо количество израсходовавшегося субстрата. За единицу активности фермента принимают то его количество, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата в 1 минуту при заданных стандартных условиях - стандартная единица активности.

По решению Международного биохимического союза активность решено определять при t = 30°C по начальной скорости реакции, когда концентрация насыщения фермента и временная зависимость близка к кинетике реакции нулевого порядка. Остальные параметры реакции индивидуальны для каждого фермента. Активность ферментного препарата выражается в микромолях субстрата, прореагировавшего под действием 1 мл ферментного раствора или 1 грамма препарата в оптимальных условиях за 1 минуту. Если ферментный препарат не содержит балласта, то его активность выражается в тех же стандартных единицах на 1 мг фермента. Если же есть балласт, то активность считается на 1 мг белка в ферментном препарате. Активность выпускаемого препарата - важнейший нормируемый показатель качества.

Основную часть ферментов, получаемых промышленным способом, составляют гидролазы. К ним относятся, в первую очередь амилолитические ферменты: α-амилаза, β-амилаза, глюкоамилаза. Их основная функция - гидролиз крахмала и гликогена. Крахмал при гидролизе расщепляется на декстрины, а затем до глюкозы. Эти ферменты применяются в спиртовой промышленности, хлебопечении.

Протеолитические ферменты образуют класс пептидгидролаз. Их действие заключается в ускорении гидролиза пептидных связей в белках и пептидах. Важная их особенность - селективный характер действия на пептидные связи в белковой молекуле. Например, пепсин действует только на связь с ароматическими аминокислотами, трипсин - на связь между аргинином и лизином. В промышленности протеолитические ферменты классифицируют по способности проявлять активность в определенной области pH:

- pH 1.5 - 3.7 - кислые протеазы;
- pH 6.5 - 7.5 - протеазы;
- pH > 8.0 - щелочные протеазы.

Протеазы находят широчайшее применение в разных отраслях промышленности:

- мясная - для смягчения мяса;
- кожевенная - смягчение шкур;
- кинопроизводство - растворение желатинового слоя при регенерации пленок;
- парфюмерная - добавки в зубную пасту, кремы, лосьоны;
- производство моющих средств - добавки для удаления загрязнений белковой природы;
- медицина - при лечении воспалительных процессов, тромбозов и т.д.

Пектолитические ферменты уменьшают молекулярную массу и снижают вязкость пектиновых веществ. Пектиназы делятся на две группы - гидролазы и трансэлиминазы. Гидралазы отщепляют метильные остатки или разрывают гликозидные связи. Трансэлиминазы ускоряют негидролитическое расщепление пектиновых веществ с образованием двойных связей. Применяются в текстильной промышленности (вымачивание льна перед переработкой), в виноделии - осветление вин, а также при консервировании фруктовых соков.

Целлюлолитические ферменты очень специфичны, их действие проявляется в деполимеризации молекул целлюлозы. Обычно используются в виде комплекса, доводящего гидролиз целлюлозы до глюкозы (в гидролизной промышленности). В медицинской промышленности их используют для выделения стероидов из растений, в пищевой - для улучшения качества растительных масел, в сельском хозяйстве - как добавки в комбикорма для жвачных животных.

Существует ряд факторов, влияющих на биосинтез ферментов. В первую очередь, к ним относится генетический. Состав и количество синтезируемых ферментов наследственно детерминированы. Применяя мутагены можно изменить генетические свойства микроорганизмов и получить штаммы с ценными для промышленности свойствами. К мутагенным факторам относятся ионизирующее и неионизирующее излучения, изотопы, антибиотики, другие химические соединения, преобразующие наследственные элементы клетки. Несмотря на определяющую роль генетического фактора в биосинтезе ферментов, производительность биотехнологических процессов зависит и от состава питательной среды. При этом важно не только наличие источников основных питательных веществ, но и веществ, играющих роль индукторов или репрессоров биосинтеза данного конкретного фермента или их групп. Механизм этого явления еще не вполне изучен, но сам факт должен учитываться при выборе технологии.

Рассмотрим несколько примеров. Фермент липаза почти не синтезируется грибом *Aspergillus awamori* на среде без индуктора, добавление жира кашалота усиливает биосинтез фермента в сотни раз. При добавлении же в среду крахмала и при полном исключении минерального фосфора интенсивно синтезируется фосфатаза. Не только наличие индуктора способно увеличивать выход фермента. Важную роль играет состав

питательной среды и условия культивирования. При разработке процесса биосинтеза а-амилазы культурой *Aspergillus oryzae* замена сахарозы (как источника углерода) на крахмал увеличила активность фермента в 3 раза, добавление солодового экстракта (из проросших семян злаковых) ещё в 10 раз, а повышение концентрации основных элементов питательной среды на 50% - ещё в 2 раза.

Для интенсификации процесса роста и синтеза ферментов добавляют различные факторы роста, например, аминокислоты, пуриновые основания и их производные, РНК и продукты её гидролиза. В качестве источника углерода используют крахмал, кукурузный экстракт, соевую муку, гидролизаты биомассы дрожжей. Микроорганизмы могут утилизировать и минеральные источники азота. В состав питательных сред входят и ионы Mg, Mn, Zn, Fe, Cu и др. металлов. Механизм действия большинства из них неизвестен. Некоторые входят в состав фермента. Ионы Са повышают устойчивость а-амилазы, ионы Fe и Mg активизируют и стабилизируют протеолитические ферменты.

Оптимальный состав питательной среды для каждого продуцента может быть определен двумя способами: эмпирический и построение математической модели с использованием компьютера. Последний, естественно, предпочтительнее. По характеру культивирования все технологические процессы производства ферментных препаратов делятся на две большие группы: глубинный и поверхностный методы.

Глубинный метод производства ферментов. В этом случае микроорганизмы выращиваются в жидкой питательной среде, который технически более совершенен, чем поверхностный, так как легко поддается автоматизации и механизации. Концентрация фермента в среде при глубинном культивировании обычно значительно ниже, чем в водных экстрактах поверхностной культуры. Это вызывает необходимость предварительного концентрирования фильтрата перед его выделением.

При глубинном культивировании продуцентов ферментов выделяют, как и в любом биотехнологическом процессе, 5 этапов.

1. Приготовление питательных сред зависит от состава компонентов. Некоторые предварительно измельчают, отваривают или гидролитически расщепляют. Готовые к растворению компоненты подают при постоянном помешивании в емкость для приготовления среды в определенной последовательности. Стерилизацию среды проводят либо путем микрофильтрации с помощью полупроницаемых мембран, либо при помощи высоких температур. Время обработки в этом случае зависит как от интенсивности фактора, так и от уровня обсемененности объекта. Стерилизуются также все коммуникации и аппараты. Воздух очищается до и после аэрирования. До - потому что содержит частицы пыли органической и неорганической природы, после - так как несет клетки продуцента.

2. Получение засевного материала. Для засева питательной среды материал готовят также глубинным методом. Вид его зависит от продуцента: для грибов это мицелиальная вегетативная масса, для бактерий - молодая

растущая культура на начальной стадии спорообразования. Получение посевного материала состоит в увеличении массы продуцента в 3-4 стадии. Объем посевного материала зависит от физиологических особенностей продуцента. Если продуцент размножается только вегетативно, он резко возрастает (до 5-20%). Если же происходит обильное спороношение - сокращается до 1%.

3. Производственное культивирование. Биосинтез ферментов в глубинной культуре протекает в течение 2-4 суток при непрерывной подаче воздуха и перемешивании. Высокая концентрация питательных веществ на первых этапах могут тормозить рост биомассы продуцента, поэтому часто свежая среда или некоторые её компоненты вводятся в ферментер на стадии активного роста. Температурный оптимум находится в интервале 22-32°С. В современных технологических процессах ведется непрерывное автоматическое определение содержания в среде углеводов, количества образовавшихся метаболитов и концентрации клеток. Данные поступают в компьютер, который определяет стратегию коррекции процесса и автоматически регулирует его. Этим достигается максимальная производительность и наилучшее качество продуктов.

4. Выделение. В мицелии трёхсуточной культуры обычно остается не более 15% ферментов. Остальные выделяются в окружающую клетки жидкую среду. В этом случае препараты ферментов выделяют из фильтратов после отделения биомассы.

5. Получение товарной формы. Производство ферментов при поверхностном культивировании продуцентов. При поверхностном методе культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды. Мицелий полностью обволакивает и довольно прочно скрепляет твердые частицы субстрата, из которого получают питательные вещества. Поскольку для дыхания клетки используют кислород, то среда должна быть рыхлой, а слой культуры-продуцента небольшим. Выращивание производственной культуры происходит обычно в асептических условиях, но среду и кюветы необходимо простерилизовать. Перед каждой новой загрузкой также необходима стерилизация оборудования. Преимущества поверхностной культуры: значительно более высокая конечная концентрация фермента на единицу массу среды (при осахаривании крахмала 5 кг поверхностной культуры заменяют 100 кг культуральной жидкости), поверхностная культура относительно легко высушивается, легко переводится в товарную форму.

Посевной материал может быть трёх видов:

- культура, выросшая на твердой питательной среде;
- споровый материал;
- мицелиальная культура, выращенная глубинным способом.

В три этапа получают и посевную культуру. Сначала музейную культуру продуцента пересевают на 1 - 1.5 г увлажненных стерильных пшеничных отрубей в пробирку и выращивают в термостате до обильного

спорообразования. Второй этап - аналогично, но в колбах, третий - в сосудах с 500 г среды.

Основу питательной среды составляют пшеничные отруби, как источник необходимых питательных и ростовых веществ. Кроме того, они создают необходимую структуру среды. Для повышения активности ферментов к отрубям можно добавлять свекловичный жом, соевый шрот, крахмал, растительные отходы. Стерилизуют среду острым паром при помешивании (температура - 105-140° С, время 60-90 минут). После этого среду засевают и раскладывают ровным слоем в стерильных кюветах. Кюветы помещают в растильные камеры. Культивируют в течение 36-48 часов. Рост делится на три периода, примерно равных по времени. Сначала происходит набухание конидий и их прорастание (температура не ниже 28°С), затем рост мицелия в виде пушка серовато-белого цвета (необходимо выводить выделяемое тепло) и образование конидий. Для создания благоприятных условий роста и развития продуцента необходима аэрация и поддержание оптимальной влажности (55-70%). Выросшая в неподвижном слое при поверхностном культивировании культура представляет корж из набухших частиц среды, плотно связанных сросшимся мицелием. Массу размельчают до гранул 5-5 мм. Культуру высушивают до 10-12% влажности при температурах не выше 40°С, не долее 30 минут. Иногда препарат применяют прямо в неочищенном виде - в кожевенной и спиртовой промышленности. В пищевой и особенно медицинской промышленности используются ферменты только высокой степени очистки. Схема очистки сводится к следующему:

- освобождение от нерастворимых веществ;
- освобождение от сопутствующих растворимых веществ;
- фракционирование (как правило, хроматографическими методами).

Для выделения фермента из поверхностной культуры необходима экстракция. Как правило, экстраген - вода. При этом в раствор переходят сахара, продукты гидролиза пектиновых веществ и целлюлозы. Стадию выделения и очистки завершает сушка. После сушки препарат должен содержать не более 6-8% влаги, тогда он может в герметичной упаковке храниться до года без потери активности.

Стандартизация ферментного препарата - доводка активности фермента до стандартной, соответствующей требованиям ГОСТ. Для этого используются различные нейтральные наполнители - крахмал, лактоза и др.

Учитывая огромные перспективы применения ферментных препаратов в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства, медицине, можно сделать заключение о необходимости расширения исследований в этой области для оптимизации технологии и гарантийного получения высокоактивных и стабильных препаратов микробных ферментов.

Общая характеристика иммобилизованных ферментов

В современной биотехнологии одно из видных мест принадлежит ферментам. Ферменты и ферментные системы широко используются в различных отраслях промышленности, медицине, сельском хозяйстве, химическом анализе и т.д.

Ферменты - вещества белковой природы и поэтому неустойчивы при хранении, а также чувствительны к тепловым воздействиям. Кроме того, ферменты не могут быть использованы многократно из-за трудностей в отделении их от реагентов и продуктов реакции. Решить эти проблемы помогает создание иммобилизованных ферментов. Начало этому методу было положено в 1916 году, когда Дж.Нельсон и Е.Гриффин адсорбировали на угле инвертазу и показали, что она сохраняет в таком виде каталитическую активность. Сам термин "иммобилизованные ферменты узаконен в 1971 году, и означает любое ограничение свободы передвижения белковых молекул в пространстве.

Сущность иммобилизации ферментов — прикрепление их в активной форме к нерастворимой основе или заключение в полупроницаемую мембранную систему. Прикрепление фермента к носителю осуществляется адсорбционно, химической связью или путем механического включения фермента в органический или неорганический гель (в капсулу и т. п.). При этом допускается прикрепление фермента только за счет функциональных групп, не входящих в активный центр фермента и не участвующих в образовании фермент-субстратного комплекса. Носитель фермента или матрица может иметь вид зернистого материала, волокнистой структуры, пластинчатой поверхности, пленок или тканей, полых волокон, трубочек, капсул и т. д. Имеет значение размер частиц носителя. Важно иметь большую поверхность, поэтому рекомендуются небольшие частицы диаметром 0,1—0,2 мм. Носитель фермента может быть как природное вещество, так и синтетический полимер.

Преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными предшественниками:

1. Гетерогенный катализатор легко отделим от реакционной среды, что дает возможность остановить реакцию в любой момент, использовать фермент повторно, а также получать чистый от фермента продукт.

2. Ферментативный процесс с использованием иммобилизованных ферментов можно проводить непрерывно, регулируя скорость катализируемой реакции и выход продукта.

3. Модификация фермента целенаправленно изменяет его свойства, такие как специфичность (особенно в отношении макромолекулярного субстрата), зависимость каталитической активности от pH, ионного состава и других параметров среды, стабильность к денатурирующим воздействиям.

4. Можно регулировать каталитическую активность иммобилизованных ферментов путем изменения свойств носителя действием физических факторов, таких как свет и звук. Иммобилизовать ферменты можно как путем связывания на нерастворимых носителях, так и путем внутримолекулярной или межмолекулярной сшивки белковых молекул низкомолекулярными бифункциональными соединениями, а также путем присоединения к растворимому полимеру.

Классификация носителей для ферментов

Для получения иммобилизованных ферментов используется ограниченное число как органических, так и неорганических носителей. К носителям предъявляются следующие требования (Дж.Порат, 1974):

- высокая химическая и биологическая стойкость;
- высокая химическая прочность;
- достаточная проницаемость для фермента и субстратов, пористость, большая удельная поверхность;
- возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран);
- легкая активация;
- высокая гидрофильность;
- невысокая стоимость.

Классификация носителей схематично представлена на рисунке 10.

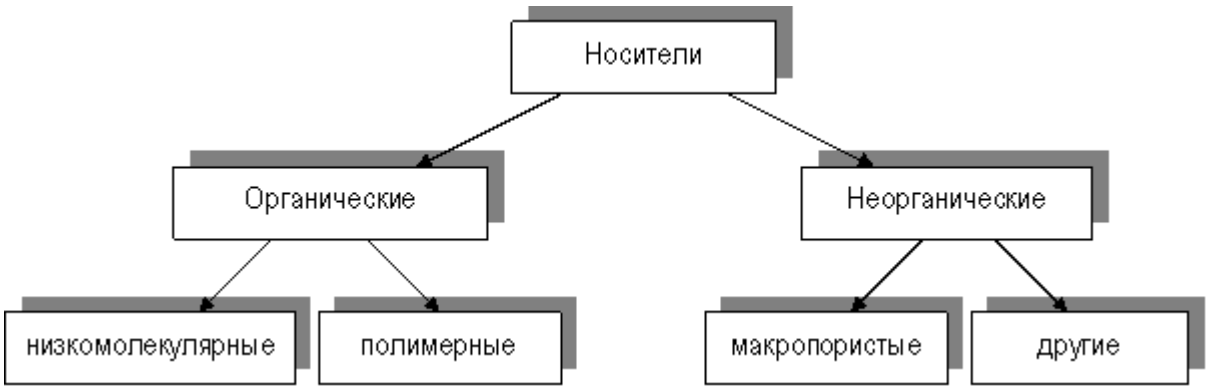


Рисунок 10. Классификация носителей для иммобилизованных ферментов

Следует отметить, что органические носители (как низко-, так и высокомолекулярные) могут быть природного или синтетического происхождения. Природные полимерные органические носители делят в соответствии с их биохимической классификацией на 3 группы: полисахаридные, белковые и липидные.

Синтетические полимеры также можно разделить на группы в связи с химическим строением основной цепи макромолекул: полиметиленовые, полиамидные, полиэфирные.

Для иммобилизации ферментов наиболее широко используются природные полисахариды и синтетические носители полиметильного типа, остальные применяются значительно реже. Большое значение природных полимеров в качестве носителей для иммобилизации объясняется их доступностью и наличием реакционно-способных функциональных групп,

легко вступающих в химические реакции. Характерной особенностью этой группы носителей также является их высокая гидрофильность. Недостаток природных полимеров - неустойчивость к воздействию микроорганизмов и довольно высокая стоимость.

Наиболее часто для иммобилизации используются такие полисахариды, как целлюлоза, декстран, агароза и их производные. Целлюлоза гидрофильна, имеет много гидроксильных групп, что позволяет модифицировать её, замещая эти группы. Для увеличения механической прочности целлюлозу гранулируют путем частичного гидролиза, в результате которого разрушаются аморфные участки. На их место для сохранения пористости между кристаллическими участками вводят химические сшивки. Гранулированную целлюлозу довольно легко превратить в различные ионообменные производные, такие как ДЭАЭ-целлюлоза, КМЦ и т.д.

Широко распространены носители на основе декстрана, выпускаемые под названием "сефадексы". При высушивании они легко сжимаются, в водном растворе сильно набухают. В этих носителях размер пор в геле регулируется степенью сшитости. К группе декстранов относят и крахмал. Химически модифицированный крахмал сшивается агентами, такими как формальдегид. Таким способом был получен губчатый крахмал, обладающий повышенной устойчивостью по отношению к ферментам, гидролизу. Водорастворимые препараты на основе декстрана часто применяются как носители лекарственных средств в медицине.

Хорошим носителем считается агар. Его свойства улучшаются после химической сшивки, например, диэпоксидными соединениями. Такой агар становится устойчивым к нагреванию, прочен, легко модифицируется.

Белки в качестве носителей обладают рядом достоинств: вместительны, способны к биодеградации, могут применяться в качестве тонкой (толщиной 80 мкм) мембраны. Иммобилизацию ферментов на белковых носителях можно проводить как в отсутствие, так и в присутствии сшивающих агентов. Белки используются и в фундаментальных биологических исследованиях, и в медицине. К недостаткам белков в качестве носителей относят их высокую иммуногенность (за исключением коллагена и фибрина). Наиболее для иммобилизации используются структурные (кератин, фибрин, коллаген), двигательные (миозин) и транспортные (альбумин) белки.

Синтетические полимерные носители применяются для ковалентной и сорбционной иммобилизации ферментов, для получения гелей, микрокапсул. Полимеры на основе стирола применяются сорбционной иммобилизации. Они могут иметь макропористую, изопористую структуру, а также гетеропористую структуру. Для получения полимерных гидрофильных носителей широко используется акриламид - производное акриловой кислоты.

Широкое распространение получил метод включения ферментов и клеток в полиакриламидный гель, имеющий жесткую пространственную сетчатую структуру. Полиакриламидный гель устойчив к химическим воздействиям. Очень интересную группу представляют полиамидные носители. Это группы

различных гетероцепных полимеров с повторяющейся амидной группой -C(O)-NH-. Например, полимеры на основе N-винилпирролидона используются для получения иммобилизованных ферментов, способных медленно распадаться в организме. Кроме того, они биологически инертны, что особенно важно при использовании в медицинских целях. Существенным недостатком большинства полимерных носителей является их способность накапливаться в организме. В этом отношении предпочтение отдается природным полимерам, которые гидролизуются ферментами. Поэтому в состав лекарственных препаратов часто входит декстран, а из синтетических носителей - полимеры на основе N-винилпирролидона. В настоящее время ведутся эксперименты по созданию синтетических полимеров, расщепляющихся с образованием нетоксичных продуктов обмена.

Методы иммобилизации ферментов

Существует два основных метода иммобилизации ферментов: физический и химический.

Физическая иммобилизация ферментов представляет собой включение фермента в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объема. При физической иммобилизации фермент не связан с носителем ковалентными связями. Существует четыре типа связывания ферментов:

- адсорбция на нерастворимых носителях;
- включение в поры геля;
- пространственное отделение фермента от остального объема реакционной системы с помощью полупроницаемой перегородки (мембраны);
- включение в двухфазную среду, где фермент растворим и может находиться только в одной из фаз.

Перечисленные подходы проиллюстрированы на рисунке 11. Адсорбционная иммобилизация является наиболее старым из существующих способов иммобилизации ферментов, начало ей было положено еще в 1916 г. Этот способ достаточно прост и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем. После отмывки неадсорбировавшегося белка иммобилизованный фермент готов к использованию. Удерживание адсорбированной молекулы фермента на поверхности носителя может обеспечиваться за счет неспецифических ван-дер-ваальсовых взаимодействий, водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий между носителем и поверхностными группами белка. Вклад каждого из типов связывания зависит от химической природы носителя и функциональных групп на поверхности молекулы фермента. Взаимодействия с носителем могут оказаться настолько сильными, что сорбция биокатализатора может сопровождаться разрушением его структуры. Например, при адсорбции некоторых растительных клеток на гранулах цитодекса клеточная стенка деформируется, повторяя рельеф поверхности частиц носителя.

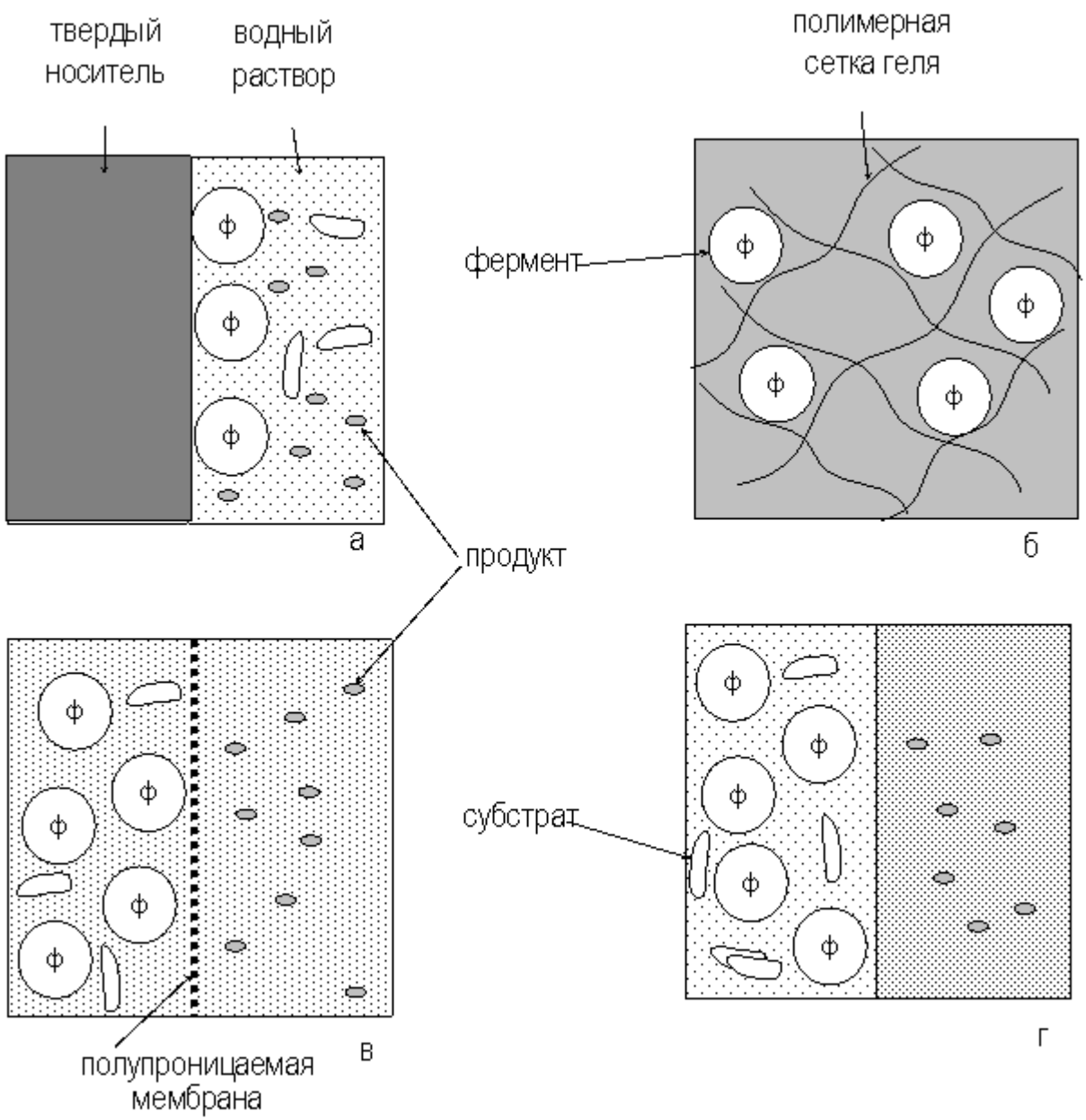


Рисунок 11. Способы иммобилизации ферментов: а - адсорбция на нерастворимых носителях, б – включение в поры геля, в – отделение фермента с помощью полупроницаемой мембраны, г – использование двухфазной реакционной среды

Преимуществом метода адсорбционной иммобилизации является доступность и дешевизна сорбентов, выступающих в роли носителей. Им также можно придать любую конфигурацию и обеспечить требуемую пористость. Важным фактор - простота применяемых методик. При адсорбционном связывании можно решить и проблему очистки фермента, так как связывание белка с носителем во многих случаях достаточно специфическое. К сожалению, прочность связывания фермента с носителем не всегда достаточно высока, что ограничивает применение метода. К недостаткам адсорбционной иммобилизации следует отнести отсутствие

общих рекомендаций, позволяющих сделать правильный выбор носителя и оптимальных условий иммобилизации конкретного фермента.

Некоторых из перечисленных затруднений можно избежать при иммобилизации ферментов путем включения в гели. Суть этого метода иммобилизации состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель. Среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не может покинуть полимерную матрицу и выйти в окружающий раствор, т.е. находится в иммобилизованном состоянии. Дополнительный вклад в удерживание фермента в сетке геля могут вносить также ионные и водородные связи между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями. Пространство между полимерными цепями в геле заполнено водой, на долю которой обычно приходится значительная часть всего объема геля. Например, широко применяемые гели полимеров акриловой кислоты в зависимости от концентрации полимера и его природы содержат от 50 до 90% воды.

Для иммобилизации ферментов в геле существует два основных способа. При одном из них фермент помещают в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате чего образуется полимерный гель с включенными в него молекулами фермента. В реакционную смесь часто добавляют также бифункциональные (содержащие в молекуле две двойные связи) сшивающие агенты, которые придают образующемуся полимеру структуру трехмерной сетки. В другом случае фермент вносят в раствор готового полимера, который затем каким-либо образом переводят в гелеобразное состояние. Способ иммобилизации ферментов путем включения в полимерный гель позволяет создавать препараты любой геометрической конфигурации, обеспечивая при этом равномерное распределение биокатализатора в объеме носителя. Метод универсален, применим для иммобилизации практически любых ферментов, полиферментных систем, клеточных фрагментов и клеток. Фермент, включенный в гель, стабилен, надежно защищен от инактивации вследствие бактериального заражения, так как крупные клетки бактерий не могут проникнуть в мелкопористую полимерную матрицу. В то же время, эта матрица может создавать значительные препятствия для диффузии субстрата к ферменту, снижая каталитическую эффективность иммобилизованного препарата, поэтому для высокомолекулярных субстратов данный метод иммобилизации не применим вообще.

Общий принцип иммобилизации ферментов с использованием мембран заключается в том, что водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой перегородкой. Полупроницаемая мембрана легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но непреодолима для крупных молекул фермента. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой. Водный раствор фермента можно включать внутрь

микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (микрокапсулирование). При двойном эмульгировании получается водная эмульсия из капель органического раствора полимера, содержащих, в свою очередь, еще более мелкие капли водного раствора фермента. Через некоторое время растворитель затвердевает, образуя сферические полимерные частицы с иммобилизованным в них ферментом. Если вместо водонерастворимого отвердевающего полимера используются жидкие углеводороды с высокой молекулярной массой, метод называется иммобилизацией путем включения в жидкие мембраны. К модификациям метода иммобилизации ферментов с использованием полупроницаемых оболочек относятся также включение в волокна (при этом вместо капель, содержащих ферменты, получаются нити) и включение в липосомы. Применение систем мембранного типа позволяет получать иммобилизованные препараты с высоким содержанием фермента. Метод, как и предыдущий, достаточно универсален, т.е. применим как ферментам, так и к клеткам, а также их фрагментам. Благодаря высокому отношению поверхности к объему и малой толщине мембраны удается избежать значительных диффузионных ограничений скорости ферментативных реакций. Основной недостаток мембранных систем - невозможность ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов.

При иммобилизации ферментов с использование систем двухфазного типа ограничение свободы перемещения фермента в объеме системы достигается благодаря его способности растворяться только в одной из фаз. Субстрат и продукт ферментативного превращения распределяются между обеими фазами в соответствии с их растворимостями в этих фазах. Природа фаз подбирается таким образом, что продукт накапливается в той из них, где фермент отсутствует. После завершения реакции эту фазу отделяют и извлекают из нее продукт, а фазу, содержащую фермент, вновь используют для проведения очередного процесса. Одним из важнейших преимуществ систем двухфазного типа является то, что они позволяют осуществлять ферментативные превращения макромолекулярных субстратов, которые невозможны при применении жестких носителей с ограниченным размером пор.

Главным отличительным признаком химических методов иммобилизации является то, что путем химического взаимодействия на структуру фермента в его молекуле создаются новые ковалентные связи, в частности между белком и носителем. Препараты иммобилизованных ферментов, полученные с применением химических методов, обладают по крайней мере двумя важными достоинствами. Во-первых, ковалентная связь фермента с носителем обеспечивает высокую прочность образующегося конъюгата. При широком варьировании таких условий, как pH и температура, фермент не десорбируется с носителя и не загрязняет целевых продуктов катализируемой им реакции. Это особенно важно при реализации процессов медицинского и пищевого назначения, а также для обеспечения устойчивых,

воспроизводимых результатов в аналитических системах. Во-вторых, химическая модификация ферментов способна приводить к существенным изменениям их свойств, таких как субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность. Химическая иммобилизация ферментов является искусством, уровень которого определяется, в первую очередь, умением экспериментатора. Основная задача экспериментатора заключается в формировании новых ковалентных связей в молекуле фермента при использовании его функциональных групп, несущественных для проявления его каталитической активности. При химической модификации фермента его активный центр желательно защищать. При сопоставлении различных приемов иммобилизации химические методы для крупномасштабных биотехнологических процессов кажутся малопривлекательными из-за сложности и дороговизны. В промышленных процессах обычно используются те или иные методы физической иммобилизации.

Применение иммобилизованных ферментов. Особенно ощутимый вклад иммобилизованные ферменты внесли в тонкий органический синтез, в анализ, в медицину, в процессы конверсии энергии, в пищевую и фармацевтическую промышленности.

Для синтетической органической химии важно то, что в двухфазных реакционных средах фермент сохраняет каталитическую активность даже при исключительно малом содержании воды, поэтому равновесие катализируемой реакции (выход продукта) экспериментатор может регулировать в широких пределах, подбирая нужный органический растворитель. Иммобилизованные ферменты дали толчок к созданию принципиально новых методов "безреагентного" непрерывного анализа многокомпонентных систем органических (в ряде случаев и неорганических) соединений.

В будущем важную роль в контроле окружающей среды и в клинической диагностике должны сыграть такие методы, как биолюминесцентный анализ и иммуноферментный анализ.

В медицине иммобилизованные ферменты открыли путь к созданию лекарственных препаратов пролонгированного действия со сниженной токсичностью и аллергенностью. Иммобилизационные подходы способствуют решению проблемы направленного транспорта лекарств в организме.

Проблемы биоконверсии массы и энергии в настоящее время пытаются решить микробиологическим путем. Тем не менее иммобилизованные ферменты вносят ощутимый вклад в осуществление фотолиза воды и в биоэлектрокатализ.

Заслуживает внимание и использование иммобилизованных ферментов в процессах переработки лигноцеллюлозного сырья.

Иммобилизованные ферменты могут использоваться и как усилители слабых сигналов. На активный центр иммобилизованного фермента можно подействовать через носитель, подвергая последний ультразвуковой

обработке, механическим нагрузкам или фотохимическим превращениям. Это позволяет регулировать каталитическую активность системы фермент - носитель под действием механических, ультразвуковых и световых сигналов. На этой основе были созданы механо- и звукочувствительные датчики и открыт путь к бессеребряной фотографии.

Промышленные процессы с применением иммобилизованных ферментов внедрены прежде всего в пищевую и фармацевтическую промышленность. В пищевой промышленности с участием иммобилизованных ферментов идут процессы получения глюкозо-фруктовых сиропов, глюкозы, яблочной и аспарагиновой кислоты, оптически активных L- аминокислот, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки и др.

В медицине иммобилизованные ферменты используются также как лекарственные препараты, особенно в тех случаях, когда необходимо локальное воздействие. Кроме того, биокатализаторы широко используются в различных аппаратах для перфузионной очистки различных биологических жидкостей. Возможности и перспективы использования в медицине ферментов в иммобилизованном состоянии гораздо шире, чем достигнутые на сегодняшний день, именно на этом пути медицину ждет создание новых высокоэффективных методов лечения.

Иммобилизация клеток.

В 70-х годах XX века появились первые публикации об иммобилизации клеток микроорганизмов, а первое промышленное применение иммобилизованных клеток было осуществлено в Японии в 1974 г. С их помощью получали аспарагиновую кислоту.

Иммобилизованные клетки имеют ряд преимуществ как перед иммобилизованными ферментами, так и перед свободными клетками:

- отсутствие затрат на выделение и очистку ферментов;
- снижение затрат на выделение и очистку продуктов реакции;
- более высокая активность и стабильность;
- возможность создания непрерывных и полунепрерывных автоматизированных процессов;
- способность к длительному функционированию полиферментных систем без экзогенных кофакторов.

Для иммобилизации могут быть использованы клетки в различном состоянии: живые и поврежденные в различной степени. Одностадийные реакции могут осуществлять и живые, и поврежденные клетки. Полиферментные реакции проводят с применением живых клеток, которые могут длительное время регенерировать АТФ и коферменты (НАДФ, НАД).

Проблема использования ферментативной активности иммобилизованных микроорганизмов имеет глубокие корни. Более 150 лет назад быстрый способ получения уксуса был основан на применении микроорганизмов, адсорбированных на древесной стружке. Методы иммобилизации клеток схожи с методами иммобилизации ферментов.

Химический метод основан на образовании ковалентных связей с активированным носителем, на поперечной сшивке клеток за счет активных

групп в клеточной оболочке с бифункциональными реагентами (например, глутаровым альдегидом)

К физическим методам относятся адсорбция и агрегация.

Иммобилизация клеток путем включения в различные гели, мембраны, волокна основана на химических и физических взаимодействиях. Химические методы используются реже по сравнению с другими методами и малопригодны для иммобилизации живых клеток. Гораздо большее распространение получило включение клеток в состав гелей, мембран и волокон. При таком способе иммобилизации клетки могут сохранять жизнеспособность и в присутствии питательной среды размножаться в приповерхностных слоях гелей. Биокаталитическая активность целых иммобилизованных клеток в настоящее время может быть использована в различных отраслях науки и техники:

- при биосинтезе и трансформации таких соединений, как аминокислоты, органические кислоты, антибиотики, стероиды углеводы, углеводороды, нуклеотиды и нуклеозиды;
- в пивоварении и виноделии;
- при очистке сточных и природных вод;
- при извлечении металлов из сточных вод;
- при ассимиляции солнечной энергии;
- при изготовлении водородных солнечных элементов;
- в азотфиксации;
- в аналитических целях при изготовлении электродов.

Наибольшее количество исследований по иммобилизации клеток микроорганизмов проведено японскими исследователями. Особые успехи были достигнуты ими в области синтеза аминокислот, органических кислот и антибиотиков. В Московском государственном университете был разработан метод получения аспарагиновой кислоты, который по эфективности не уступает японским. Клетки E.coli, включенные в армированный полиакриламидный гель, были с успехом использованы для получения аспарагиновой кислоты, период полужизни катализатора - 110 суток. Иммобилизовать можно не только клетки микроорганизмов, но и клетки растительных и животных тканей, используя их для синтеза физиологически активных соединений.

Интересные возможность открываются и при иммобилизации клеточных органелл как активных полиферментных систем. Все это свидетельствует о перспективности развития одного из направлений биотехнологии, связанного с изучением и применением иммобилизованных клеток.

Получение ферментов с помощью микроорганизмов более выгодно, чем из растительных и животных источников. Микробные клетки продуцируют более 2 тысяч ферментов, катализирующих биохимические реакции, связанные с ростом, дыханием и образованием продуктов. Многие из этих ферментов могут быть выделены и проявляют свою активность независимо от клетки. Для получения ферментных препаратов используют как микроскопические грибы, так и бактерии и дрожжи. Иногда получение

технического ферментного препарата кончается проведением процесса ферментации, однако активность ферментов в культуральной жидкости быстро снижается. Поэтому широко практикуют получение сухих технических ферментных препаратов.

В мире производится около 20 ферментов в объеме 65 тыс. тонн (а существует, как предполагают 25000 ферментов). Например, промышленным способом производят такие ферменты как амилаза, глюкоамилаза, протеаза, инвертаза, пектиназа, каталаза, стрептокиназа, целлюлаза и др.

Амилазы и протеазы используют в текстильной, хлебопекарной и кожевенной промышленности. Пектолитические ферменты могут быть использованы для мацерации тканей при переработке растительного сырья, например при получении льноволокна. Щелочные протеазы, особенно иммобилизованные, очень эффективно используются в составе моющих средств. Кроме протеолитических ферментов в состав моющих средств вводят липазу, целлюлазу, оксидазу и амилазу для удаления загрязнений крахмального происхождения. Использование иммобилизованной глюкозоизомеразы для непрерывного получения глюкозы является наиболее крупным процессом такого рода в мире.

Микробные ферменты активно используют в клинической диагностике при определении уровня холестерина в крови и мочевой кислоты. Ферменты предлагают использовать для очистки канализационных и водопроводных труб и т.д. и т.п. Ферменты для медицинских или аналитических целей должны быть высокоочищенными.

В биологических объектах ферменты обычно находятся в фиксированном состоянии на поверхности различных клеточных структур - наиболее часто на мембранах. Благодаря этому ферменты сохраняют свою активность длительное время. В технологии долгое время применялись препараты свободных ферментов; в таком состоянии срок их использования был коротким - один производственный цикл. Для повышения стабильности выделенных ферментов используют технику иммобилизации, т.е. связывания ферментов на поверхности нерастворимого в воде носителя, например, органических полимеров, стекла, минеральных солей, силикатов и т.п. Иммобилизованные ферменты можно длительное время использовать в биохимических реакторах в условиях непрерывного процесса.

Вопросы для самоконтроля

1. Каковы пути получения ферментных препаратов?
2. Как получают иммобилизованные ферменты?
3. Где используются иммобилизованные ферменты?
4. Что представляет собой иммобилизация клеток?

Лекция 8 . Производство аминокислот, органических кислот, витаминов

План

1. Продуценты лимонной и уксусной кислоты.
2. Получение аминокислот в производстве.
3. Синтез витаминов с помощью микроорганизмов.

Производство аминокислот относится к одной из наиболее передовых областей биотехнологии. Аминокислоты получают путем химического синтеза или экстракцией из белковых гидролизатов.

Незаменимые аминокислоты могут получаться микробиологическим путем более эффективно, чем путем химического синтеза, так как при биологическом синтезе используемые микроорганизмы образуют аминокислоты в биологически активной L-форме. Как продуценты лизина изучаются *Brevibacterium lactofermentum* и бактерии рода *Corynebacterium,* также предложены способы биотехнологического получения изолейцина, треонина при использовании *E. coli.* Большинство исследованных штаммов микроорганизмов независимо от их систематического положения преимущественно накапливают L-аланин и глутаминовую кислоту. Значительно меньше штаммов и в меньшем количестве выделяют аспарагиновую кислоту, лейцин, валин, изолейцин, лизин. За рубежом 60% мощностей по производству аминокислот занимают глутаминовая кислота, далее идут метионин, лизин и глицин. Глутаминовая кислота производится при участии в качестве продуцента штамма *Corynebacterium.*

С помощью микроорганизмов можно получить до 60 органических кислот. Многие из них получаются в промышленном масштабе - итаконовая, молочная, уксусная, лимонная, яблочная, янтарная.

Эти пищевые кислоты используются как регуляторы кислотности и консерванты. Лимонную кислоту получают с помощью *Yarrowia lipolytica, Aspergillus niger*, молочную – *Endomycopsis fibuligera, Rhisopus oryzae, Lactobacillus casei*, янтарную – *Anaerobiospirillum succiniproducens.*

Уксусную кислоту получают путем микробиологической конверсии водорода и углекислого газа бактериями *Acetobacterium woodi* и *Clostridium aceticum.*

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 её применяют для их очистки. Объем мирового производства цитрата составляет 400 тыс. т/год. Производство лимонной кислоты принадлежит к числу старейших промышленных микробиологических процессов: оно было организовано в 1893 г. Для промышленного производства лимонной кислоты используют главным образом культуру гриба *Aspergillus niger.* Метаболическим источником лимонной кислоты в организме служит цикл трикарбоновых

кислот. Реакция образования лимонной кислоты, катализируемая цитратсинтазой, открывает цикл Кребса. 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. Скорость оборота цикла Кребса определяется поддержанием необходимого уровня окисленных форм коферментов дегидрогеназ, поэтому высокий выход цитрата получается лишь при условии хорошей аэрации. Дефицит фосфата ведет к сверхпродукции цитрата.
Одновременно с лимонной было налажено производство молочной кислоты при участии молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus.*

С 20-х годов налажено промышленное производство D-глюконовой кислоты из глюкозы при участии *A.niger.* Глюконат натрия, в виде которого обычно выделяют глюконовую кислоту, используют для извлечения металлов, борьбы со ржавчиной, как моющее средство и в качестве медицинского препарата.

Микроорганизмы содержат много витаминов, которые чаще всего входят в состав ферментов. Состав и количество витаминов в биомассе зависят от биологических свойств данной культуры микроорганизмов и условий культивирования. Некоторые витамины микроорганизмы синтезируют, другие, напротив, усваивают в готовом виде из окружающей среды. Культура, способная синтезировать какой-либо витамин, называется автотрофной по отношению к нему, если культура не способна синтезировать данный витамин, она является авто-гетеротрофной.

Витамины синтезируют в основном химическим путем или получают из естественных источников. Однако эргостерин, рибофлавин (B_2), витамин B_{12} и аскорбиновую кислоту (микроорганизмы используются как селективные окислители сорбита в сорбозу при производстве витамина С) получают микробиологическим путем. Для синтеза витаминов B_1, B_2, B_6, B_{12} и аскорбиновой кислоты также используют кефирные грибки, а бифидобактерии – группы В, РР (никотиновая кислота) и Н, однако пока эти микроорганизмы не используются как продуценты витаминов в промышленных масштабах.

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.

Получение витамина В2 (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 *Eremothecium ashbyii,* способный при выращивании на 1 т питательной смеси синтезировать 25 кг витамина В2. Сверхсинтеза рибофлавина добиваются действием на дикие

штаммы мутагенов, нарушающих механизм ретроингибирования синтеза витамина В2, флавиновыми нуклеотидами. Отбор мутантов ведут по устойчивости к аналогу витамина В2 – розеофлавину.

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 большее по сравнению с *E. ashbyii* количество рибофлавина всего за 40 ч ферментации.

Получение витамина В12 (цианокобамид). 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, метанобразующие и фотосинтезирующие бактерии, одноклеточные водоросли. В 70-х годах XX в. интерес ученых привлекли пропионовокислые бактерии, известные ещё с 1906 г. и широко использующиеся при приготовлении препаратов животноводства. Выделено 14 видов пропионовокислых бактерий, продуцирующих витамин В12.

Получение β-каротина и витамина D2. 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.

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.

Изменяя условия среды, содержание отдельных витаминов можно увеличить. Так, количество рибофлавина зависит от интенсивности аэрации и содержания железа в среде. Количество витаминов в клетках, а также их выделение из последних можно изменить при помощи микроэлементов. Существует производство рибофлавина на основе использования

дрожжеподобных грибов *Eremothecium ashbyii* и *Ashbia gossypii*. Рибофлавин продуцируется также видами *Clostridium* и *Ascomycetes*. Микроводоросль *Dunalieiia viridis* культивируется с целью получения β-каротина.

Микроорганизмы являются источником получения липидов специального назначения с заранее определенными свойствами. Микробные жиры заменяют растительные (а в ряде случаев и превосходят)и могут использоваться в разных отраслях промышленности, с.-х., медицине.

Получение пищевых ароматизаторов микробиологическим путем может быть более выгодным и продуктивным, чем их химический синтез или другие традиционные способы. Так, в США был разработан экологически безопасный биокаталитический способ синтеза ванилина из глюкозы с использованием генетически модифицированного штамма E. coli и грибного фермента дегидрогеназы. Аромат ванилина при биотехнологическом его получении оказался в несколько раз интенсивнее обычного.

Весьма перспективно использование грибных культур в качестве продуцентов сырных, грибных, рыбных ароматизаторов. Освоены биотехнологические способы получения веществ, имитирующих ароматы земляники, малины, банана, кокоса, яблока, персика, миндаля.

Микроорганизмы являются важным источником получения полимерных материалов на основе полисахаридов. Ценным микробным полисахаридом является декстран, образуемый бактериями рода *Leucomonstoc.* Декстран служит основой получения медицинских препаратов (кровезаменителей) и препаратов для биохимических исследований - сефадексов и др. молекулярных сит. Нуклеозиды, нуклеотиды и их производные также можно получать с помощью микроорганизмов.

Большинство пищевых красителей синтезируют химическим путем, но некоторые натуральные пигменты микроорганизмов могут быть с успехом использованы в качестве красителей для пищевых продуктов. Так, из гриба *Monascus* получен натуральный красный пищевой краситель.

Из бактерий с Канарских островов получен розовый краситель для мороженого, крема, мыла. Такие красители безвредны и придают стойкий цвет продуктам, что позволяет предположить, что в будущем микробиологическому производству красителей будет уделяться больше внимания, чем в настоящее время.

Вопросы для самоконтроля

1. Как можно получить аминокислоты методами биотехнологии?
2. Какие микроорганизмы используются для производства витаминов?
3. Как используются органические кислоты в пищевой промышленности?

Лекция 9 . Биоконверсия лигноцеллюлозных объектов

План

1. Представители молочнокислых бактерий.
2. Растительная биомасса и ее компоненты.
3. Биотехнологические производства.
4. Основные этапы развития гидролизных производств

Растительная биомасса - возобновляемый и легкодоступный источник сырья. Основные ее компоненты - целлюлоза (2/3), крахмал, гемицеллюлоза, лигнин. Лигнин - высокомолекулярный нерастворимый трехмерный неупорядоченный ароматический полимер. Целлюлоза - высокомолекулярный нерастворимый полимер глюкозы. Она является главным компонентом как растительной биомассы, так и сельскохозяйственных, бытовых отходов, а также отходов деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности.

Полисахари́ды — общее название класса сложных высокомолекулярных углеводов, молекулы которых состоят из десятков, сотен или тысяч мономеров — моносахаридов. Полисахариды необходимы для жизнедеятельности животных и растительных организмов. Они являются одним из основных источников энергии, образующейся в результате обмена веществ организма. Они принимают участие в иммунных процессах, обеспечивают сцепление клеток в тканях, являются основной массой органического вещества в биосфере. Классификация полисахаридов:

К полисахаридам относятся вещества, построенные из большого числа остатков моносахаридов или их производных. Если полисахарид содержит остатки моносахарида одного вида, его называют гомополисахаридом. В том случае, когда полисахарид составлен из моносахаридов двух видов или более, регулярно или нерегулярно чередующихся в молекуле, его относят к гетерополисахаридам.

К полисахаридам относятся, в частности:

декстрин — полисахарид, продукт гидролиза крахмала;

крахмал — основной полисахарид, откладываемый, как энергетический запас у растительных организмов;

гликоген — полисахарид, откладываемый, как энергетический запас в клетках животных организмов, но встречается в малых количествах и в тканях растений;

целлюлоза — основной структурный полисахарид клеточных стенок растений;

хитин — основной структурный полисахарид экзоскелета насекомых и членистоногих, а также клеточных стенок грибов;

галактоманнаны — запасные полисахариды некоторых растений семейства бобовых, такие как гуаран и камедь рожкового дерева;

глюкоманнан — полисахарид, получаемый из клубней конняку, состоит из чередующихся звеньев глюкозы и маннозы, растворимое пищевое волокно, уменьшающее аппетит;

амилоид — применяется при производстве пергаментной бумаги.

В основе биологической деградации лигноцеллюлозы лежит действие целлюлолитических ферментов. Реакционная способность природных целлюлозосодержащих материалов невелика, поэтому сырье для ферментативного осахаривания целлюлозы должно иметь большую поверхность, а микрофибриллярная структура целлюлозы должна быть разрушена. Реакционную способность природных субстратов также снижает наличие лигнина. Наиболее эффективным, а также дорогим и энергоемким способом предварительной подготовки сырья является размол. Поэтому для предобработки используют воздействие 0.5-2% растворов щелочи, гамма-облучение, механо-термообработку в разбавленной серной кислоте с последующей экстракцией лигнина и др. методы.

Гидролиз можно проводить и биологическим способом, с помощью ферментов, выделяемых грибами видов *Trichoderma, Aspergillus, Sporotrichum.* Далее при использовании дрожжей можно получить спирт, при использовании бактерий *Klebsiella* или *Aeromonas* - бутанол. Ряд микроорганизмов рода *Clostridium* могут продуцировать уксусную и молочную кислоты, лактат, ацетон из опилок, соломы, отходов сахарного тростника. С помощью *Trichoderma reesii* биомасса разлагается до сахаров.

Ферменты и неразложившаяся целлюлоза поступают в повторные циклы, а остаточный лигнин используется в качестве источника энергии для перегонки спирта. Технология, разработанная в Арканзасском университете и используемая в промышленности нефтяной компанией «Галф ойл», заключается в одновременном осахаривании целлюлозы и сбраживании сахаров, полученных путем гидролиза. Для этого к смеси целлюлозной биомассы и дрожжей добавляют раствор целлюлаз.

Остающийся лигнин также используется для перегонки в качестве топлива, но пентозы не сбраживаются. Фирма «Био фьюэл индастриз» из Ричмонда построила в шт. Вирджиния фабрику, на которой в 1985 производилось 500 т этилового спирта в сутки из 2500 т целлюлозных отходов посредством этой технологии и целлюлаз из *Trichoderma reesii.*

Третий вид технологии состоит в прямом сбраживании целлюлозными бактериями гексоз и пентоз, образующихся при гидролизе целлюлозы и гемицеллюлоз. Преимущества этой технологии, разработанной в лабораториях Массачусетского технологического института, заключаются в следующем: помимо одновременной конверсии целлюлоз и пентоз в этанол происходит комбинация целлюлозного и спиртового брожения, а, кроме того, необходимая предварительная обработка субстратов сводится к минимуму.

При микробной деградации и конверсии целлюлоз и гемицеллюлоз можно получать этиловый спирт и сырье для химической промышленности (фурфурол, фенолы, крезолы). 200 000 т надлежащим образом переработанной соломы дают 50 000 т этанола и 20 000 т фурфурола. По

оценкам некоторых специалистов, при микробной переработке целлюлозы можно получить до 30% нефтехимикатов.

Методы генной инженерии помогут создать штаммы, которые будут лучше адаптированы к этим типам конверсии и дадут больший выход. Это позволит разработать реальную стратегию замещения, которая станет эффективной после 2000 г. (к тому времени химия углерода придет на смену нефтехимии при производстве новых биополимеров, биорастворителей и биодетергентов). Перенос генов целлюлаз и гемицеллюлаз из *Clostridium thermocellum* в другие виды *Clostridium* позволит превращать целлюлозы и гемицеллюлозы в этиловый спирт, ацетон, бутанол, уксусную и молочную кислоты.

Термофилия определенных штаммов *Clostridium* (при оптимальной температуре роста 65—75° С) создает известные преимущества, так как стоимость перегонки этилового спирта и других растворителей уменьшится, а это сделает производственный процесс более экономичным.

Исследователи из Университета Нового Южного Уэльса (Австралия) и Рутгерского университета (США) обнаружили, что бактерия *Zymomonas mobilis,* выделяемая из пальмового вина и мексиканского алкогольного напитка пульке, сбраживает сахара вдвое быстрее, чем дрожжи. Этот вид также подвергается геномной модификации, которая позволит разлагать целлюлозу с одновременным сбраживанием сахаров, получающихся в ходе деградации.

В условиях строгого анаэробиоза можно осуществлять биометаногенез ароматических соединений. Этот процесс, надо полагать, широко распространен в природе, особенно в отходах и сточных водах, а также при конверсии некоторых биоцидов. По наблюдениям Ферри и Вольфа, в этом процессе участвуют несколько видов микробов, ответственных за различные стадии деградации ароматических колец до ацетата, который является одним из субстратов для метанобактерий (иными словами, его дегидрирование дает электроны, требующиеся для восстановления двуокиси углерода в метан). Среди бактерий видов превалируют, судя по всему, *Methanobacterium formicicum* и *Methanospirillum hungati*. Ферри и Вольфу удалось их вывести в чистые культуры.

Бензольное кольцо сначала восстанавливается и затем разрезается на алифатические кислоты под действием грамотрицательных микроорганизмов. Последние превращаются в субстраты, используемые метанобактериями. Образующиеся электроны, вероятно, способствуют образованию водорода, который восстанавливает CO_2 в CH_4.

Разложение бензольного кольца в метан в процессе анаэробиоза не является правилом. Например, в рубце жвачных животных бензоат и ароматические кислоты, получающиеся за счет деградации целлюлозы, не приводят к образованию метана; их можно обнаружить в моче и виде гиппуратов и других сходных соединений. В природных условиях ароматические соединения получаются при медленном разложении таннинов и лигнина главным образом благодаря внеклеточным микробным ферментам.

Так как лигнины и таннины составляют значительную часть почвенного органического материала, метаногенез этих полимеров - важный процесс в углеродном цикле биосферы.

Одним их отходов сельского хозяйства является солома. Эти отходы трудно использовать, так как скорость разложения соломы невелика. Лучшая утилизация - инокулирование её ассоциацией целлюлолитических грибов, азотфиксирующих и полисахаридообразующих бактерий. В таком виде солому можно запахивать в землю как органическое удобрение, а можно через определенное время использовать как *высокобелковый витаминизированный корм*.

Биотехнологические объекты находятся на разных ступенях организации:

а) субклеточные структуры (вирусы, плазмиды, ДНК митохондрий и хлоропластов, ядерная ДНК);

б) бактерии и цианобактерии;

в) грибы;

г) водоросли;

д) простейшие;

е) культуры клеток растений и животных;

ж) растения – низшие (анабена-азолла) и высшие – рясковые.

Микроорганизмов, синтезирующих продукты или осуществляющих реакции, полезные для человека, несколько сотен видов. Биотехнологические функции бактерий разнообразны. Бактерии используются при производстве: - пищевых продуктов, например, уксуса (*Gluconobacter suboxidans),* молочнокислых напитков (*Lactobacillus, Leuconostoc*) и др.; - микробных инсектицидов (*Bacillus thuringiensis);* - белка (*Methylomonas*); - витаминов (*Clostridium* - рибофлавин); - растворителей и органических кислот; - биогаза и фотоводорода.

Полезные бактерии относятся к эубактериям. Уксуснокислые бактерии, представленные родами *Gluconobacter* и *Acetobacter,* - это грамотрицательные бактерии, превращающие этанол в уксусную кислоту, а уксусную кислоту в углекислый газ и воду. Род *Bacillus* относится к грамположительным бактериям, которые способны образовывать эндоспоры и имеют перитрихиальное жгутикование. *B.subtilis* - строгий аэроб, а *B.thuringiensis* может жить и в анаэробных условиях. Анаэробные, образующие споры бактерии представлены родом *Clostridium. C.acetobutylicum* сбраживает сахара в ацетон, этанол, изопропанол и n-бутанол (ацетобутаноловое брожение), другие виды могут также сбраживать крахмал, пектин и различные азотсодержащие соединения.

К молочнокислым бактериям относятся представители родов *Lactobacillus, Leuconostoc* и *Streptococcus*, которые не образуют спор, грамположительны и нечувствительны к кислороду. Гетероферментативные молочнокислые бактерии рода *Leuconostoc* превращают углеводы в молочную кислоту, этанол и углекислый газ. Гомоферментативные молочнокислые бактерии рода *Streptococcus* продуцируют только молочную

кислоту, а брожение, осуществляемое представителями рода *Lactobacillus*, позволяет получить наряду с молочной кислотой ряд разнообразных продуктов.

К бактериям рода *Corynebacterium,* неподвижные грамположительные клетки которых не образуют эндоспор, относятся патогенные (*C.diphtheriae, C.tuberculosis)* и непатогенные почвенные виды, имеющие промышленное значение. *C.glutamicum* служит источником лизина и улучшающих вкус нуклеотидов. Коринебактерии хотя и считаются факультативными анаэробами, лучше растут аэробно. Бактерии используются для микробного выщелачивания руд и утилизации горнорудных отходов.

Широко используется такое свойство некоторых бактерий, как *диазотрофность*, то есть способность к фиксации атмосферного азота.

Выделяют 2 большие группы диазотрофов:

- симбионты: без корневых клубеньков (азотобактер - лишайники, азоспириллум - лишайники, анабена – лишайники, азолла), с корневым клубеньками (бобовые – ризобии, ольха, лох, облепиха – актиномицеты);
- свободноживущие: гетеротрофы (азотобактер, клостридиум, метилобактер), автотрофы (хлоробиум, родоспириллум и амебобактер).

Микробные клетки используют для трансформации веществ.

Бактерии также широко используются в генноинженерных манипуляциях при создании геномных клонотек, введении генов в растительные клетки (агробактерии).

Производственные штаммы микроорганизмов должны соответствовать определенным требованиям: способность к росту на дешевых питательных средах, высокая скорость роста и образования целевого продукта, минимальное образование побочных продуктов, стабильность продуцента в отношении производственных свойств, безвредность продуцента и целевого продукта для человека и окружающей среды.

В связи с этим все микроорганизмы, используемые в промышленности проходят длительные испытания на безвредность для людей, животных и окружающей среды. Важным свойством продуцента является устойчивость к инфекции, что важно для поддержания стерильности, и фагоустойчивость.

Все цианобактерии обладают способностью к азотфиксации, что делает их весьма перспективными продуцентами белка. Анабена (*Anabaena*) - нитчатая сине-зеленая водоросль. Нити из более или менее округлых клеток, содержат гетероцисты и иногда крупные споры, по всей длине нить одинаковой толщины. В цитоплазме клеток откладывается близкий к гликогену запасной продукт - анабенин. Такие представители цианобактерий, как носток, спирулина, триходесмиум съедобны и непосредственно употребляются в пищу. Носток образует на бесплодных землях корочки, которые разбухают при увлажнении. В Японии местное население использует в пищу пласты ностока, образующиеся на склонах вулкана и называет их ячменным хлебом Тенгу (Тенгу - добрый горный дух).

Свое шествие спирулина (*Spirulina platensis*) начала из Африки — население района озера Чад давно употребляет ее в пищу, называя этот

продукт «дихе». Другое место, откуда начала распространяться спирулина, но иного вида (*Spirulina maxima*) — воды озера Тескоко в Мексике. Еще ацтеки собирали с поверхности озер и употребляли в пищу слизистую массу сине-зеленой водоросли спирулины. Впервые галеты "текуитлатл" упомянуты испанцем Кастильо в 1521 г. Эти галеты продавались на базаре в Мехико и состояли из высушенных слоев *S.maxima*. В 1964 году бельгийский ботаник Ж.Леонар обратил внимание на галеты сине-зеленого цвета, которые местное население изготовляло из водорослей, растущих в щелочных прудах вокруг озера Чад. Эти галеты представляли собой высушенную массу спирулины. Анализ образцов *Spirulina* показал, что в ней содержится 65% белков (больше, чем в соевых бобах), 19% углеводов, 6% пигментов, 4% липидов, 3% волокон и 3% золы. Для белков этой водоросли характерно сбалансированное содержание аминокислот. Клеточная стенка этой водоросли хорошо переваривается. Как озеро Тескоко, так и водоемы района озера Чад имеют в воде очень высокое содержание щелочей. Характерно, что в таких озерах спирулина полностью доминирует и растет почти как монокультура — составляет в отдельных озерах до 99 % общего количества водорослей. Растет спирулина в щелочной среде при pH вплоть до 11. Ее собирают также из озер около г. Мехико, получая до 2 т сухого веса биомассы водоросли в сутки, и эта продукция рассылается в США, Японию, Канаду. В других странах спирулину культивируют обычно в искусственных водоемах или специальных емкостях. Спирулину можно культивировать в открытых прудах или, как в Италии, в замкнутой системе из полиэтиленовых труб. Урожайность очень высокая: получают до 20 г сухой массы водоросли с 1 $м^2$ в день, а расчеты на год показали, что она превысит выход пшеницы примерно в 10 раз.

Преимущества спирулины по сравнению с другими съедобными водорослями не только в простоте культивирования, но и в несложности сбора биомассы, высушивания ее, например, под солнцем. В ряде стран выращивают спирулину вида *Spirulina platensis.* Недавно было показано, что в клетках спирулины, помимо ценного белка, углеводов, липидов, витаминов, в значительных количествах запасается, например, такое ценное вещество, как поли-b-оксибутират. Отечественная фармацевтическая промышленность выпускает препарат «Сплат» на основе цианобактерии *Spirulina platensis*. Он содержит комплекс витаминов и микроэлементов и применяется как общеукрепляющее и иммуностимулирующе средство.

Основные этапы развития гидролизных производств. Созданию гидролизной промышленности предшествовали многолетние исследовательские и опытные работы, которые обеспечили необходимые предпосылки для разработки современной *технологии* гидролиза растительного сырья и получения *этанола*, кормовых *дрожжей*, *фурфурола*, *ксилита* и других продуктов.

В 1811 году впервые систематические исследования по гидролизу растительного полисахарида — *крахмала* провёл в Петербурге Константин Кирхгоф. При гидролизе крахмала 0,5%-ным раствором C_2H_5OH при

кипячении в течение 24—25 ч из 100 кг крахмала им было получено 75 кг кристаллической *глюкозы*.

В 1819 году французский химик Браконно получил глюкозу при гидролизе льняного полотна и древесины 91,5%-ной *серной кислотой*.

В 1822 году русский химик П. Фогель для гидролиза древесины и других целлюлозных материалов предложил применять 87%-ную H_2SO_4, которая не вызывала обугливания части вещества.

В 1832 году — первая публикация немецкого химика Доберейнера о случайном открытии фурфурола при попытке получения *муравьиной кислоты* путём обработки сахара и крахмала с помощью H_2SO_4, а в 1840 г. фурфурол был впервые получен Стейнхаузом из древесных опилок и *соломы*.

1844 год — первые опыты по гидролизу древесины разбавленной серной кислотой в *автоклаве* под повышенным *давлением*, проведённые Пайеном.

1854 год — Пелуз и Арну во *Франции* разработали метод получения винного спирта из древесины путём её гидролиза *концентрированной* серной кислотой при *комнатной температуре*. Этот способ был положен в основу технологии на гидролизной установке, построенной в *Париже* в 1855 г. В том же году в *Брюсселе* Мелсеном была разработана технология получения глюкозы и этанола гидролизом измельчённой древесины 2—5%-ной H_2SO_4 при 100—170 °С.

В 1877 году русский химик М. Чирвинский провёл гидролиз древесных опилок 0,5—1%-ным и *растворами* H_2SO_4 и *HCl* и рекомендовал использовать получаемый сахар для кормовых целей.

В 1891 году Бертраном и *Фишером* впервые был синтезирован *ксилит* путём *восстановления* D— и L—ксилозы *амальгамой натрия*.

В 1894 году шведским химиком Симонсеном предложен следующий режим одноступенчатого гидролиза: продолжительность гидролиза 25 мин при *концентрации* H_2SO_4 0,5 % и температуре 165—170 °С, жидкостной модуль 5, выход сахара 22—23 % от массы древесины, расход H_2SO_4 2,5—3 %. На полузаводской установке по этому методу выход спирта составлял 50—60 л из 1 т абс. сухой древесины.

В 1899 году на опытной установке в *г. Архангельске* под руководством О. Гиллер—Бомбина впервые был испытан батарейный метод гидролиза с последовательным пропусканием гидролизата через ряд автоклавов, в результате чего концентрация сахара повышалась до 12—14 %.

В 1899 году профессор Кляссен в Германии предложил проводить гидролиз древесины *сернистой кислотой*. По этой технологии были построены гидролизно-спиртовые *заводы* во Франции, *Англии* и *США*, которые вскоре были закрыты из-за технических неполадок.

В 1910 году в г. Джорджтаун (США) по методу Симонсена был пущен в эксплуатацию гидролизно-спиртовой завод. Выход спирта на этом заводе достигал 53—73 л из 1 т сухих опилок. В 1913 году по той же технологии был пущен завод в г. Фуллертоне с суточной производственной мощностью 1 000 дал спирта. Заводы работали в течение 5—8 лет.

В 1919 году в *Петрограде* М. М. Шмидтом на Охтенском заводе организовано получение глюкозной патоки и кристаллической глюкозы из древесных опилок и целлюлозы путём гидролиза концентрированной H_2SO_4 с последующей регенерацией кислоты методом *диализа* через растительный пергамент.

В 1922 г. начато освоение промышленной технологии фурфурола в США. Майнер и Браунли на опытно-промышленной установке получили первые тонны фурфурола при переработке овсяной шелухи.

В 1926 году немецким химиком Бергиусом при участии Хегглунда (*Швеция*) была разработана технология гидролиза древесины концентрированной соляной кислотой. Технология проверена на опытной установке в Маннгейме—Рейнау, где в 1933 г. был пущен завод мощностью 6—8 тыс. т кормового сахара в год. С 1934 г. налажено производство кристаллической глюкозы и этанола, с 1939 г. вместо этанола получали пищевые дрожжи. В 1941 г. пущен завод пищевых дрожжей в г. *Регенсбурге* по технологии Бергиуса.

В 1926 г. немецкий химик Шоллер предложил принцип *перколяционного* гидролиза, предусматривающий выведение преобразовавшегося сахара из реакционного объёма током перколирующей кислоты. В 1931 году был пущен первый гидролизный завод в *г. Торнеше*, где проводился многоступенчатый гидролиз древесины (прерывистая перколяция). К 1934 году на этом заводе было получено 6 000 т сахара, из которого выработано 2,5 млн л спирта. В 1936 году пущен завод по технологии Шоллера в *г. Дессау* и в 1937 году — в *г. Хольцминдене* общей мощностью 0,85 млн дал спирта в год.

В 1930 г. было организовано производство первое фурфурола в *СССР* на установках малой мощности.

Перспективы развития гидролитической и биотехнологической переработки растительного сырья. Проекты заводов этанола из биомассы (гидролизные заводы). В 2007 году DOE выделил финансирование трёх проектов в размере $160 млн., но после ежегодного послания президента США, финансирование было увеличено. В своём послании Конгрессу в январе 2007 г. Дж.Буш призвал сократить потребление бензина на 20% за 10 лет (план 20 за 10). Всего инвестиции в шесть биоэнергетических проектов составят $1,2 млрд. Эти заводы ежегодно будут производить из целлюлозы 130 млн. галлонов (490 млн. литров) этанола. Инвестиции будут сделаны:

Abengoa Bioenergy Biomass (Канзас): Грант - $76 млн. Мощность завода 44 млн. литров этанола в год. Ежедневно будет перерабатываться 700 тонн стеблей кукурузы, пшеничной соломы, и др. отходов.

ALICO, Inc. (Флорида): Грант — $33 млн. Мощность завода 54 млн. литров этанола в год, а также ежедневно электроэнергия, 8.8 тонн водорода и 50 тонн аммиака. Ежедневно будет перерабатываться 770 тонн лесных отходов и отходов сахарного тростника.

BlueFire Ethanol (Калифорния): Грант — $40 млн. Мощность — 74 млн. литров этанола в год из 700 тонн в день древесных и растительных отходов.

Broin Companies (Южная Дакота): Грант — $80 млн. Мощность — 484 млн. литров этанола в год из них 25% из целлюлозы. Ежедневно будет перерабатываться 842 тонны соломы и отходов кукурузы.

Iogen Biorefinery Partners (Виргиния): Грант — $80 млн. Мощность — 70 млн. литров этанола в год. Ежедневно будет перерабатываться 700 тонн *соломы пшеницы, ячменя, риса, кукурузы.*

Range Fuels (Колорадо): Грант — $76 млн. Мощность — 160 млн. литров этанола в год и 36 млн. литров метанола. Ежедневно будет перерабатываться 1200 тонн древесных отходов.

Перспективы использования отходов переработки растительного сырья для получения комбинированных биосорбентов. В настоящее время биотехнология активно применяется для решения проблем охраны окружающей среды. Одним из наиболее широко распространенных и перспективных направлений является восстановление почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

Иммобилизация нефтеокисляющих микроорганизмов на носителе позволяет повысить эффективность ликвидации нефтяных загрязнений. В Краснодарском крае в качестве сырья для получения сорбентов целесообразно использовать отходы переработки сельскохозяйственных культур, характеризующиеся высоким содержанием полисахаридов.

Ранее разработанный способ восстановления нефтезагрязненных почв и грунтов с использованием сорбентов на основе подсолнечной лузги с иммобилизованными микроорганизмами биопрепарата «Деворойл» показал высокую эффективность при лабораторных и полевых испытаниях. Биодеградация нефти протекала интенсивнее при использовании комбинированного сорбента, чем при раздельном внесении биопрепарата и сорбента. Степень очистки почв от нефтяных загрязнений в теплый период в течение 6 месяцев составила 96 %.

Получены аналогичные сорбенты из стержней кукурузы. Исследования фитотоксичности почвы подтвердили безвредность предложенного сорбента для почвенных экосистем. В настоящее время ведутся исследования динамики биодеградации различных классов углеводородов нефти.

Вопросы для самоконтроля

1. Что представляют собой полисахариды?
2. Как преобразуются растительные отходы?
3. Каковы перспективы использования отходов переработки растительного сырья?

Лекция 10 . Использование грибов в биотехнологии

План

1. Продукты, получаемые с использованием грибов.
2. Искусственное разведение древоразрушающих грибов.

Биотехнологические функции грибов разнообразны. Их используют для получения таких продуктов, как:

- антибиотики (пенициллы, цефалоспорины);
- гиббереллины и цитокинины (фузариум и ботритис);
- каротиноиды (н-р, астаксантин, придающий мякоти лососевых рыб красно-оранжевый оттенок вырабатывают *Rhaffia rhodozima,* которых добавляют в корм на рыбозаводах);
- белок (*Candida, Saccharomyces lipolitica*);
- сыры типа рокфор и камамбер (пенициллы);
- соевый соус (*Aspergillus oryzae*).

К грибам относятся дрожжи и плесени.

Дрожжи — *внетаксономическая* группа *одноклеточных грибов*, утративших *мицелиальное* строение в связи с переходом к обитанию в жидких и полужидких, богатых органическими веществами *субстратах*. Объединяет около 1500 *видов*, относящихся к *аскомицетам* и *базидиомицетам*. сведения

Границы группы очерчены нечётко: многие *грибы*, способные *вегетативно* размножаться в одноклеточной форме и идентифицируемые поэтому как дрожжи, на других стадиях жизненного цикла образуют развитый *мицелий*, а в ряде случаев и макроскопические плодовые тела. До появления методов молекулярного анализа такие грибы выделяли в особую группу *дрожжеподобных*, но сейчас их все обычно рассматривают вместе с дрожжами. Исследования *18S рРНК* показали близкое родство с типичными дрожжами видов, способных к росту только в виде мицелия.

Размеры дрожжевых клеток обычно составляют 3—7 *мкм* в диаметре. Есть данные, что некоторые виды способны вырастать до 40 мкм.

Дрожжи имеют большое практическое значение, особенно *пекарские или пивные дрожжи* (*Saccharomyces cerevisiae*). Некоторые виды являются факультативными и условными *патогенами*. К настоящему времени полностью расшифрован геном дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (они стали первыми эукариотами, чей геном был полностью секвенирован) и *Schizosaccharomyces pombe*.

Русское слово «дрожжи» восходит к *праславянскому *droždži,* производному от звукоподражательного глагола **drozgati* «давить, месить». Английское слово «*yeast*» (дрожжи) происходит от *староанглийского* «gist», «*gyst*», что означает «пена, кипеть, выделять газ».

Дрожжи, вероятно, одни из наиболее древних «домашних организмов». Тысячи лет люди использовали их для *ферментации* и выпечки. Археологи нашли среди руин *древнеегипетских* городов *жернова* и пекарни, а также изображение пекарей и пивоваров. Предполагается, что *пиво* египтяне начали варить за 6000 лет до н. э., а к *1200 году до н. э.* овладели технологией выпечки дрожжевого *хлеба* наряду с выпечкой пресного. Для начала сбраживания нового субстрата люди использовали остатки старого. В результате в различных хозяйствах столетиями происходила *селекция* дрожжей и сформировались новые физиологические расы, не встречающиеся в природе, многие из которых даже изначально были описаны как отдельные виды. Они являются такими же продуктами человеческой деятельности, как *сорта* культурных растений.

Рисунок 12 – Луи Пастер — учёный, установивший роль дрожжей в спиртовом брожении

В *1680 году* голландский натуралист *Антони ван Левенгук* впервые увидел дрожжи в *оптический микроскоп*, однако не распознал в них из-за отсутствия движения живых организмов. И лишь в *1857 году* французский микробиолог *Луи Пастер* в работе «*Mémoire sur la fermentation alcoholique*» доказал, что *спиртовое брожение* — не просто *химическая реакция*, как считалось ранее, а биологический процесс, производимый дрожжами.

В *1881 году Эмиль Христиан Хансен*, работник лаборатории датской компании *Carlsberg*, выделил *чистую культуру* дрожжей, а в *1883 году* впервые использовал её для получения пива вместо нестабильных заквасок[6]. В конце XIX века при его участии создаётся первая классификация дрожжей, в начале XX века появляются определители и коллекции дрожжевых культур. Во второй половине века наука о дрожжах (*зимология*) помимо

практических вопросов начинает уделять внимание *экологии* дрожжей в природе, *цитологии*, генетике.

До середины XX века учёные наблюдали только половой цикл аскомицетных дрожжей и рассматривали их всех как обособленную таксономическую группу *сумчатых грибов*. Японскому микологу Исао Банно в *1969 году* удалось индуцировать половой цикл размножения у *Rhodotorula glutinis*, которая является базидиомицетом. Современные *молекулярно-биологические* исследования показали, что дрожжи сформировались независимо среди аскомицетных и базидиомицетных грибов и представляют собой не единый таксон, а скорее *жизненную форму*.

24 апреля 1996 года года было объявлено, что *Saccharomyces cerevisiae* стал первым эукариотическим организмом, чей *геном* (12 млн пар оснований) был полностью секвенирован. Секвенирование заняло 7 лет, и в нём принимали участие более 100 лабораторий. Следующим дрожжевым организмом и шестым эукариотом с полностью расшифрованным геномом в 2002 году стал Schizosaccharomyces pombe[1] с 13,8 млн пар оснований.

Аскомицетные и базидиомицетные дрожжи. Различить дрожжи, принадлежащие к разным отделам грибов можно как по характеристикам их жизненного цикла, так и без его наблюдения по признакам аффинитета. К ним относится: синтез каротиноидов (встречается только у базидиомицетных дрожжей), тип убихинонов (с 5—7 изопреноидными остатками у аскомицетных и с 8—10 у базидиомицетных, хотя есть исключения), тип почкования (см. раздел Жизненный цикл), содержание ГЦ пар в ДНК (26—48 % у аскомицетных, 44—70 % у базидиомицетных), наличие уреазы (характерна за несколькими исключениями только базидиомицетным) и др.

Аскомицеты

- *Saccharomycotina*
- *Taphrinomycotina*
- Schizosaccharomycetes

Базидиомицеты

- *Urediniomycetes*
- *Sporidiales*

Особенности метаболизма. Дрожжи являются хемоорганогетеротрофами *и используют* органические соединения как для получения энергии, так и в качестве источника углерода. Им необходим *кислород* для *дыхания*, однако при его отсутствии многие виды способны получать энергию за счёт *брожения* с выделением спиртов (*факультативные анаэробы*). В отличие от *бактерий*, среди дрожжей нет облигатных анаэробов, гибнущих при наличии кислорода в среде. При пропускании *воздуха* через сбраживаемый *субстрат* дрожжи прекращают брожение и начинают дышать (поскольку этот процесс эффективнее), потребляя кислород и выделяя *углекислый газ*. Это ускоряет рост дрожжевых клеток (эффект Пастера). Однако даже при доступе кислорода в случае высокого содержания глюкозы в среде дрожжи начинают

её сбраживать (эффект Кребтри). Микроаэрофильный организм — *микроорганизм*, требующий, в отличие от строгих *анаэробов*, для своего роста присутствия *кислорода* в атмосфере или питательной среде, но в пониженных концентрациях по сравнению с содержанием кислорода в обычном *воздухе* или в нормальных тканях *организма* хозяина (в отличие от *аэробов*, для роста которых необходимо нормальное содержание кислорода в атмосфере или питательной среде).

Многие, но не все, микроаэрофильные бактерии плохо переносят нормальные или повышенные концентрации кислорода в атмосфере, а также проявляют чувствительность к антибактериальным препаратам, действие которых имитирует действие атомарного кислорода (повышение образования свободных радикалов), а именно к нитроимидазолам, *в частности* метронидазолу, тинидазолу.

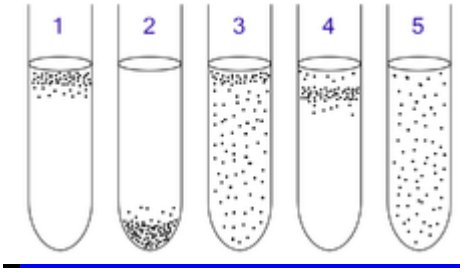


Рисунок 13 - Аэробные и анаэробные бактерии могут быть классифицированы по характеру роста в жидкой питательной среде:
1.Облигатные аэробы
2.Облигатные анаэробы
3.Факультативные анаэробы
4.Микроаэрофилы
5.Аэротолерантные организмы

Дрожжи достаточно требовательны к условиям питания. В анаэробных условиях дрожжи могут использовать в качестве источника энергии только *углеводы*, причём в основном гексозы и построенные из них олигосахариды. Некоторые виды (*Pichia stipitis, Pachysolen tannophilus, Phaffia rhodozyma*) усваивают и пентозы, например, *ксилозу Schwanniomyces occidentalis* и *Saccharomycopsis fibuliger* способны сбраживать *крахмал*[1], *Kluyveromyces fragilis* — *инулин*. В аэробных условиях круг усваиваемых субстратов шире: помимо углеводов также *жиры*, *углеводороды*, ароматические и одноуглеродные соединения, *спирты*, *органические кислоты*. Гораздо больше видов способно использовать пентозы в аэробных условиях. Тем не менее, сложные соединения (*лигнин*, *целлюлоза*) для большинства дрожжей (за исключением некоторых видов рода Trichosporon, проявляющих целлюлолитическую активность) недоступны.

Источниками азота для всех дрожжей могут быть соли *аммония*, примерно половина видов имеет *нитратредуктазу* и может усваивать *нитраты*. Пути усвоения *мочевины* различны у аскомицетовых и базидиомицетовых

дрожжей. Аскомицетовые сначала карбоксилируют её, затем гидролизуют, базидиомицетовые — сразу гидролизуют *уреазой*.

Для практического применения важны продукты вторичного метаболизма дрожжей, выделяемые в малых количествах в среду: *сивушные масла*, *ацетоин* (ацетилметилкарбинол), *диацетил*, масляный альдегид, изоамиловый спирт, диметилсульфид и др. Именно от них зависят органолептические свойства полученных с помощью дрожжей продуктов.

Рисунок 14- Гранулированные сухие активные дрожжи — коммерческий продукт для хлебопечения

Приготовление печёного дрожжевого *хлеба* — одна из древнейших технологий. В этом процессе используется преимущественно *Saccharomyces cerevisiae*. Они проводят спиртовое брожение с образованием множества вторичных метаболитов, обуславливающие *вкусовые* и *ароматические* качества хлеба. Спирт испаряется при выпечке. Кроме того, в *тесте* формируются пузыри углекислого газа, заставляющие его «подниматься» и после выпечки придающие хлебу губчатую структуру и мягкость. Аналогичный эффект вызывает внесение в тесто *соды* и кислоты (обычно *лимонной*), но в этом случае вкус и аромат хлеба уступает таковому, приготовленному с использованием дрожжей.

На вкус и аромат хлеба значение оказывают не только качество сырья, использованного для выпечки хлеба, но и характеристика *ферментативных* и термальных процессов, — так, *редуцирующие сахара*, образующиеся под действием *амилаз* являются как субстратом для брожжения, при этом продуктами являются и в том числе низколетучие ароматические вещества, так и образующиеся при поджаривании за счёт неферментативной реакции с *аминокислотами* ароматическими веществами, также большое значение имеют *протеазы* и *липооксигеназы*.

Виноделие

Рисунок 15 - Ягоды винограда со слоем дрожжей на них.

Дрожжи в естественных условиях присутствуют на поверхности плодов *винограда*, часто они заметны как светлый налёт на ягодах, образованный преимущественно *Hanseniaspora uvarum*. «Настоящими» винными дрожжами принято считать вид *Saccharomyces cerevisiae*, который в природе встречается лишь на 1 ягоде винограда из 1000. Однако эта раса дрожжей отличается значительно более высокой этанолоустойчивостью по сравнению с другими. Что в большинстве случаев приводит к тому, что именно она и выигрывает конкуренцию и подавляет остальные виды в процессе брожения вина.

Собранный виноград давят, получая сок (*муст*, виноградное *сусло*) с 10—25 % сахара. Для получения белых вин от него отделяют смесь косточек и кожуры (*мезга*), в мусте для красных вин она остаётся. Затем в результате брожения сахара превращаются в *этанол*. Вторичные метаболиты дрожжей, а также соединения, полученные из них при созревании вина определяют его аромат и вкус, также большое значение в дозревании уже перебродившего вина и придании ему аромата имеют *молочнокислые бактерии*, например *Oenococcus oeni*. Для получения ряда вин (например, *шампанского*) вторично сбраживают уже перебродившее вино.

Прекращение брожения связано либо с исчерпанием запасов сахаров (*сухое вино*), либо с достижением порога токсичности этанола для дрожжей. Хересные дрожжи *Saccharomyces beticus*, в отличие от обычных дрожжей (которые погибают, когда концентрации спирта в растворе достигает 12 %), более устойчивы. Первоначально хересные дрожжи были известны только на юге *Испании* (в *Андалусии*), где благодаря их свойствам получали крепкое вино — *херес* (до 24 % при длительной выдержке). Со временем хересные дрожжи были также обнаружены в *Армении*, *Грузии*, *Крыму* и др.[48] Хересные дрожжи также используют при производстве некоторых крепких сортов пива.

Пивоварение, Квасоварение

Рисунок 16 - Ячменный солод

В пивоварении в качестве сырья используется зерно (чаще всего *ячмень*), содержащее много крахмала, но мало сбраживаемых дрожжами сахаров. Поэтому перед брожением крахмал гидролизуют. Для этого используются *амилазы*, образуемые самим зерном при прорастании. Пророщенный ячмень носит название *солод*. Солод размалывают, смешивают с водой и варят, получая *сусло*, которое впоследствии сбраживается дрожжами. Различают пивные дрожжи *низового* и *верхового* брожения (эту классификацию ввёл датчанин *Христиан Хансен*).

Дрожжи верхового брожения (например, *Saccharomyces cerevisiae*) формируют «шапку» на поверхности сусла, предпочитают температуры 14—25 °C (поэтому верховое брожение также называется тёплым) и выдерживают более высокие концентрации спирта. Дрожжи низового (холодного) брожения (*Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces carlsbergensis*) имеют оптимум развития при 6—10 °C и оседают на дно ферментёра.

При создании *пшеничного пива* часто используется *Torulaspora delbruecki*. При изготовлении *ламбика* применяются случайно попавшие в ферментёр дрожжи, обычно они принадлежат к роду *Brettanomyces*.

Квас производится по аналогичной схеме, однако помимо ячменного широко применяется *ржаной* солод. К нему добавляется мука и сахар, после чего смесь заливается водой и варится с образованием сусла. Важнейшим отличием квасоварения от производства пива является использование при сбраживании сусла помимо дрожжей *молочнокислых бактерий*.

Использование дрожжей в современной биотехнологии. Промышленное производство спирта

Спиртовое брожение — процесс, приводящий к образованию *этанола* (CH_3CH_2OH) из водных растворов *углеводов* (сахаров), под действием некоторых видов дрожжей (см. *ферментация*) как вид *метаболизма*.

В биотехнологии для производства *спирта* используют *сахарный тростник*, *фуражную кукурузу* и другие дешёвые источники *углеводов*. Для получения сбраживаемых моно- и *олигосахаридов* они разрушаются серной кислотой или *амилазами* грибного происхождения. Затем проводится

сбраживание и ректификационная перегонка спирта до стандартной концентрации около 96 % об. Дрожжи рода *Saccharomyces* были генетически модифицированы для сбраживания *ксилозы*[1] — одного из основных мономеров *гемицеллюлозы*, что позволяет повысить выход этанола при использовании растительного сырья, содержащего наряду с целлюлозой и значительные количества гемицеллюлоз. Всё это может снизить цену и улучшить его положение в конкурентной борьбе с углеводородным топливом.

Пищевые и кормовые дрожжи. Дрожжи богаты *белками*, их содержание может доходить до 66 %, при этом 10 % массы приходится на *незаменимые аминокислоты*. Дрожжевая биомасса может быть получена на отходах сельского хозяйства, гидролизатах древесины, её выход не зависит от климатических и погодных условий. Поэтому её использование чрезвычайно выгодно для обогащения белками пищи человека и корма сельскохозяйственных животных. Добавление дрожжей в колбасы началось ещё в *1910-е* годы в Германии, в *1930-е* кормовые дрожжи начали производить в СССР. Первый крупный завод по производству белка — *паприна*, мощностью 70 000 т. в год, был пущен в *1973 году*. В качестве сырья использовались отходы нефтепереработки.

Однако в *1990-е* гг., в связи с возникшими *гигиеническими* и *экологическими* проблемами производства и применения микробного белка, а также с экономическим кризисом производство резко сократилось. Накопившиеся данные свидетельствовали о проявлении ряда отрицательных эффектов применения *паприна* в откорме птицы и животных. По экологическим и гигиеническим причинам снизился и интерес к данной отрасли и во всём мире.

Тем не менее, на Западе сейчас производятся и продаются различные *дрожжевые экстракты*: *вегемит*, *мармит*, *боврил*, *ценовис*. Существуют подобные производства и в России, но их объёмы невелики. Для получения экстрактов используются либо *автолизаты* дрожжей (клетки разрушаются и белок становится доступным благодаря ферментам самих клеток), либо их гидролизаты (разрушение специальными веществами). Они применяются как пищевые добавки и для придания блюдам вкусовых качеств; кроме того, существуют *косметические средства* на основе дрожжевых экстрактов.

Продаются также дезактивированные (убитые тепловой обработкой), но не разрушенные *пищевые дрожжи*, особенно популярные у *веганов* из-за высокого содержания белка и витаминов (особенно группы В), а также малого количества жиров. Некоторые из них обогащены *витамином* B_{12} бактериального происхождения.

В настоящее время интенсивно ведётся изучение *прионов* дрожжей, поскольку те близки по строению к открытым ранее прионам млекопитающих, однако абсолютно безопасны для человека.

Чайный гриб

Рисунок 17 - Чайный гриб в банке

Чайный гриб является ассоциацией дрожжей и уксуснокислых бактерий, данные бактерии относятся к роду *Zoogloea* (*Зооглея*). Наиболее часто наблюдались ассоциации дрожжей *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida stellata*, Schizosaccharomyces pombe, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii* и других, с рядом *штаммов* семейства *Acetobacteraceae*. Его использование в *Российской империи* началось в *1900-е* годы, видимо, он был завезен после *русско-японской войны*.

В *50-е годы XX века* в *СССР* активно исследовали различные природные вещества для их медицинского использования. Отмечены антимикробные и *противоатеросклеротические* свойства *зооглеи* чайного гриба и его культуральной жидкости.

Плесени вызывают многочисленные превращения в твердых средах, которые происходят пред брожением. Их наличием объясняется гидролиз рисового крахмала при производстве сакэ и гидролиз соевых бобов, риса и солода при получении пищи, употребляемой в азиатских странах. Пищевые продукты на основе сброженных плесневыми грибами *Rhizopus oligosporus* соевых бобов или пшеницы содержат в 5 - 7 раз больше таких витаминов, как рибофлавин, никотиновая кислота) и отличаются повышенным в несколько раз содержанием белка. Плесени также продуцируют ферменты, используемые в промышленности (амилазы, пектиназы и т.д.), органические кислоты и антибиотики. Их применяют и в производстве сыров, например, камамбера и рокфора.

Искусственное выращивание грибов способно внести и иной, не менее важный вклад в дело обеспечения продовольствием возрастающего населения земного шара. Люди употребляют грибы в пищу с глубокой древности. Поэтому сделать грибы такой же управляемой сельскохозяйственной культурой, как зерновые злаки, овощи, фрукты, давно уже стало актуальной задачей.

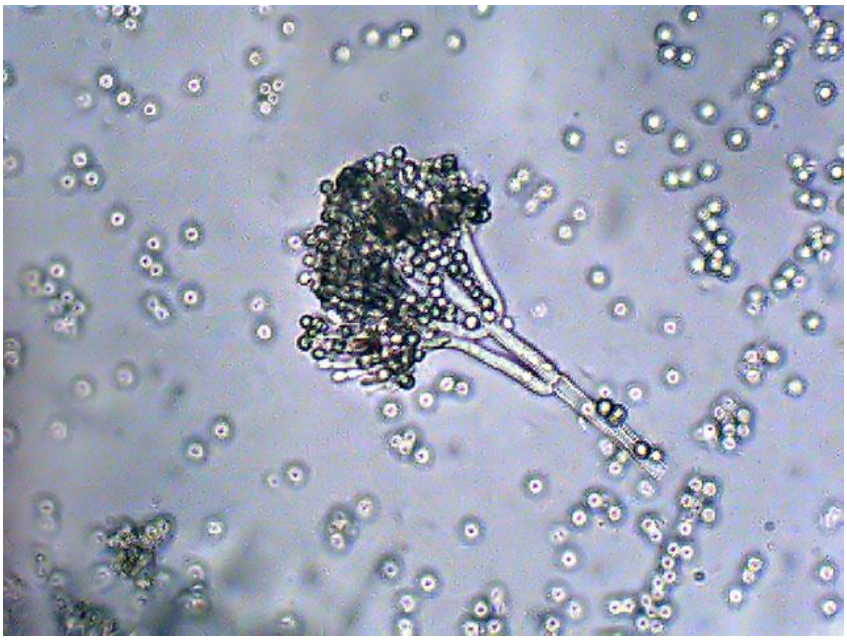


Рисунок 18 - Плесневый грибок пенициллиум (пенициллин)

Известно, что серая гниль, портящая российскую клубнику, во Франции используется для приготовления вин и называется "благородной плесенью". С помощью голубой плесени делают мраморные или голубые сыры - Рокфор, Стилтон, Горгонзола. А белая плесень придает специфический вкус и аромат сырам Камамбер и Бри.

Рисунок 19 – Клубничная плесень (увеличение 800 кратное)

Наиболее легко поддаются искусственному выращиванию древоразрушающие грибы. Это связано с особенностями их биологии, которые стали нам известны и понятны только сейчас. Их способность легко расти и плодоносить использовали с древнейших времен.

Плесневые грибы при определенных условиях поселяются на древесине и других материалах (тканях, коже, кормах, продуктах питания и даже на стекле и металле, имеющих органические примеси), ухудшая их товарный вид и некоторые свойства. Кратковременное развитие плесневых грибов на древесине в некоторых случаях полезно, как, например, перед пропиткой крупных сортиментов. Грибы за короткий срок времени успевают частично разрушить мембраны пор трахеид и использовать для своей жизнедеятельности вещества, выстилающие клетки, не затрагивая их стенок. Результатом этого является улучшение проницаемости древесины.

На поверхности материалов плесневые грибы заметны в виде налетов голубого, серого, реже розового, малинового и чаще зеленого цвета. Эти грибы очень быстро развиваются. Их споры постоянно присутствуют в воздухе, выдерживая неблагоприятные для своего развития воздействия среды.

Древоразрушающие грибы. Эти грибы развиваются в условиях повышенной или переменной влажности, разрушая древесный материал иногда до полной потери прочности. С одной стороны, дереворазрушающие грибы вызывают серьезные болезни растущих деревьев, значительную порчу древесины на складах и выход ее из строя при эксплуатации, разрушая структуру клеточных оболочек, изменяя химический состав древесины, ее физические и технические свойства. С другой стороны, принимают активное участие в процессах разложения древесных остатков, особенно в лесу, что является, несомненно, положительным моментом. Дереворазрушающие грибы можно разделить на две основные группы – целлюлозоразрушающие и лигнинразрушающие.

Целлюлозоразрушающие грибы разрушают только древесину.

Древесина становится хрупкой (легко ломается и крошится), заметно теряя свой вес и объем. Разложение древесины целлюлозоразрушающими грибами проходит в несколько стадий.

1. Древесина слегка окрашивается в серо-желтый цвет, прочность ее снижается, но характер излома остается еще волокнистым.

2. Древесина заметно окрашена в серо-желтый – серо-оранжевый цвета, легкая и мягкая.

3. Древесина темно-бурая, распадается на призматические кусочки, не обладает никакой прочностью; характер излома раковистый.

Лигнинразрушающие грибы, кроме целлюлозной части древесины, разлагают и лигнин. Древесина становится мягкой, волокнистой, теряет в весе, но объем ее не уменьшается. В процессе разложения древесины лигнинразрушающими грибами можно выделить следующие стадии.

1. На древесине появляются фиолетовые полосы, а в остальном она остается без изменений.

2. Древесина становится красноватой, других заметных изменений еще нет.

3. Древесина окрашивается в красноватый цвет, вес и прочность снижаются, особенно в ранней части годичных слоев.

4. Древесина становится красновато-бурой со светлыми полосами или островками, часто заполненными белыми волокнами целлюлозы.

Условия, необходимые для развития грибов в древесине

1. Положительная температура (обычно от +5 до +40°С). Активная жизнедеятельность дереворазрушающих грибов возможна лишь при положительных температурах, однако понижение температуры ниже 0°С обычно не приводит к гибели большинства грибов. Особой стойкостью отличаются споры и плодовые тела. Внутренняя грибница способна в течение длительного времени выдерживать целый ряд неблагоприятных условий.

2. Повышенная влажность древесины (23… 100%). Ферменты, выделяемые грибами, превращают органические соединения древесины в более простые, растворимые в воде вещества. Это превращение возможно лишь при наличии в древесине некоторого количества свободной влаги. Кроме того, влага необходима и потому, что грибы питаются путем поглощения водных растворов веществ. Для усвоения грибами питательных органических веществ необходим кислород. В результате проходящих реакций образуются углекислый газ и вода, вследствие чего происходит постепенное самоувлажнение древесины.

3. Неподвижный сырой воздух влажностью 80…95% (отсутствие сквозняков).

Поверхностная грибница имеет тонкие клеточные стенки и плохо приспособлена к высыханию. При снижении влажности воздуха она постепенно спадает и начинает отмирать.

4. Затемнение (известно, что ультрафиолетовые лучи отрицательно влияют на грибницу многих грибов, задерживая развитие и убивая ее).

5. Кислотность среды (pH 3…5), которая способствует лучшему расщеплению древесины.

6. Присутствие органических примесей, необходимых для питания гриба.

Искусственное разведение древоразрушающих грибов получило довольно широкое распространение. Мицелий съедобных грибов можно выращивают на жидких средах, например на молочной сыворотке и др., в специальных ферментерах, в так называемой глубинной культуре. Это полностью механизированный и автоматизированный процесс. Так, в Институте микробиологии Академии наук БССР разработаны и апробированы в опытном производстве способы получения белковых грибных препаратов даедалина и пантегрина из мицелия древоразрушающих грибов дедалеопсиса бугристого и пилолистника тигрового, с высоким содержанием белка и биологически активных веществ. По содержанию белка 1 кг этих препаратов эквивалентен 2 кг мяса. По биологической ценности белок этих препаратов не уступает растительным и приближается к животным белкам. Перевариваемость белков данных препаратов составляет свыше 80 %. В основе этого способа получения пищевого белка лежат полученные микологами данные о том, что плодовые тела грибов и их грибница близки по своему химическому составу и пищевой ценности.

Грибные белковые препараты даедалин и пантегрин рекомендованы в качестве пищевых добавок после соответствующего медицинского контроля. Исследования в этом направлении продолжаются.

Вопросы для самоконтроля

1. Как используются в биотехнологии грибы и плесени?
2. Что представляют собой дрожжи?
3. Пищевые и кормовые дрожжи, каково их значение?
4. Опишите биологические особенности роста и размножения дрожжей
5. Что представляют собой плесени?
6. Как применяются «хорошие» плесени?
7. Для чего используют древоразрушающие грибы?
8. Как используются микроорганизмы для получения белковой массы и других биологически активных веществ?
9. Как выглядят микроскопические грибы, их структура?
10. Какие способы получения пищевого белка вы знаете?
11. Какие пищевые добавки получают из грибов?

Лекция 11 . Простейшие в биотехнологии

План

1. Простейшие - как продуценты биологически активных веществ.
2. Простейшие, обитающие в рубце жвачных животных.

Простейшие относятся к числу нетрадиционных объектов биотехнологии. До недавнего времени они использовались лишь как компонент активного ила при биологической очистке сточных вод. В настоящее время они привлекли внимание исследователей как продуценты биологически активных веществ. В этом качестве рациональнее использовать свободноживущих простейших, обладающих разнообразными биосинтетическими возможностями и потому широко распространенными в природе.

Простейшие (*Protozoa*), тип одноклеточных животных из группы эукариотов. Простейшие отличаются от всех других эукариотов, относимых к многоклеточным, тем, что их организм состоит из одной клетки, т. е. высший уровень организации у них клеточный. Почти все Простейшие микроскопических размеров, по различны по уровню морфо-физиологической дифференцировки. Так, амёбы устроены относительно просто (не имеют дифференцированных органоидов захвата пищи, движения, сокращения и т.п.), инфузории же обладают сложной организацией (имеют поверхностные пелликулярные структуры, опорные и сократительные фибриллы, органоиды движения - реснички и их производные, специальные органоиды захвата пищи, защиты и т.п.).

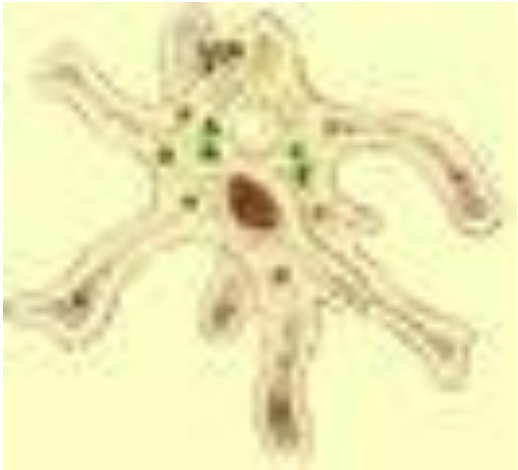


Рисунок 20 - Амеба (*Amoeba proteus*).

Всем Простейшие присущи типичная клеточная ультраструктура и комплекс органоидов общего назначения: митохондрии, эндоплазматическая

сеть, элементы аппарата Гольджи, рибосомы, лизосомы. Ядро окружено типичной двухмембранной оболочкой с порами, содержит кариоплазму, хромосомы (в интерфазном ядре они обычно находятся в деспирализованном состоянии) и нуклеоли.

Рисунок 21 - Инфузории: 1 - туфелька (*Paramecium caudatum*); 2 - трубач (*Stentor coeruleus*); 3 - стилонихия (*Stylonichia mytilus*).

Известно 25-30 тыс. видов Простейшие Число же существующих в природе видов Простейшие, вероятно, в несколько раз больше, т.к. из-за микроскопических размеров и технических трудностей фауна Простейшие недостаточно исследована, ежегодно описываются сотни новых видов. Простейшие делят на 5 классов: саркодовые, жгутиковые, споровики, инфузории, книдоспоридии. Имеется несколько прогрессивных филогенетических линий, ведущих к образованию крупных таксонов - фораминифер, радиолярий, инфузорий, у которых морфо-физиологическая дифференцировка наиболее сложная. Пути морфо-физиологического прогресса в пределах Простейшие отличаются от таковых у многоклеточных.

Для прогрессивной эволюции Простейшие характерна полимеризация органоидов, высокий уровень полиплоидии, дифференцировка ядер на генеративные и вегетативные (у инфузорий их называют микронуклеус и макронуклеус). Для многих Простейшие характерны циклы развития, выражающиеся в закономерном чередовании бесполого и полового размножения.

Особую экологическую нишу занимают простейшие, обитающие в рубце жвачных животных. Они обладают ферментом целлюлазой, способствующей разложению клетчатки в желудке жвачных.

Простейшие рубца могут быть источником этого ценного фермента. Возбудитель южноамериканского трипаносомоза — *Trypanosoma*

(*Schizotrypanum cruzi*) стала первым продуцентом противоопухолевого препарата круцина (СССР) и его аналога—трипанозы (Франция). Изучая механизм действия этих препаратов, советские ученые (Г. И. Роскин, Н. Г. Клюева и их сотрудники), а также их французские коллеги (Ж. Кудер, Ж. Мишель-Брэн и др.) пришли к выводу, что эти препараты оказывают цитотоксический эффект при прямом контакте с опухолью и ингибируют ее опосредованно, путем стимуляции ретикулоэндотелиальной системы. Выяснилось, что ингибирующее действие связано с жирнокислотными фракциями. Характерной особенностью этих организмов является высокое содержание ненасыщенных жирных кислот, составляющее у трипаносомид 70—80 %, а у *Astasia longa* (свободноживущий жгутиконосец) — 60 % от суммы всех жирных кислот. У жгутиконосцев фосфолипиды и полиненасыщенные жирные кислоты имеют такой же состав и строение, как в организме человека и животных. В мире микробов полиненасыщенные жирные кислоты не синтезируются, а многоклеточные животные или растения представляют собой более ограниченную сырьевую базу, чем простейшие, культуры которых можно получать методами биотехнологии независимо от времени года или климатических условий.

Поскольку липидный метаболизм простейших обладает относительной лабильностью, были изучены пути его регуляции. Применение к простейшим общепринятого в микробиологии приема повышения биосинтеза липидов за счет снижения содержания в среде источника азота и увеличения содержания источника углерода привело к резкому торможению или остановке роста культур. Для создания условий направленного биосинтеза липидов в среды для культивирования жгутиконосцев добавляли предшественники и стимуляторы биосинтеза липидов: малонат, цитрат, сукцинат, цитидиннуклеотиды в сочетании с определенным режимом аэрации.

Российские ученые получили водорастворимый полусинтетический препарат — астазилид, представляющий собой комплекс эфиров сахарозы и жирных кислот, предварительно выделенных из *A. longa*. Для изучения активности и механизма действия этого препарата были применены различные модели: бислойные липидные мембраны (БЛМ), монослойные культуры почки теленка и карциномы яичника человека, иммунокомпетентные клетки — перитонеальные макрофаги. Было установлено, что астазилид вызывает увеличение проводимости, поверхностного натяжения, а также уменьшение электромеханической стабильности БЛМ.

Полученные данные позволяют предполагать, что в основе физиологических эффектов препарата лежит его значительное мембраноактивное действие. Астазилид проявляет мягкие детергентные свойства. Возможно, что увеличение проводимости и некоторая дестабилизация клеточных мембран открывают путь для проникновения внутрь клетки Ca2+ и других ионов, играющих ключевую роль в регуляции метаболизма. При изучении действия астазилида на культуру клеток почки теленка было установлено, что препарат увеличивает митотический индекс

клеток, снижает их полиморфизм, улучшает адгезивные свойства культуры, обеспечивает более плотное сцепление с субстратом и усиление межклеточных контактов.

Препарат не обладал прямым цитотоксическим действием на культуру опухолевых клеток, а его противоопухолевое действие, изученное на 8 штаммах перевиваемых опухолей мышей и крыс, реализовалось через иммунную систему. Астазилид действовал главным образом на клеточное звено иммунитета, вызывая повышение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов, увеличение способности индуцировать развитие гиперчувствительности замедленного типа и некоторых других показателей. Препарат предотвращаал гибель 60—80 % животных, зараженных бактериальными инфекциями (*E. coli, Ps. aerugenosa*), а также лейшманиями. Другой группой биологически активных веществ простейших являются полисахариды.

Разнообразие полисахаридов, синтезируемых простейшими, достаточно велико. Особый интерес представляет парамилон, характерный для эвгленоидных жгутиконосцев.

Представители родов *Astasia* и *Euglena* способны к сверхсинтезу парамилона, составляющему свыше 50 % сухого остатка клеток. Этот полисахарид изучается как стимулятор иммунной системы млекопитающих. В наших опытах парамилон *A. longa* обладал выраженным противоопухолевым эффектом. Действуя опосредованно через иммунную систему, парамилон тормозит рост саркомы 180 на 60 % и снижает прививаемость аденокарциномы Эрлиха. Аденокарцинома Эрлиха вообще не прививалась у 50— 60 % мышей, которым профилактически был введен парамилон в дозах 3 и 30 мг/кг веса животного. Парамилон, выделенный из *A. longa,* практически нетоксичен. Выраженное иммуномодулирующее действие и низкая токсичность этого препарата являются предпосылкой для его углубленного исследования в сочетании с препаратами прямого противоопухолевого действия, радиотерапией и другими адъювантами.

В настоящее время в мире придается большое значение производству глюканов не только для медицинских целей, но и для пищевой и текстильной промышленности. До сих пор глюканы получали из культур бактерий или морских водорослей.

Эвгледиды являются одним из наиболее перспективных источников этого вещества. Структурные полисахариды, входящие в состав клеточных мембран простейших,— это гетерополисахариды, содержащие глюкозу, маннозу, ксилозу, арабинозу, рибозу, галактозу, рамнозу, фруктозу, глюкозамин. Наиболее характерными гетерополисахаридами являются арабиногалактаны, Д-галакто-Д-маннан, фосфаноглюканы и другие.

Большой интерес представляет выяснение антигенной взаимосвязи между непатогенными и патогенными для человека видами трипаносомид. Установлено, что при введении мышам полисахаридов из культур непатогенных для человека простейших — *Herpetomonas sp*. и *Crithidia fasciculata* — повышалась резистентность животных к *T. cruzi,* возбудителю

болезни Чагаса у человека. Наличие перекрестных иммунологических реакций между полисахаридами различных типов послужило основанием для вывода о том, что антигенная общность между этими веществами обусловлена не структурой полимера, а отдельными мономерами или олигомерами одинакового химического строения.

Биомасса простейших содержит до 50% белка. Его высокая биологическая ценность заключается в том, что он содержит все незаменимые аминокислоты, причем содержание свободных аминокислот на порядок выше, чем в биомассе микроводорослей, бактерий и в мясе. Это свидетельствует о широких возможностях применения свободноживущих простейших в качестве источника кормового белка.

Вопросы для самоконтроля

1. Что представляют собой простейшие?
2. Как используются простейшие в биотехнологии?
3. Какие вещества синтезируют простейшие?
4. Что могут синтезировать морские водоросли?
5. Каковы перспективы получения пищевого белка из простейших и водорослей?

Лекция 12 . Использование водорослей в промышленной биотехнологии

План

1. Высокопродуктивные штаммы водорослей.
2. Ценные продукты, получаемые из красных водорослей.

Повсеместное распространение водорослей в природе и обильное, а подчас и массовое развитие их в водоемах разного типа, на наземных субстратах и в почве определяют огромное значение этих растений как в повседневной жизни человека, так и в его хозяйственной деятельности. И все же имеющиеся возможности практического использования водорослей далеко еще не исчерпаны, а методы управления их жизнью только намечаются.

Взаимоотношения «водоросли — человек» очень многогранны и подчас совершенно неожиданны. Казалось бы, что может быть общего между водорослями и текстильной промышленностью, кондитерским делом и изготовлением бумаги? Однако некоторые вещества, получаемые из морских водорослей, имеют здесь прямое приложение. Разве можно было предполагать хоть какую-нибудь связь между пресноводными водорослями и космическими полетами? Однако выясняется, что дальние рейсы космических кораблей будут, по-видимому, невозможны без участия этих мельчайших зеленых аккумуляторов солнечной энергии. И многое, многое другое. Сложность этих взаимоотношений усугубляется еще и тем, что одни водоросли могут приносить человеку пользу, другие — вред, а нередко одни и те же проявления их жизнедеятельности в одних условиях оказываются полезными, в других — вредными. Кроме того, влияние водорослей проявляется не однозначно, а несколькими, в основном двумя, путями — косвенным и прямым, которые, впрочем, нередко переходят друг в друга.

Косвенное влияние выражается в том, что на хозяйстве отражаются те естественные процессы, которые вызывают водоросли в природе; человек, учитывая эти процессы, пытается активным вмешательством в природу увеличить их положительное или уменьшить их отрицательное значение.

Прямой путь — это путь непосредственного использования водорослей как растительных продуктов или как сырья для получения различных содержащихся в них веществ, ценных для человека. Применительно к водорослям континентальных водоемов преобладает косвенный путь, морские водоросли предоставляют широкие возможности прямого использования.

Практическое значение водорослей косвенного характера в наибольшей мере проявляется в рыбном, сельском и коммунальном хозяйствах, а также при эксплуатации водного транспорта и гидротехнических сооружений, отчасти в медицине, тогда как прямое использование их наиболее весомо в качестве пищевого продукта и сырья для ряда отраслей промышленности (таблица 1, 2).

С древнейшего времени, уходящего своими корнями, вероятно, к первым поселениям человека на морском побережье, морские водоросли используют в пищу и как корм для домашних животных. По берегам морей и океанов их употребляют почти всюду, но особенно широко в Японии, где они являются настоящим национальным кушаньем. В европейских странах преобладает кормовое использование морских водорослей. В России морские водоросли употребляет в пищу население главным образом дальневосточного побережья и Камчатки, в меньшей степени — жители берегов Мурмана и Белого моря и совсем не едят их на Черном море.

Употреблять в пищу можно, по-видимому, почти все водоросли, так как ядовитых форм среди них нет, не годятся лишь слишком грубые или невкусные. Так, например, на Сандвичевых островах из 115 имеющихся видов местное население употребляет в пищу около 60.

Наибольшей известностью пользуется у нас так называемая морская капуста. Это главным образом ламинария и близкие к ней виды бурых водорослей, например алария и ундария. Продукты, получаемые из ламинариевых, известны в Японии под названием «комбу»; для их приготовления применяют не менее 12 способов. Собранную морскую капусту высушивают на берегу, затем режут на ленты и складывают в пачки.

Из морской капусты и комбу приготовляют самые разнообразные кушанья, чаще всего употребляя вместо обыкновенной капусты в супах, с мясом, рыбой, рисом и т. п. Употребляют ее и в кондитерских изделиях — засахаренную, в пастиле, конфетах и т. д. Широко известны и высоко ценятся за нежность и вкус некоторые красные водоросли из рода порфира, известные у нас под названием красного морского салата, а в Японии в зависимости от сорта их называют «аманори», «азакузанори», «хошинори» и т. д. Эти водоросли или едят в сыром виде, приготовляя различные салаты, или варят с мясом, рисом и другими продуктами. Аналогичное применение, особенно в сыром виде в качестве салата, имеет и зеленая водоросль ульва, называемая зеленым морским салатом, а также красная родимения .

Многие из водорослей перерабатывают сначала в муку, которую затем употребляют для разнообразных печений и других блюд. Из продуктов, выпускаемых нашей пищевой промышленностью, наибольшее распространение по всей стране получили консервы из морской капусты с овощами и пастила «Зефир» с примесью этой же водоросли.

Химический анализ наиболее известных представителей пищевых водорослей показывает, что в них больше всего углеводов, тогда как белков много только у красного морского салата, а содержание жиров всюду крайне незначительно. Что же касается усвоения всех этих веществ человеком при питании водорослями, то имеются данные, что жиры и углеводы усваиваются в пределах обычной нормы, а усвоение белков колеблется в пределах от 31,7 до 80%, равняясь в среднем 61,1 %. Таким образом, морские водоросли вполне питательный продукт. Считают, что усвоение, например, морской капусты не уступает усвоению обычной капусты, перед которой она имеет ряд преимуществ.

Таблица 39. **Промысловые бурые и красные водоросли:**

1 — ламинария японская (Laminaria japonica); *2* — алария съедобная (Alaria esculenta); *3* — ундария перистонадрезная (Undaria pinnatifida); *4* — гелидиум тонкий (Gelidium tenue); *5* — анфельция складчатая (Ahnfeltia plicata); *6* — филлофора жилковатая (Phyllophora nervosa).

Таблица 3. **Сине-зеленые водоросли:**

1 — Synechococcus aeruginosus; *2* — Dactylococcopsis rhaphidioides; *3* — Merismopedia glauca; *4* — Microcystis aeruginosa; *5* — Gloeocapsa turgida; *6* — Gomphosphaeria aponina; *7* — Chamaesiphon curvatus; *8* — Stigonema ocellatum; *9* — Nostoc pruniforme; *10* — Anabaena hassalii; *11* — Aphanizomenon flos-aquae; *12* — Tolypothrix tenuis; *13* — Calothrix gypsophila; *14* — Oscillatoria chalybea; *15* — Lyngbya confervoides.

Однако особую ценность водорослевой пище придает то, что, кроме общей питательности, она богата витаминами и обладает рядом диетических и лечебных свойств.

Так, в морских водорослях точно доказано наличие витаминов А, В1, В2, В12, С и D. Особенно богата витаминами красная водоросль порфира, высокоценимая как пищевой продукт. Витамина В1 отсутствие которого в пище вызывает у человека болезнь бери-бери, в порфире оказалось лишь вдвое меньше, чем в высоковитаминозных пивных дрожжах, фактора роста — витамина В2 — обнаружено в ней вдвое больше, чем в капусте и моркови, а антицинготного витамина С в ней столько же, сколько в лимоне. Большое значение имеет также содержание в морских водорослях иода, брома, мышьяка и некоторых других веществ.

Наибольшей известностью как лечебное и профилактическое средство пользуется морская капуста, применяемая против некоторых желудочно-кишечных расстройств, явлений склероза, зоба, рахита и ряда других заболеваний. Ее продают в аптеках в виде сухой крошки, получаемой путем измельчения слоевищ водоросли.

В отличие от морских, пресноводные и наземные водоросли мало употребляют в пищу. Очевидно, в данном случае пищевое значение могут иметь лишь те водоросли, которые образуют крупные колонии или скапливаются большими компактными массами. Так, считаются съедобными три вида сине-зеленых водорослей из рода носток, образующие слизистые колонии: носток сливообразный (*Nostoc pruniforme*), шаровидные или эллипсоидные хрящевато-слизистые колонии которого размером до куриного яйца нередко скапливаются в массе на дне небольших водоемов; затем повсеместно распространенный носток обыкновенный (*N. commune*), образующий крупные пластинчатые слизистые слоевища на влажной почве, и носток войлочный (*N.flagelliforme*), широко распространенный в Северном Китае, где он обитает на бесплодных почвах и в сухом состоянии имеет вид войлочных дерновин из тонких темных нитей, становящихся слизистыми при увлажнении. Для Японии был описан случай образования на склонах некоторых вулканов мощных пластов студенистой органической массы, состоящей преимущественно из колонии одноклеточных сине-зеленых водорослей; местное население называет эти скопления «ячменный хлеб тенгу» (тенгу, по поверью, добрый горный дух) и с давних времен употребляет их в пищу. В последние годы в научной литературе получил широкую известность один вид сине-зеленой нитчатой водоросли спирулины (*Spirulina platensis*), образующий скопления в озере Чад (Южная Африка); местное население издавна употребляет его в пищу. В настоящее время зта водоросль стала одним из популярных объектов массового культивирования в различных, в том числе и пищевых, целях.

Промышленное использование морских водорослей по сравнению с пресноводными также имеет значительно большие масштабы и более давнюю историю. В настоящее время под термином «водорослевая промышленность» разумеют промышленную переработку именно морских

водорослей. Из них получают как различные органические соединения, так и минеральные вещества.

Одним из наиболее известных промышленных продуктов водорослевого происхождения является агар, или кантен, представляющий собой слизистое вещество, извлекаемое из морских водорослей путем их выварки. Все морские водоросли в той или иной мере отличаются слизистостыо слоевищ. Если их подвергнуть выварке, то слизь переходит в раствор, застывающий при охлаждении в плотный студень белого или желтоватого цвета (в зависимости от очистки). Его высушивают и выпускают в продажу в виде лент, плиток, кубиков и порошка. Сухой агар в кипящей воде снова легко переходит в раствор, и даже 20 г его на литр воды дают довольно плотный студень.

Агар представляет собой не одно определенное вещество — это смесь веществ, более всего углеводов, состав которой зависит от того, из каких водорослей и как ее получают. Наилучшие сорта агара дают некоторые красные водоросли — гелидиум, грацилярия и некоторые другие. В СССР агар получают из красной водоросли анфельции (*Ahnfeltia plicata*), в больших количествах произрастающей в Белом море и в дальневосточных морях, и близкий к нему агароид, получаемый из красной водоросли филлофоры (*Phyllophora nervosa),* запасы которой в Черном море неисчерпаемы.

Применение агара разнообразно. В больших количествах его используют в пищевой промышленности при изготовлении мармелада, пастилы, мороженого, сыра и других, преимущественно кондитерских, изделий. Агар добавляют в хлеб, это повышает его качество, и он не так быстро черствеет. В бумажной промышленности его применяют для придания бумаге плотности и глянца, с той же целью его используют в текстильной промышленности при аппретуре, т. е. отделке тканей, и в ряде других отраслей. Наконец, в громадных количествах агар используют в научно-исследовательской работе в качестве твердой среды (после пропитывания питательными солями) для культивирования микроорганизмов.

При сходной, но более грубой обработке из водорослей получают клей, который находит применение как в текстильном, так и строительном деле. Прибавление клея к цементу, штукатурке и прочим строительным материалам увеличивает их крепость и водонепроницаемость.

Однако наибольшую ценность из всех органических веществ, получаемых из морских водорослей, представляют так называемый альгин, или альгиновая кислота, и ее соли — альгинаты. В чистом виде они обладают большой клеющей силой, в 37 раз превосходящей гуммиарабик и в 14 раз крахмал. Это делает альгин особо ценным для аппретуры тканей и бумаги и для целого ряда других производств, где требуется сильный клей.

Морские водоросли долгое время служили сырьем для получения одного из ценных неорганических веществ — иода (позднее были найдены более дешевые способы извлечения его из воды некоторых минеральных источников и соляных залежей). Сравнительно недавно их стали применять

для получения и других элементов, главным образом калия и натрия. Все эти вещества входят в состав золы, количество которой в морских водорослях весьма велико — от 15 до 45, а у некоторых форм и до 53% от абсолютно сухого веса слоевищ. Доказано, что содержание солей калия в золе водорослей доходит до 35%.

Очевидно, при одностороннем использовании морских водорослей происходят большие потери этого ценного сырья. При сжигании на золу пропадают все органические вещества, при выработке только органических веществ пропадают все зольные элементы. Поэтому уже давно стремятся выработать методы комплексной переработки водорослей, которые позволили бы получить из одной и той же порции водорослей максимальное количество продуктов. Имеющийся в этом направлении опыт показывает, что, кроме ранее перечисленных веществ, из морских водорослей действительно можно получить ряд высокоценных продуктов — спирт, уксусную, молочную и другие органические кислоты, маннит, ацетон, эфиры и т. д.

Возможности промышленного использования водорослей континентальных водоемов по сравнению с морскими водорослями значительно более ограничены, и имеющиеся в этом направлении попытки еще не вышли за рамки лабораторных изысканий или отдельных производственных задач, не получивших широкого развития. Наибольшее внимание как высококачественное сырье для производства бумажной массы издавна привлекали огромные запасы нитчатых водорослей кладофоры и ризоклониума в многочисленных озерах Западной Сибири и северных районов Казахстана. Оболочка клеток этих водорослей представляет собой почти чистую клетчатку. В одних только озерах Барабинской и Кулундинской степей общей площадью в несколько десятков тысяч квадратных километров ежегодный урожай этих нитчаток составляет не менее 100 000 т, что может дать товарный сбор в пределах 50 000 т. Производственные опыты оказались весьма удачными: из этих водорослей были получены различные сорта беловой бумаги, в смеси с макулатурой — оберточной и обойной бумаги, а при специальной обработке также картон и строительные материалы разного типа. Однако добиться рентабельности этого производства пока не удалось.

В последнее время на Украине начались исследования по практическому применению массы микроскопических планктонных синезеленых водорослей, накапливающейся в водохранилищах в периоды летнего «цветения» воды — явления, ставшего в годы жаркого лета подлинным бичом наших южных искусственных водоемов.

Исследования показали принципиальную возможность использования этой массы как в сельском хозяйстве в качестве органического удобрения под некоторые культуры и кормовой добавки в пищевом рационе домашних животных, так и в промышленности для получения некоторых ценных химических веществ. Однако серьезным препятствием на этом пути служит сезонность «цветения» воды, непостоянство этого явления и его зависимость

от погодных условий каждого отдельного лета. Поэтому действительно широкий размах получает сейчас другое направление в практическом использовании микроскопических водорослей, основанное на возможности управлятыгроцессом,— искусственное культивирование их в производственных целях. Исходным объектом такого культивирования послужила одноклеточная водоросль хлорелла, по к настоящему времени в круг подобных объектов вовлечены не только другие зеленые, но и сине-зеленые и диатомовые водоросли. Это направление, постепенно становящееся особой отраслью микробиологической промышленности, чрезвычайно интересно и значительно.

Водоросли используются, в основном, для получения белка. Весьма перспективны в этом отношении и культуры одноклеточных водорослей, в частности высокопродуктивных штаммов рода *Chlorella* и *Scenedesmus*. Их биомасса после соответствующей обработки используется в качестве добавки в рационы скота, а также в пищевых целях.

Одноклеточные водоросли выращивают в условиях мягкого теплого климата (Средняя Азия, Крым) в открытых бассейнах со специальной питательной средой. К примеру, за теплый период года (6—8 месяцев) можно получить 50—60 т биомассы хлореллы с 1 га, тогда как одна из самых высокопродуктивных трав — люцерна дает с той же площади только 15— 20 т урожая.

Хлорелла содержит около 50% белка, а люцерна — лишь 18%. В целом в пересчете на 1 га хлорелла образует 20—30 т чистого белка, а люцерна — 2—3,5 т. Кроме того, хлорелла содержит 40 % углеводов, 7—10% жиров, витамины А (в 20 раз больше), В2, К, РР и многие микроэлементы. Варьируя состав питательной среды, можно процессы биосинтеза в клетках хлореллы сдвинуть в сторону накопления либо белков, либо углеводов, а также активировать образование тех или иных витаминов.

При завоевании племен майя миссионерами описывался случай, когда испанцы около полутора лет осаждали крепость на вершине горы. Естественно, что все продукты давно должны были кончиться, однако крепость не сдавалась. Когда же она была наконец взята, то испанцы с удивлением увидели в ней небольшие пруды, где культивировались одноклеточные водоросли, из которых индейцы готовили особый сыр. Испанцы попробовали его и нашли весьма приятным на вкус. Однако это было уже после того, как испанцы уничтожили абсолютно всех защитников и секрет племени был утерян. В наше время делались попытки определить этот вид водорослей, из которых готовился сыр, но они не увенчались успехом.

В пищу употребляют не менее 100 видов макрофитных водорослей как в странах Европы и Америки, так и особенно на Востоке. Из них готовят много разнообразных блюд, в том числе диетических, салатов, приправ. Их подают в виде засахаренных кусочков, своеобразных конфет, из них варят варенье, делают желе, добавки к тесту и многое другое. В магазине можно купить консервы из морской капусты — ламинарии дальневосточных или северных морей. Ее консервируют с мясом, рыбой, овощами, рисом,

употребляют при приготовлении супов и др. Она наряду с микроводорослью хлореллой является самой популярной съедобной и кормовой водорослью. Известны и другие съедобные макрофитные водоросли — ульва, из которой делают разные зеленые салаты, а также алария, порфира, родимения, хондрус, ундария и др. В Японии продукты, получаемые из ламинариевых, называют «комбу», и для того, чтобы их вкусно приготовить, существует более десятка способов.

В целом ряде стран водоросли используют как весьма полезную витаминную добавку к кормам для сельскохозяйственных животных. Их прибавляют к сену или дают как самостоятельный корм для коров, лошадей, овец, коз, домашней птицы во Франции, Шотландии, Швеции, Норвегии, Исландии, Японии, Америке, Дании и на Севере. Животным скармливают в виде добавки также биомассу выращиваемых микроводорослей (хлорелла, сценедесмус, дуналиелла и др.).

Гидролизаты белка зеленой водоросли *Scenedesmus* используются в медицине и косметической промышленности. В Израиле на опытных установках проводятся эксперименты с зеленой одноклеточной водорослью *Dunaliella bardawil*, которая синтезирует глицерол. Эта водоросль относится к классу равножгутиковых и похожа на хламидомонаду. *Dunadiella* может расти и размножаться в среде с широким диапазоном содержания соли: и в воде океанов, и в почти насыщенных солевых растворах Мертвого моря. Она накапливает свободный глицерол, чтобы противодействовать неблагоприятному влиянию высоких концентраций солей в среде, где она растет. При оптимальных условиях и высоком содержании соли на долю глицерола приходится до 85% сухой массы клеток. Для роста этим водорослям необходимы: морская вода, углекислый газ и солнечный свет.

После переработки эти водоросли можно использовать в качестве корма для животных, так как у них нет неперевариваемой клеточной оболочки, присущей другим водорослям. Они также содержат значительное количество β-каротина. Таким образом, культивируя эту водоросль, можно получать глицерол, пигмент и белок, что весьма перспективно с экономической точки зрения.

Наряду с кормами водоросли давно применяют в сельском хозяйстве в качестве удобрений. Биомасса обогащает почву фосфором, калием, йодом и значительным количеством микроэлементов, пополняет также ее бактериальную, в том числе азотфиксирующую, микрофлору. При этом в почве водоросли разлагаются быстрее, чем навозные удобрения, и не засоряют ее семенами сорняков, личинками вредных насекомых, спорами фитопатогенных грибов.

Одним из самых ценных продуктов, получаемых из красных водорослей, является агар — полисахарид, присутствующий в их оболочках и состоящий из агарозы и агаропектина. Количество его доходит до 30—40% от веса водорослей (водоросли лауренция и грацилярия, гелидиум). Водоросли — единственный источник получения агара, агароидов, каррагинина, альгинатов. В мире в 1980 г. было получено 7 тыс. т агара, 222

тыс. т альгинатов, 10 тыс. т каррагинина. В нашей стране основным источником агара служит красная водоросль анфельция. Бурые водоросли являются единственным источником получения одних из самых ценных веществ водорослей — солей альгиновой кислоты, альгинатов. Альгиновая кислота — линейный гетерополисахарид, построенный из связанных остатков (3 — Д-маннуроновой и α — L-гиулуроновой кислот.

Альгинаты исключительно широко применяются в народном хозяйстве. Это изготовление высококачественных смазок для трущихся деталей машин, медицинские и парфюмерные мази и кремы, синтетические волокна и пластики, стойкие к любой погоде лакокрасочные покрытия, не выцветающие со временем ткани, производство шелка, клеящих веществ исключительно сильного действия, строительных материалов, пищевые продукты отличного качества — фруктовые соки, консервы, мороженое, стабилизаторы растворов, брикетирование топлива, литейное производство и многое другое. Альгинат натрия — наиболее используемое соединение — способен поглощать до 300 весовых единиц воды, образуя при этом вязкие растворы.

Бурые водоросли богаты также весьма полезным соединением — шестиатомным спиртом маннитом, который с успехом применяют в пищевой промышленности, фармацевтике, при производстве бумаги, красок, взрывчатки и др. Бурые водоросли в ближайшее время планируется использовать для получения биогаза. Каллусные культуры макрофитных водорослей могут быть использованы далее в различных направлениях. В случае, если они получены от агарофитов, можно непосредственно получать из них агар.

Каллусные культуры пищевых макрофитных водорослей, например ламинариевых, могут в перспективе использоваться для получения белка, непосредственно идущего в пищу и в пищевые добавки, а также в корма сельскохозяйственным животным. Суспензионные культуры макрофитных водорослей открывают в перспективе возможности использования их в качестве трофического звена в марикультуре. Они могли бы также выступать в качестве партнера в искусственно создаваемых растительных ассоциациях, участники которых обладают полезными свойствами. Выделяемые клетками культуры экзометаболиты, характерные для исходного вида водоросли, будут составлять основу трофического обмена при удачном подборе партнеров в растительной ассоциации или комплексе марикультуры. Необходимо отметить, что при отсутствии токсического и антагонистического действия выделяемых соединений в естественных условиях существуют разнообразные и многочисленные природные ассоциации, например, повсеместно встречающиеся комплексы водорослей и бактерий.

Вопросы для самоконтроля

1. Каково значение водорослей в жизни человека?
2. Каково значение сине-зеленых водорослей?
3. Как используются водоросли в биотехнологии?

Лекция 13 . Растения в промышленной биотехнологии

План

1. Водный папоротник азолла и ее строение.
2. Семейства рясковых.
3. Культура клеток растений.
4. Взаимодействие растений и микроорганизмов.

Водный папоротник азолла ценится как органическое азотное удобрение, так как растет в тесном симбиозе с сине-зеленой водорослью анабена. Крошечные листья азоллы (их длина редко превышает один миллиметр) расположены наподобие черепицы – одни листочки перекрывают другие. Короткие нежные корешки свисают вниз. Строение листа азоллы необычно. Каждый лист состоит из двух лопастей, или сегментов. Верхний сегмент, выступающий над водой, зеленый, из нескольких слоев клеток в толщину, с устьицами на обеих сторонах. Нижний сегмент погружен в воду. Он служит, как предполагают, для всасывания воды. На некоторых нижних сегментах развиваются сорусы. Замечательной особенностью азоллы является симбиоз этого растения с сине-зеленой водорослью анабеной азоллы (*Anabaena azollae*), из семейства ностоковых (*Nostocaceae*). Водоросль оккупирует полость, находящуюся на брюшной стороне верхнего, воздушного сегмента, недалеко от его основания. Полость окружена выростами из эпидермальных клеток, которые постепенно обрастают ее, оставляя лишь крошечное центральное отверстие, сообщающееся с внешней средой. Она целиком выстлана эпидермальными клетками, от которых отходят волоски, и наполнена слизью (возможно, продуктом выделения этих волосков). Анабена выполняет функции азотфиксации в этом симбиозе.

Рисунок 22 – Азолла

Азолла быстро размножается простым делением: часть листьев отделяется от материнского растения и начинает самостоятельную жизнь. При благоприятных условиях малютка способна удваивать свою биомассу каждые трое суток. В сочетании с тем, что симбиоз с анабеной позволяет накапливать много азота в вегетативной массе, такие темпы роста приводят очень быстрому заполнению всей поверхности воды вегетативной массой этого папоротника. Анабену азоллу выращивают на рисовых полях перед посевом риса, что позволяет снижать количество вносимых минеральных удобрений.

Представители семейства рясковых (*Lemnaceae*) - самые мелкие и простые по строению цветковые растения, величина которых редко превышает 1 см. Цветут крайне редко. Рясковые - свободноживущие водные плавающие растения. Вегетативное тело напоминает лист или слоевище низших растений, поэтому до начала 18 века ряску относили к слоевищным растениям.

В литературе встречается несколько названий тела рясковых. Самое удачное - листец. Тело рясковых - особая структура, не дифференцированная на листья и стебель (листоветвь), представляющая зеленую пластинку, иногда выпуклую с нижней стороны.

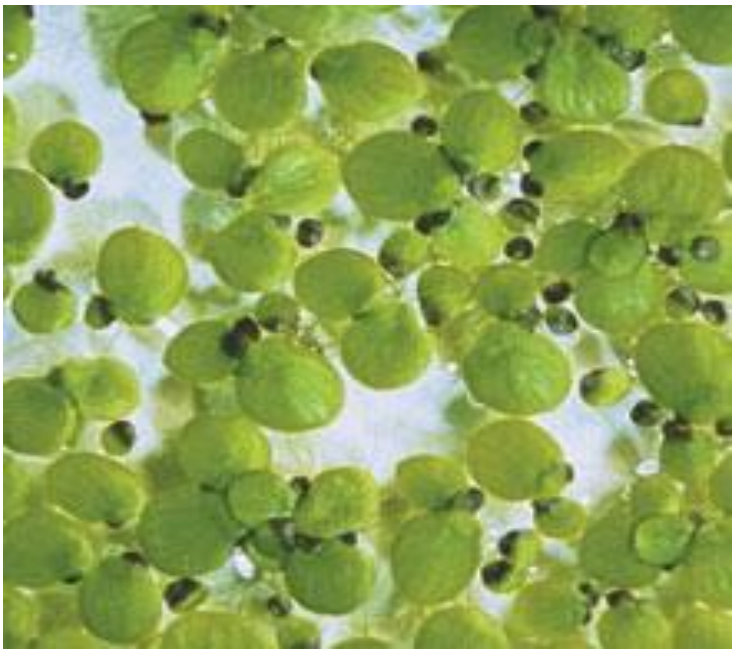


Рисунок 23 – Рясковые

Рясковые (*Lemna minor, L. trisulca, Wolfia, Spirodela polyrhiza*) служат кормом для животных, для уток и других водоплавающих птиц, рыб, ондатры. Их используют и в свежем, и в сухом виде как ценный белковый корм для свиней и домашней птицы. При всей миниатюрности рясок суперкарликами среди этих малышей флоры справедливо считают не их, а представителей рода Вольфия (*Wolffia*). Они названы в честь немецкого врача

и ботаника Дж. Ф. Вольфа (1778–1806), который впервые их описал. Вольфии похожи на уплощённый шарик. В отличие от многих сородичей, у вольфии вообще нет корней. Минеральные соли эти растения поглощают из воды всей поверхностью своего крошечного тельца – как одноклеточные организмы.

Рясковые содержат много протеина (до 45 % от сухой массы). 45% углеводов, 5% жиров и остальное - клетчатка и т.д. Они высоко продуктивны, неприхотливы в культуре, хорошо очищают воду и обогащают её кислородом. Это делает рясковые ценным объектом для морфогенетических, физиологических и биохимических исследований.

Клеточные культуры растений. В последние 30 лет в биотехнологической промышленности активно используются клеточные культуры растений. *Сферы применения культур растительных клеток.*

Культуры клеток высших растений имеют две сферы применения:

1.Изучение биологии клетки, существующей вне организма, обуславливает ведущую роль клеточных культур в фундаментальных исследованиях по генетике и физиологии, молекулярной биологии и цитологии растений. Популяциям растительных клеток присущи специфические особенности: генетические, эпигенетические (зависящие от дифференцированной активности генов) и физиологические. При длительном культивировании гетерогенной по этим признакам популяции идет размножение клеток, фенотип и генотип которых соответствуют данным условиям выращивания, следовательно, популяция эволюционирует. Все это позволяет считать, что культуры клеток являются новой экспериментально созданной биологической системой, особенности которой пока мало изучены. Культуры клеток и тканей могут служить адекватной моделью при изучении метаболизма и его регуляции в клетках и тканях целого растения.

2. Культивируемые клетки высших растений могут рассматриваться как типичные микрообъекты, достаточно простые в культуре, что позволяет применять к ним не только аппаратуру и технологию, но и логику экспериментов, принятых в микробиологии. Вместе с тем, культивируемые клетки способны перейти к программе развития, при которой из культивируемой соматической клетки возникает целое растение, способное к росту и размножению.

Можно назвать несколько направлений создания новых технологий на основе культивируемых тканей и клеток растений:

1. Получение биологически активных веществ растительного происхождения: традиционных продуктов вторичного метаболизма (токсинов, гербицидов, регуляторов роста, алкалоидов, стероидов, терпеноидов, имеющих медицинское применение);

синтез новых необычных соединений, что возможно благодаря исходной неоднородности клеточной популяции, генетической изменчивости культивируемых клеток и селективному отбору клеточных линий со стойкими модификациями, а в некоторых случаях и направленному мутагенезу;

культивируемые в суспензии клетки могут применятся как мультиферментные системы, способные к широкому спектру биотрансформаций химических веществ (реакции окисления, восстановления, гидроксилирования, метилирования, деметилирования, гликолизирования, изомеризации). В результате биотрансформации получают уникальные биологически активные продукты на основе синтетических соединений или веществ промежуточного обмена растений других видов.

2. Ускоренное клональное микроразмножение растений, позволяющее из одного экпланта получать от 10000 до 1000000 растений в год, причем все они будут генетически идентичны.

3. Получение безвирусных растений.

4. Эмбриокультура и оплодотворение in vitro часто применяются для преодоления постгамной несовместимости или щуплости зародыша, для получения растений после отдаленной гибридизации. При этом оплодотворенная яйцеклетка вырезается из завязи с небольшой частью ткани перикарпа и помещается на питательную среду. В таких культурах можно также наблюдать стадии развития зародыша.

5. Антерные культуры – культуры пыльников и пыльцы используются для получения гаплоидов и дигаплоидов.

6. Клеточный мутагенез и селекция. Тканевые культуры могут производить регенеранты, фенотипически и генотипически отличающиеся от исходного материала в результате сомаклонального варьирования. При этом в некоторых случаях можно обойтись без мутагенной обработки.

7. Криоконсервация и другие методы сохранения генофонда.

8. Иммобилизация растительных клеток.

9. Соматическая гибридизация на основе слияния растительных протопластов.

10.Конструирование клеток путем введения различных клеточных органелл.

11.Генетическая трансформация на хромосомном и генном уровнях.

12. Изучение системы «хозяин – паразит» с использованием вирусов, бактерий, грибов и насекомых).

Взаимодействие растений и микроорганизмов. В научном Центре «Биоинженерия» РАН проводятся исследования по использованию растений в биотехнологии. В современной геномике растений и биотехнологии большой интерес вызывают молекулярные механизмы взаимодействия растений с полезными микроорганизмами, которые ответственны за повышение продуктивности растений, улучшение их питания и стимулирование роста, биоконтроль фитопатогенов. Использование

специфических растительно-микробных сообществ позволит сократить применение агрохимикатов, перейти к энергосберегающим технологиям в сельском хозяйстве, уменьшить загрязнение окружающей среды и сберечь здоровье населения в регионах интенсивного земледелия.

В настоящее время НЦ «Биоинженерия» предусматривает реализацию ряда задач:

- осуществление расшифровки полной нуклеотидной последовательности генома картофеля (общий размер генома 840 млн. п.н.) намечено на конец 2010 г. Решение этой задачи возложено на Международный Консорциум по секвенированию генома картофеля (PGSC), в который входит Центр «Биоинженерия» РАН, выполняющий секвенирование 12-ой хромосомы картофеля;
- расшифровка полного хлоропластного генома ряски малой *Lemna minor*, одного из наиболее перспективных растений для проведения генетической трансформации хлоропластов;
- исследование сосуществования биотехнологических растений (в условиях различных систем ведения сельского хозяйства) и дикорастущих родственных видов в центрах происхождения и разнообразия видов. Например, устойчивой к гербицидам сои в центре происхождения и разнообразия на Дальнем Востоке России;
- оценка биоразнообразия с помощью новых молекулярных методов в целях поиска новых источников агрономически ценных генов *Solanaceae Poaceae, Lemnaceae;*
- оценка биоразнообразия и исчезновения видов. Идентификация сортов. Молекулярный филогенез и таксономия.
- использование растительных вирусов как векторов для экспрессии чужеродного белка и носителей:

Растительные вирусы быстро продуцируются (до граммовых количеств / на кг сырого веса растительного сырья). Векторы экспрессии на основе растительных вирусов могут быть сконструированы и протестированы за дни-недели.

В области агробиотехнологии предполагается создание новых биотехнологических сортов сельскохозяйственных растений российской селекции в следующих направлениях:

Картофель - устойчивость к колорадскому жуку

Кабачки- вирусоустойчивость

Сахарная свекла - солеустойчивость

Подсолнечник - гербицидоустойчивость

Разработана технология создания трансгенных растений *Nicotiana tabacum,* экспрессирующих ген, кодирующий мембранную H+PPase фотосинтезирующей бактерии *Rhodospirillum rubrum* (RPP>). Предварительные эксперименты по изучению устойчивости трансгенных растений к засолению почв показали повышение устойчивости к высокой концентрации NaCl в почве по сравнению с растениями дикого вида.

Трансгенные растения аккумулировали в тканях листьев меньше ионов Na + , чем растения дикого типа при высокой засоленности.

Впервые на основе сортов картофеля отечественной селекции российскими учеными получены 2 ГМ сорта картофеля, устойчивые к *Colorado beetle*. Интеграция признака устойчивости осуществлена с использованием принципиально нового для российской селекции метода - генетической инженерии. Положено начало организации промышленного производства семенного материала с созданием системы дистрибуции на территории России.

Картофель - вторая по значимости сельскохозяйственная культура для России и Казахстана после пшеницы, и, следовательно, один из наиболее важных объектов научных исследований в геномике растений и молекулярной биологии. Работы по созданию ГМ сортов картофеля, устойчивых к гербицидам, насекомым, грибным и вирусным заболеваниям, ведутся в этих странах на протяжении последних 15 лет.

В настоящее время в Казахстане на основе биотехнологий методом апикальной меристемы оздоровлены от вирусов перспективные сорта для возделывания в различных почвенно-климатических зонах страны, а также методом отбора устойчивых сомаклонов получены различные устойчивые к стрессовым воздействиям внешней среды резистентные сорта.

Разработанные сорта Центра «Биоинженерия» биотехнологического картофеля, устойчивые к *Colorado beetle*, прошли все требуемые испытания на биобезопасность, а также полевые испытания и признаны российскими государственными уполномоченными органами такими же безопасными, как и традиционные сорта. Они получили государственную регистрацию для использования в качестве пищевого продукта.

Вопросы для самоконтроля

1. Для каких целей используются растения в биотехнологии?
2. Каково значение культуры клеток растений в промышленной биотехнологии?
3. Как используется взаимодействие растений и микроорганизмов?
4. Как можно получать устойчивые к стрессовым воздействиям внешней среды резистентные сорта?

Лекция 14. Основные принципы промышленной организации биотехнологических процессов

План

1. Стадии биотехнологического производства.
2. Процессы промышленной биотехнологии.
3. Технология приготовления питательных сред для биосинтеза.
4. Получение засевной дозы.

Стадии биотехнологического производства Большое разнообразие биотехнологических процессов, нашедших промышленное применение, приводит к необходимости рассмотреть общие, наиболее важные проблемы, возникающие при создании любого биотехнологического производства. Процессы промышленной биотехнологии разделяют на 2 большие группы: производство биомассы и получение продуктов метаболизма. Однако такая классификация не отражает наиболее существенных с технологической точки зрения аспектов промышленных биотехнологических процессов. В этом плане необходимо рассматривать стадии биотехнологического производства, их сходство и различие в зависимости от конечной цели биотехнологического процесса. В общем виде система биотехнологического производства продуктов микробного синтеза представлена на рис. 1. Существует 5 стадий биотехнологического производства.

Две начальные стадии включают подготовку сырья и биологически действующего начала. В процессах инженерной энзимологии они обычно состоят из приготовления раствора субстрата с заданными свойствами (pH, температура, концентрация) и подготовки партии ферментного препарата данного типа, ферментного или иммобилизованного. При осуществлении микробиологического синтеза необходимы стадии приготовления питательной среды и поддержания чистой культуры, которая могла бы постоянно или по мере необходимости использоваться в процессе. Поддержание чистой культуры штамма-продуцента - главная задача любого микробиологического производства, поскольку высокоактивный, не претерпевший нежелательных изменений штамм может служить гарантией получения целевого продукта с заданными свойствами

Третья стадия - стадия ферментации, на которой происходит образование целевого продукта. На этой стадии идет микробиологическое превращение компонентов питательной среды сначала в биомассу, затем, если это необходимо, в целевой метаболит.

На четвертом этапе из культуральной жидкости выделяют и очищают целевые продукты. Для промышленных микробиологических процессов характерно, как правило, образование очень разбавленных растворов и суспензий, содержащих, помимо целевого, большое количество других веществ. При этом приходится разделять смеси веществ очень близкой

природы, находящихся в растворе в сравнимых концентрациях, весьма лабильных, легко подвергающихся термической деструкции

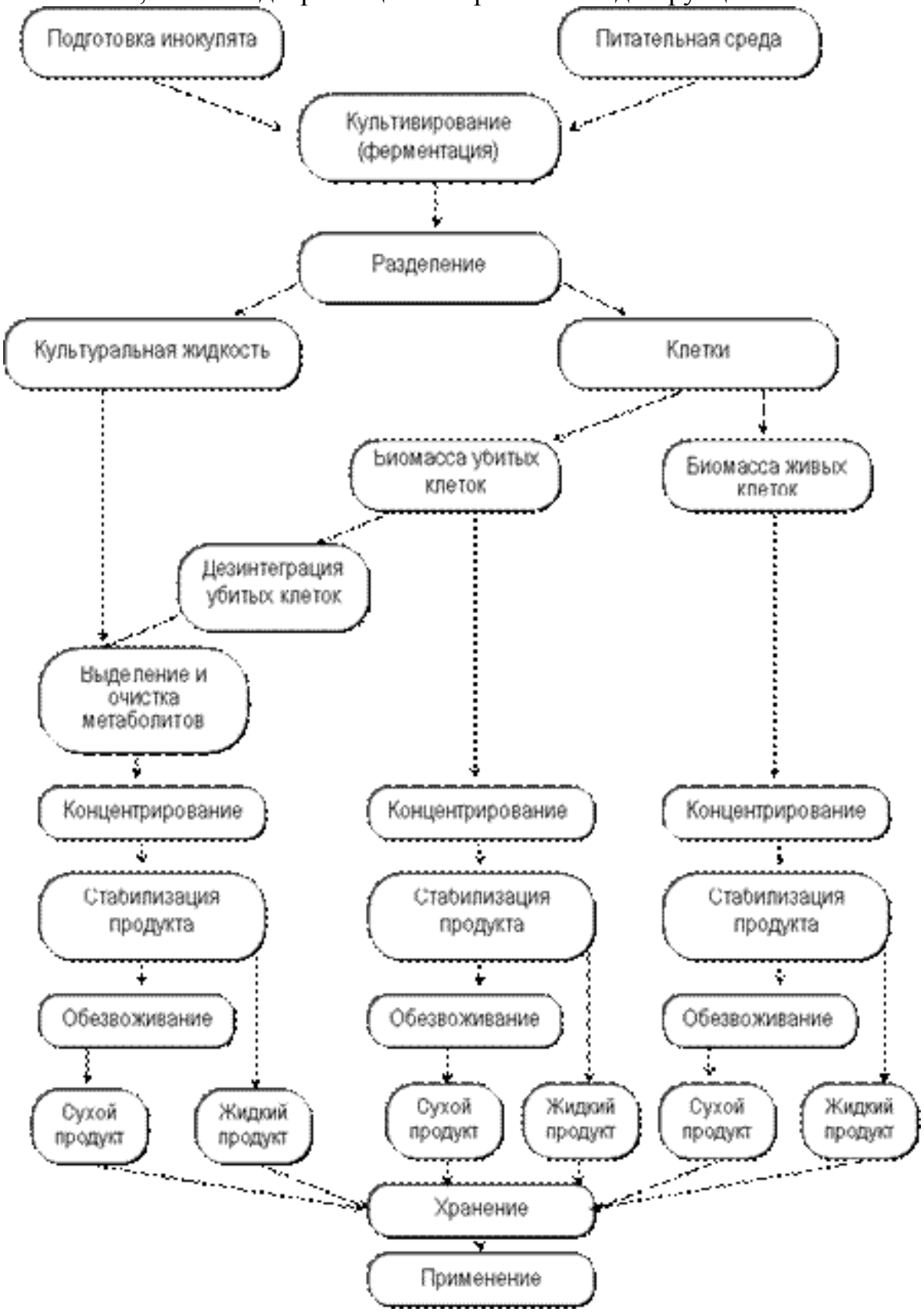


Рисунок 24 - Система биотехнологического производства

Заключительная стадия биотехнологического производства - приготовление товарных форм продуктов. Общим свойством большинства продуктов микробиологического синтеза является их недостаточная стойкость к хранению, поскольку они склонны к разложению и в таком виде представляют прекрасную среду для развития посторонней микрофлоры. Это заставляет технологов принимать специальные меры для повышения сохранности препаратов промышленной биотехнологии. Кроме того, препараты для медицинских целей требуют специальных решений на стадии расфасовки и укупорки, так должны быть стерильными. Далее приводится характеристики каждой из стадий промышленного микробиологического синтеза.

Технология приготовления питательных сред для биосинтеза. Основу питательных сред для культивирования микроорганизмов составляют источники углерода. Кроме углерода клетки микроорганизмов в процессе роста испытывают потребность в азоте, фосфоре, макро- и микроэлементах. Все вещества этого рода находятся в питательных средах в виде солей, исключение составляют среды, где азот и фосфор могут усваиваться растущими культурами из органических источников, например автолизатов или гидролизатов микробного или животного происхождения.

Отделения приготовления питательной среды представляет собой цех, оборудованный емкостями для хранения жидких и твердых веществ, средствами их транспортировки и аппаратами с перемешивающими устройствами для приготовления растворов, суспензий или эмульсий. При этом питательные соли хранятся обычно в твердом виде, а приготовление их смеси с заданным соотношением компонентов производится в аппарате с мешалкой, куда подаются твердые компоненты в необходимом количестве и далее происходит их растворение. Иногда соединяются и перемешиваются заранее приготовленные растворы. Жидкие и твердые источники углерода обычно вводят в уже готовую питательную среду непосредственно перед ферментацией, так как это устраняет опасность заражения посторонней микрофлорой, вероятность которого возрастает при хранении готовой питательной смеси.

При непрерывном культивировании в производстве микробного белка углеводороды и растворы солей вводят в ферментер раздельно по индивидуальным линиям, а смешение и эмульгирование нерастворимых в воде n-алканов происходит уже в самом биореакторе. При культивировании бактерий на метане последний постоянно барботируют в аппарат через специальные устройства.

При периодической ферментации в начале процесса инокулят (засевная доза микроорганизмов) вносится в уже готовую питательную среду, содержащую все компоненты. Поэтому источники углерода вводят непосредственно перед засевом или отдельные компоненты среды вводят по мере потребления их культурой, поддерживая в ферментере некоторую оптимальную их концентрацию, которая на разных этапах ферментации может меняться по определенному закону.

Важнейшим элементом приготовления питательных сред является соблюдение требований асептики. Это либо создание заданного значения pH, обеспечивающего подавление посторонних микроорганизмов, либо полная стерилизация всех подаваемых потоков и самого биореактора.

Для стерилизации газовых потоков (в первую очередь воздуха) используют процесс фильтрации через специальные волокнистые фильтры с последовательно расположенными фильтрующими элементами. Фильтрующий материал периодически стерилизуется подачей острого пара в отключенный фильтр через заданные промежутки времени. Жидкостные потоки стерилизуют различными методами, из которых практический интерес представляют термический, радиационный, фильтрационный и отчасти химический.

Термический - самый распространенный, при температурах порядка 120-150°C.

Радиационный - □-излучение, применяется редко из-за трудностей создания и эксплуатации мощных источников этого излучения.

В отдельных случаях применяют химические стерилизующие агенты (вещества с ярко выраженным асептическим действием). Основная проблема в этом случае - необходимость устранения стерилизующего агента из питательной среды после гибели микрофлоры до внесения инокулята. Химические антисептики должны быть не только высокоэффективны, но и легко разлагаемы при изменении условий после завершения стерилизации. К числу лучших относится пропиолактон, обладающий сильным бактерицидным действием и легко гидролизуемый в молочную кислоту.

Мало распространен и метод фильтрации, что объясняется аппаратными трудностями. Метод основан на способности полупроницаемых мембран с крупными порами пропускать жидкую фазу и концентрировать клетки микроорганизмов. В принципе этот метод является идеальным для стерилизации термически неустойчивых жидких и газовых средств, поскольку может осуществляться при низкой температуре и требует лишь градиента давления по разные стороны мембраны. Основная трудность - наличие термостойких мембран, способных выдерживать многократную стерилизацию их самих. В настоящее время эта проблема решается путем применения термостойких полимеров в производстве мембран.

В заключение заметим, что ряд субстратов не требует стерилизации, так как они сами обладают асептическим действием; сюда относят метанол, этанол, концентрированная уксусная кислота и др. В этом случае ограничиваются стерилизацией прочих элементов питательной среды.

Получение засевной дозы.

В технологическом процессе используются полезные свойства штамма, следовательно, необходимо сохранять и, если возможно, улучшать его производственные качества. Поэтому в биотехнологическом производстве имеется отделение чистой культуры, в задачей которого является постоянное и надежное воспроизведение полезных свойств продуцента, найденных или достигнутых в свое время в ходе лабораторных исследований. Такое

отделение проводит лабораторные операции по контролю и сохранению чистой культуры, а также маломасштабное культивирование для постоянной передачи штамма на стадию ферментации.

Фактически это микробиологическая лаборатория, с музеем штаммов-продуцентов. В ходе контрольных высевов и маломасштабных ферментаций (в пробирках, колбах и т. д.) контролируется устойчивость всех имевшихся или приобретенных признаков, послуживших основанием для рекомендации к промышленному применению этих культур. По мере необходимости из отделения чистой культуры поступает заданная масса инокулята, идущая в производство.

При периодическом процессе культивирования (при производстве метаболитов) в отделении чистой культуры готовят засевную дозу клеток для каждой из операций основного производства. При непрерывном производстве кормового белка этого не требуется, однако для повышения качества продукта предпочитают время от времени вводить клетки штамма-продуцента из отделения чистой культуры. Для этого в отделении имеется ферментационная часть, где производится выращивание достаточно крупных партий микроорганизма продуцента.

Посевные дозы выращиваются последовательно в колбах и бутылях на 10-20 литров, находящихся на качалках или просто в термостатируемом помещении, и далее в последовательности ферментеров объемом (по необходимости) 10, 100, 500 и 1000 литров, в которых осуществляется перемешивание, аэрация и термостатирование культуральной жидкости с клетками.

Отделение чистой культуры должно иметь достаточно большую коллекцию штаммов продуцентов, так как возможны временные переходы с одного штамма на другой, вызванные различными причинами. Например, сезонные изменения температуры частично компенсируются подбором достаточно продуктивных термотолерантных штаммов. Кроме того, микробиологическая промышленность зачастую вынуждена использовать в качестве компонентов питательных сред отходы сельского хозяйства и пищевой промышленности (меласса, кукурузный экстракт), что ведет к сезонным изменениям сырья и предполагает адаптацию продуцента к особенностям среды. Все это делает роль микробиологической службы производства достаточно высокой.

Вопросы для самоконтроля

1. Что собой представляет биотехнологическое производство?
2. Из каких систем состоит биотехнологическое производство?
3. Что представляет собой засевная доза?

Лекция 15. Этапы промышленного биотехнологического производства

План

1. Стадия ферментации.
2. Устройство ферментера.
3. Основные элементы ферментера.

Стадия ферментации - центральная среди этапов промышленного производства. Под ферментацией понимают всю совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную среду инокулята до завершения процессов роста, биосинтеза или биотрансформации.

Ферментация проходит в специальных емкостях, называемых ферментерами или биореакторами. Конструкция биореактора приведена на рис. 3. Основными элементами ферментера являются двойные стенки, промежуток между которыми заполняется охлаждающей или нагревающей жидкостью, входные отверстия для газовых и жидких потоков, система контроля за составом питательной среды и условиями внутри реактора.

Поскольку в промышленной биотехнологии выделяют 2 типа процессов - накопление биомассы и накопление ценных веществ, возникающих в ходе роста и последующего развития культуры, то меняется и характер построения производства во времени.

Биомасса одноклеточных выращивается непрерывным способом в аппаратах хемостатного типа, а все процессы второй группы осуществляются периодически, когда в одном и том же аппарате в производственном цикле протекают все необходимые фазы развития клеток и биосинтеза.

Процессы двух рассматриваемых типов отличаются по требованиям к степени асептики, что связано с их объёмами - белок одноклеточных выпускается миллионами тонн сухого вещества, а выпуск продуктов второго типа составляет, как максимум, тысячи или десятки тысяч тонн. Поэтому в производстве белковых веществ ограничиваются достаточно высокой, но не 100% степенью асептики, обеспечивая последнюю подбором режима культивирования, подходящего для продуцента, но неблагоприятного для возможных примесных штаммов.

Технологическое оформление процессов промышленной биотехнологии в значительной мере определяется отношением микроорганизма-продуцента к кислороду.

При использовании аэробных культур ферментационное оборудование и нормы технологического режима подбираются таким образом, чтобы массообмен (перенос кислорода из газовой в жидкую фазу) обеспечивал поступление кислорода к клеткам в количествах, необходимых и оптимальных для данной культуры в данной фазе роста.

Промышленное использование факультативных анаэробов не ставит задачи абсолютного исключения кислорода из среды, поэтому процессы этого типа (брожение) технологически проще аэробных. В начальной фазе

этих процессов требуется лишь удалить кислород из газовой фазы над культуральной жидкостью, что может быть достигнуто введением инертного газа или просто вытеснением воздуха углекислотой, выделяемой клетками при метаболизме.

Технологическое оформление строго анаэробных процессов сложнее, чем для процессов брожения, так как в этом случае необходимо полностью исключить возможность попадания кислорода в газовую, а оттуда и в жидкую среду.

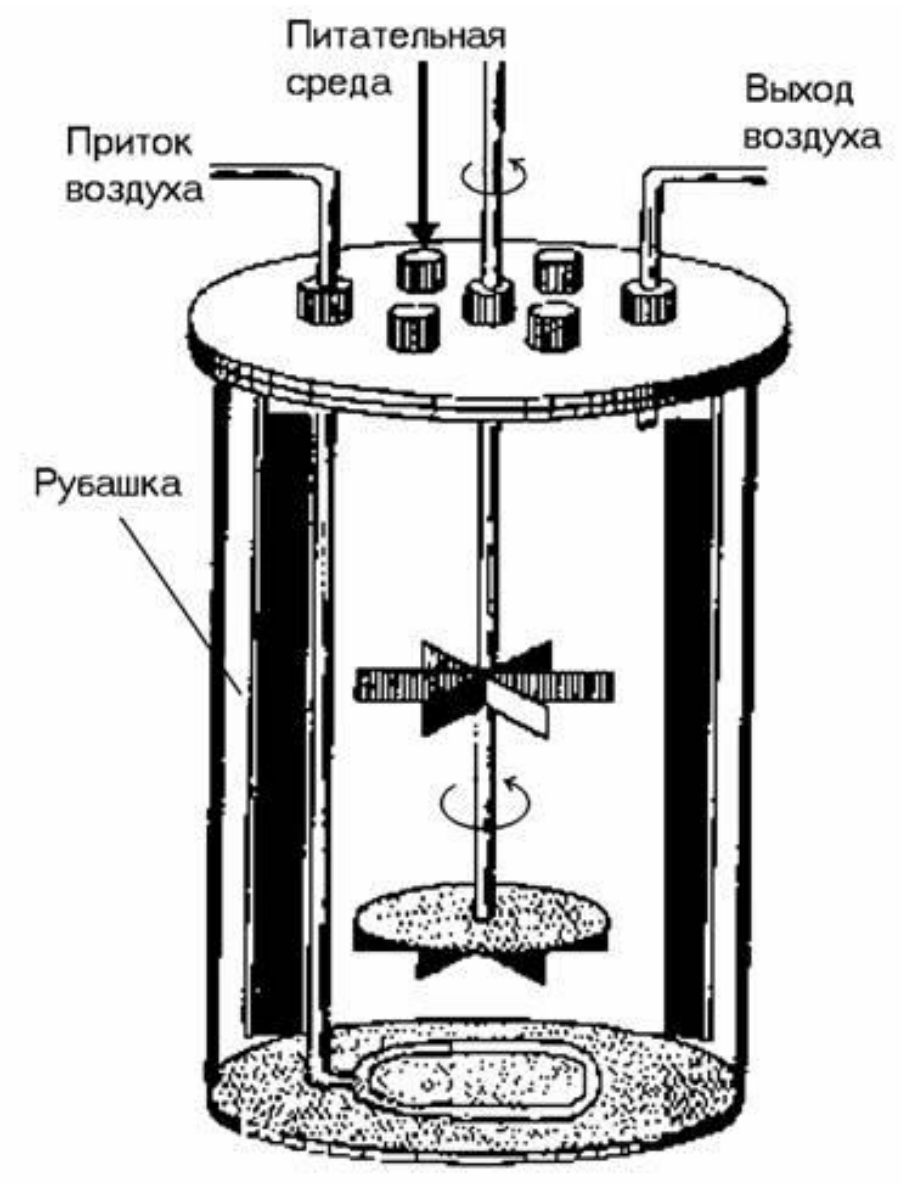


Рисунок 25 - Устройство ферментера

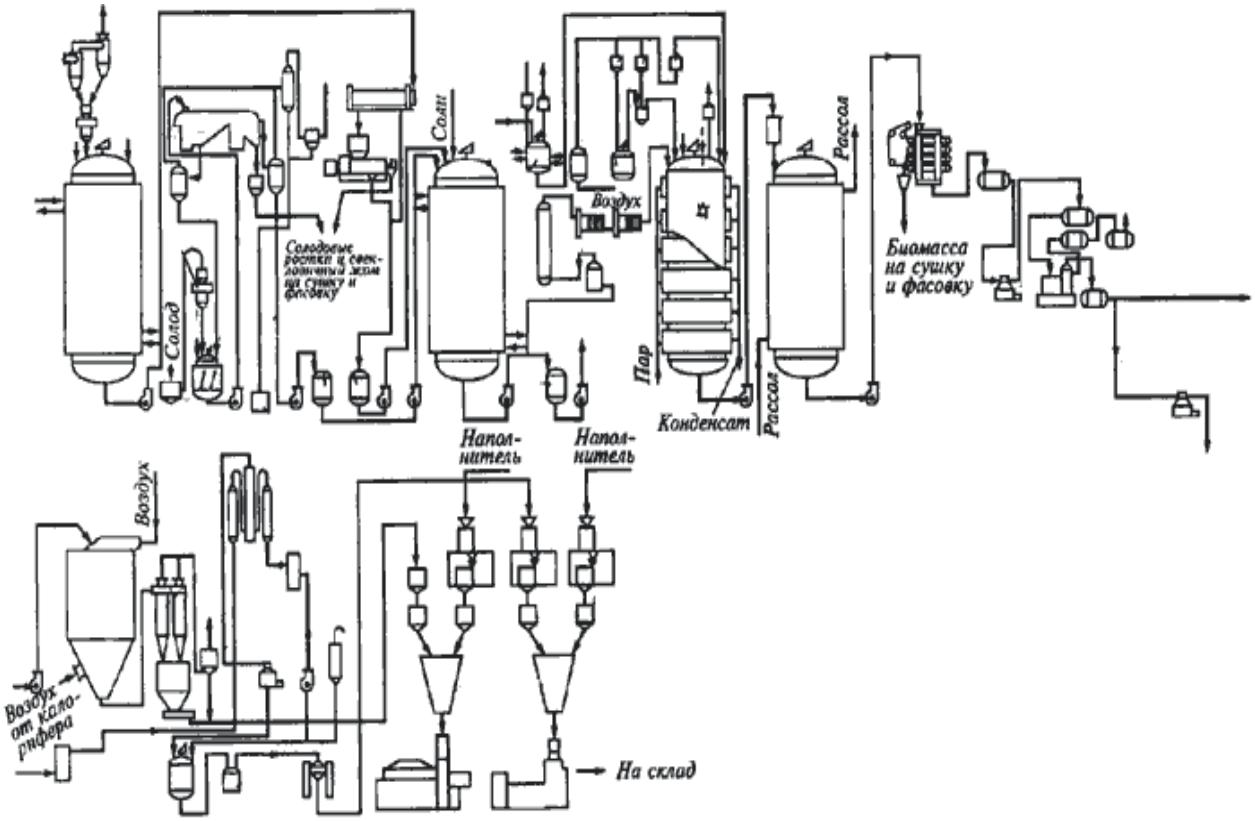
Вопросы термостатирования ферментационного процесса (подвода или отвода тепла в ходе ферментации) являются очень острыми в целом ряде производств биотехнологии. В аэробных условиях микробиологический синтез протекает со значительным тепловыделением, что вызывает необходимость отвода тепла из аппаратов большого объема (сотни и тысячи кубометров). Технологические требования к скорости теплоотвода очень жесткие из-за узкого температурного оптимума роста культуры (2-3up>^{o}C). Наиболее приемлимый на практике способ теплоотвода - охлаждение водой через змеевики, рубашки и др. устройства - осложняется небольшой разностью температур между содержимым биореактора (32-34°C для дрожжей *Candida*) и охлаждающей водой (20°C), температура которой в жаркое время года еще выше. Поэтому в реакторе создается развитая поверхность газообмена, увеличивается скорость движения жидкостей и т.д.

Важно также поддерживать определенный состав питательной среды. В непрерывных процессах биосинтеза задача технолога сводится к поддержанию концентрации всех питательных веществ (и кислорода) и дозированному введению кислоты или щелочи для pH-статирования системы на заданном уровне. Простейшим вариантом управления стадией ферментации в периодическом режиме является изменение концентраций компонентов среды и её pH, а также введение необходимых добавок по заранее разработанной программе, реализуемой технологом в каждом цикле ферментации. Этот способ относительно прост и легко поддается автоматизации.

Во многих случаях необходимо возможно полно исчерпывать компоненты питательной среды, чтобы они не попадали на последующие стадии переработки. Эта необходимость может быть вызвана рядом причин:

- дороговизна или дефицитность субстрата;
- вредное воздействие субстрата на качество готового продукта(например, при производстве дрожжей на парафинах , когда выделение остаточных количеств углеводородов из клеточной массы затруднено, поэтому добавляют дополнительные секции для дозревания или утилизации запасенных в цитоплазме углеводородов);
- затруднения, возникающие на стадии выделения и очистки метаболитов при одновременном присутствии в культуральной жидкости неутилизированных веществ.

Рисунок 26 - Линия производства ферментных препаратов



Состав линии

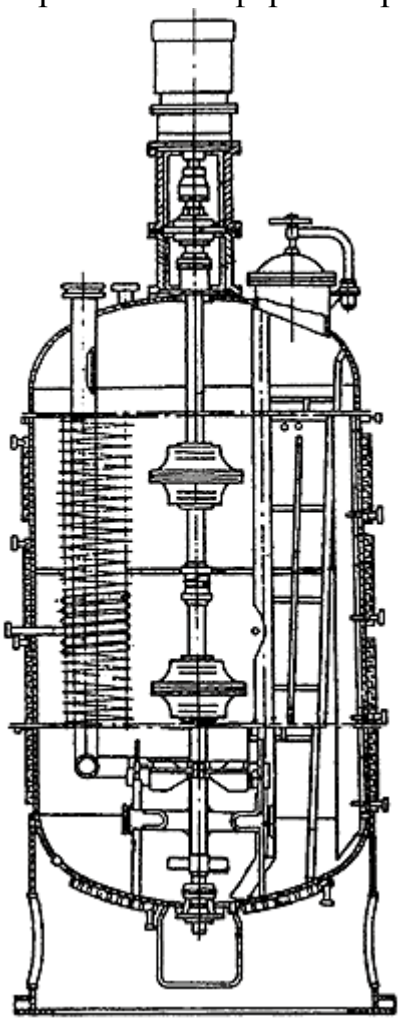
- Аппарат для отсушки ферментного осадка
- Барабанная вакуум-сушилка
- Барометрический конденсатор
- Барометрический ящик
- Бункеры
- Вакуум-выпарной аппарат
- Вакуум-фильтр
- Весы
- Выдерживатель
- Измельчитель
- Камерный фильтр
- Конденсатор
- Ловушка
- Мерник
- Насос
- Подъемник
- Приемник
- Распылительная или сублимационная сушилка
- Ресивер
- Рукавный фильтр
- Сборники
- Сепараторы
- Смеситель
- Стекатель
- Стерилизаторы
- Теплообменники
- Установка непрерывного осаждения
- Фасовочные машины
- Ферментатор
- Фильтры
- Центрифуга
- Циклоны
- Шнековый транспортер
- Шнек-пресс
- Экстрактор

Ферментаторы с механическим перемешиванием барботажного типа

Ферментаторы с механическим перемешиванием барботажного типа широко *применяются для*стерильных процессов выращивания микроорганизмов - продуцентов биологически активных веществ.

Ферментатор такого типа представляет собой вертикальный аппарат цилиндрической формы, изготовленный из стали *Х18Н10Т* или биметалла с эллиптическими крышкой и днищем.

Рисунок 27 – Барботажный ферментер



Отношение высоты к диаметру равно 2,6 : 1. На крышке аппарата расположен привод перемешивающего устройства, состоящий из электродвигателя, редуктора, муфты, подшипника и сальника.

Здесь же установлены штуцеры для загрузки питательной среды и посевного материала, подачи и вывода воздуха, смотровые окна, люки для погружения моющей механической головки; предохранительный клапан.

Для выгрузки культуры в днище аппарата предусмотрен спускной штуцер. Внутри корпуса проходит вал с закрепленными на нем перемешивающими устройствами, состоящими из закрытых турбин.

Барботер соединен с трубой для подвода воздуха и выполнен в виде разборного ромба из перфорированных труб.

В верхней его части расположены в шахматном порядке 2000...3000 отверстий. Вал и перемешивающие устройства с муфтами приводятся во вращение от мотор-редуктора.

Ферментатор оборудован рубашкой, состоящей из 6...8 ярусов-секций.

Каждая секция состоит из 8 навитых опоясывающих каналов, выполненных из уголкового профиля.

Площадь поверхности охлаждения рубашки 60 м^2, внутренняя поверхность которой состоит из змеевиков диаметром 600 мм и общей высотой 2,4 м.

Ферментатор рассчитан для работы под избыточным давлением 0,25 МПа и стерилизации при 130... 140 °С, а также для работы под разрежением. В процессе выращивания микроорганизмов давление внутри ферментатора в пределах 50 кПа; расход стерильного воздуха до 1 $м^3$/мин. Высота столба жидкости в аппарате 5...6 м при высоте аппарата более 8 м.

Для обеспечения стерильности процесса предусмотрены торцевые уплотнения вала перемешивающего устройства с паровой защитой. Торцевые уплотнения рассчитаны для работы при давлении до 0,28 МПа и остаточном давлении не ниже 2,7 кПа, температуре 30... 250 °С и частоте вращения вала до 500 $мин^{-1}$.

С помощью торцевых уплотнений удается практически полностью предотвратить утечку среды или попадание воздуха в полость аппарата в месте вывода вала. Торцевые уплотнения, соприкасающиеся с рабочей средой, изготовляются из стали *Х18Н10Т и Х17Н13М2Т*, а также из титана *ВТ-10*.

Длительность безотказной работы торцевого уплотнения не менее 2000 ч при ресурсе работы 8000 ч. Допустимое радиальное биение вала в зоне торцевого уплотнения не более 0,25 мм, угловое биение вала не более 0,25°.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие типы ферментеров используются в промышленности?
2. Принцип работы ферментера?

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

www. Wikipedia
www.biotechnolog.ru
Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск: ИЦ и Г СО РАН, 1993. 241 с.
Мартинек К. Иммобилизованные ферменты // Биотехнология. М.: Наука, 1984.
Печуркин Н.С., Брильков А.В., Марченкова Т.В. Популяционные аспекты биотехнологии. Новосибирск: Наука, 1990. 173 с.
Скрябин Г.К., Кощеенко К.А. Иммобилизованные клетки микроорганизмов // Биотехнология. М.: Наука, 1984.
Хотянович А.В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применение препаратов на их основе (методические рекомендации). Л., 1991. 60 с.
Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. 566 с.
Шевелуха В.С.Сельскохозяйственная биотехнология. Высшая школа, М., 2000, 420 стр.
Рогов И.А., Антипова Л.В., Шуваева Г.П. Пищевая биотехнология. Книга 1, «КолосС», М, 2004, 440 стр.
Иванова Л.А..Войно Л.И., Иванова И.С. Пищевая биотехнология. Книга 2, «КолосС», М, 2004, 472 стр.

Лесова Ж.Т.

ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебное пособие

Подписано в печать 26.12.2011г. Формат 60х80. 1/16. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Объем 5,0 п.л. Тираж 500 экз.. Заказ №
Типография
адрес: 050012 г.Алматы, 12 микрорайон, д.16- 69.
Тел.: 221-84-55