

# Промышленная микробиология

Под общей редакцией  
проф. Н.С. Егорова

Допущено Государственным комитетом СССР по народному образованию в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям «Микробиология» и «Биология».



Москва  
«Высшая школа» 1989

ББК 28.4  
П 81  
УДК 663.18

Авторы

З. А. Аркадьева, А. М. Безбородов, И. Н. Блохина, Л. И. Воробьева, Е. Л. Головлев, Л. А. Головлева, С. А. Голубева, Н. Н. Гречушкина, В. Г. Дебабов, Н. С. Егоров, В. К. Ерошин, Н. И. Жданова, М. В. Залашко, Е. Н. Кондратьева, Н. В. Кандыбин, Г. И. Каравайко, Е. И. Квасников, К. А. Кошечко, В. Н. Крылов, М. С. Лойцянская, Б. М. Нахманович, О. А. Нестеренко, П. И. Николаев, Е. С. Панцхава, М. Н. Пименова, В. К. Плакунов, Т. Е. Попова, И. Л. Работнова, Е. Л. Рубан, Г. К. Скрыбин, Е. П. Феофилова, Т. В. Финогенова, А. В. Хотянович, И. Ф. Щелочкова

Рецензенты:

кафедра микробиологии Казанского государственного университета имени В. И. Ульянова-Ленина (зав. кафедрой д-р биол. наук, проф. И. Б. Лещинская); академик АН ЛатвССР М. Е. Бекер

**Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов**  
П 81 по спец. «Микробиология» и «Биология»/З. А. Аркадьева, А. М. Безбородов, И. Н. Блохина и др.; Под ред. Н. С. Егорова. — М.: Высш. шк., 1989. — 688 с.: ил.

ISBN 5—06—001482—7

В пособие приведены характеристики микроорганизмов, методы их получения, селекции, культивирования и хранения, перспективы развития производств, основанных на применении микроорганизмов в биотехнологических процессах (получение пищевого и кормового белка, ферментов, удобрений, антибиотиков, кислот и др.).

Рассматриваются вопросы применения микроорганизмов в процессах брожения, при добыче полезных ископаемых, очистке окружающей среды и др.

П 2003000000(430900000) — 097  
001(01)—89 92—88

БК 28.4  
57А

*Учебное издание*

**Аркадьева Зинаида Александровна, Безбородов Алексей Михайлович,  
Блохина Ирина Николаевна и др.**

**Промышленная микробиология**

Заведующий редакцией *И. М. Шасирова*. Редактор *К. Г. Парсаданова*. Младшие редакторы *Е. И. Попова, Е. В. Бурова*. Художник *В. Н. Хомяков*. Художественный редактор *Т. А. Коленкова*. Технический редактор *Т. Д. Гарина*. Корректор *С. К. Завьялова*

ИБ № 7311

Изд. № Е-546. Сдано в набор 03.12.87. Подш. в печать 08.12.88. Т 18580. Формат 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бум. тип. № 1. Гарнитура Литературная. Печать офсетная. Объем 43,0 усл. печ. л. 43,0 усл. кр.-отт. 47,02 уч. изд. л. Тираж 11 000 экз. Заказ № 1093. Цена 1 р. 90 к.

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул., д. 29/14.

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.

ISBN 5—06—001482—7

© Издательство «Высшая школа», 1989



# Предисловие

Промышленная микробиология составляет в настоящее время основную часть биотехнологии и приобретает все большее значение в народном хозяйстве. -

Для студентов университетов и других вузов, специализирующихся в области микробиологии, важно детально познакомиться с промышленными процессами, основанными на применении микроорганизмов, а также иметь представление о перспективах их развития.

В задачу настоящей книги входило осветить основные разделы современной промышленной микробиологии, а также дать представление об основных достижениях в области фундаментальных исследований, на которых базируются различные микробиологические производства, и рассмотреть важнейшие из них.

Материал, излагаемый в книге, распределен по 34 главам, составляющим 4 раздела. Первый из них начинается с краткого очерка истории возникновения и начальных этапов развития промышленной микробиологии. Далее рассматриваются свойства микроорганизмов, имеющие важное значение для практического использования, методы селекции и получения новых штаммов с полезными свойствами, пути управления биохимической активностью микроорганизмов, а также методы их культивирования, хранения и защиты от поражения вирусами (фагами).

Второй раздел посвящен вопросам получения с помощью микроорганизмов различных биологически активных веществ: антибиотиков, витаминов, аминокислот, ферментов и др.

В третьем разделе рассматриваются практически важные данные о брожениях и других микробиологических процессах, ведущих к получению продуктов питания, органических кислот, спиртов, растворителей, газообразного топлива, а также пути использования микроорганизмов для трансформации стероидов и других органических веществ. В этот раздел включена глава об использовании микроорганизмов для выщелачивания и осаждения разных металлов с целью повышения их выхода.

В четвертый раздел включены главы, в которых описываются такие важные процессы, как получение биомассы микроорганизмов, богатой белком; живых бактериальных препаратов, используемых в сельском хозяйстве; производство вакцин и бактериофагов и применение иммобилизованных клеток микроорга-

низмов. Завершает книгу глава, в которой рассматриваются роль микроорганизмов в биокоррозии разных материалов и способы предупреждения этого явления, наносящего существенный ущерб народному хозяйству.

К написанию книги привлечен большой коллектив авторов — специалистов в разных областях микробиологии, генетики, вирусологии и биотехнологии, работающих в высших учебных заведениях и научно-исследовательских институтах АН СССР, академий наук союзных республик и Министерства медицинской и микробиологической промышленности.

Книга предназначается в качестве учебного пособия для студентов-микробиологов университетов (специальность 0117), которым читается курс «Промышленная микробиология». До настоящего времени аналогичного учебного пособия студенты не имеют.

Авторы надеются, что предлагаемое учебное пособие будет также полезным для аспирантов, преподавателей, научных сотрудников, занимающихся различными вопросами промышленной микробиологии. Все замечания и предложения по совершенствованию учебного пособия будут с благодарностью приняты и учтены.

# Введение

Перед микробиологической промышленностью страны поставлены большие задачи по ускоренному развитию производств, базирующихся на микробиологическом синтезе, и обеспечению значительного роста выпуска продукции. В решении этой огромной народнохозяйственной задачи должны принять активное участие не только ученые — микробиологи, химики и технологи, но и выпускники университетов, специализировавшиеся по микробиологии. Вооружение будущих специалистов знаниями в области промышленной микробиологии — составная часть подготовки кадров микробиологов, один из основополагающих разделов обучения студентов по названной специальности.

*Промышленная микробиология* — это наука о важнейших микробиологических процессах и их практическом применении для получения индустриальным способом ценных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, их биомассы как важнейшего белкового продукта, о получении отдельных полезных веществ (препаратов), используемых в различных отраслях народного хозяйства и медицине. В основе этой науки лежит микробиологическая технология (биотехнология), являющаяся воплощением результатов фундаментальных исследований физиологии, биохимии и генетики микроорганизмов в практику.

Промышленная (иногда называют технической) микробиология — один из основных разделов современной микробиологии. Основателем этого направления науки и практики в Советском Союзе был выдающийся русский микробиолог академик В. И. Шапошников (1884—1968). Созданная им школа советских микробиологов внесла существенный вклад в становление и развитие отечественной промышленной микробиологии.

Этот раздел микробиологии рассматривает теоретически и решает практически многие проблемы, связанные с производством большого числа продуктов, образующихся в результате микробиологического синтеза. Микроорганизмы, обладая широким набором разнообразных ферментных систем, способны образовывать в процессе жизнедеятельности различные продукты обмена, весьма ценные для практической деятельности человека. Микробы также способны модифицировать природные или химически синтезированные соединения в вещества, нужные для практики.

К числу процессов, осуществляемых микроорганизмами и относящихся к промышленной микробиологии, принадлежит ряд

производств. Прежде всего это такие древнейшие производства, как хлебопечение, виноделие, пивоварение, получение уксуса, кисломолочных продуктов (простокваши, кефира, кумыса, йогурта и др.). Многие из перечисленных производств существовали в относительно широких масштабах до того, как были получены первые сведения о микроорганизмах — возбудителях указанных процессов. В качестве заквасок для этих производств использовались микроорганизмы, случайно попавшие и развившиеся в самом сырье. Однако после того, как удалось выделить микроорганизмы, осуществляющие спиртовое, молочнокислое и пропионовокислое брожения, глубоко и подробно изучить их физиологические и биохимические особенности, названные процессы были взяты под строгий научный контроль специалистов-микробиологов.

Промышленная микробиология обеспечивает соответствующие отрасли народного хозяйства молочной, масляной и лимонной кислотами, этиловым и бутиловым спиртами, ацетоном и другими продуктами брожения. В организации и становлении промышленного получения этих веществ в нашей стране, в частности молочной кислоты, бутанола и ацетона, решающую роль сыграли исследования В. Н. Шапошникова и его учеников Н. Д. Иерусалимского и М. Н. Бехтеревой; производство лимонной кислоты связано с именами С. П. Костычева (1877—1931) и В. С. Буткевича (1872—1942).

Во второй половине XX в. развитие промышленной микробиологии в СССР и во многих других странах характеризуется очень быстрыми темпами. В нашей стране создана специальная отрасль этой промышленности, возглавляемая Министерством медицинской и микробиологической промышленности СССР.

Начало бурного развития микробиологической промышленности связано с разработкой в 40-х годах XX в. промышленного получения пенициллина. Индустриальное производство этого очень ценного антибиотика и его широкое применение в медицинской практике послужили мощным стимулом поиска новых антибиотических веществ и разработки более совершенных методов их промышленного получения. В настоящее время около сотни антибиотиков, предназначенных для медицины, сельского хозяйства, пищевой промышленности, освоены микробиологической промышленностью и выпускаются в необходимых количествах. Следует подчеркнуть, что большой размах получил в последние годы выпуск химически модифицированных антибиотических средств.

Вслед за развитием антибиотической промышленности на основе ее опыта быстрое развитие получили такие отрасли промышленной микробиологии, как производство аминокислот, ферментов, витаминов, гормонов и других биологически активных соединений, синтезируемых микроорганизмами. Промышленное производство этих ценнейших продуктов жизнедеятельности микробов дало возможность здравоохранению, сельскому хозяйству и пищевой промышленности использовать названные вещества в практической деятельности.

Особенно большой размах в последнее десятилетие получило производство микробного белка — этого крайне необходимого продукта, широко используемого в сельском хозяйстве. В настоящее время в нашей стране производится около 1 млн. т микробного белка, а в дальнейшем его количество должно существенно увеличиться, так как потребность народного хозяйства в кормовом белке значительно возрастет. Этот ценнейший продукт получают в результате использования микроорганизмами непищевых веществ (парафинов, отходов молочной и мясной промышленности). В ближайшей перспективе расширение производства микробного белка будет связано с использованием одноуглеродных соединений, в частности метана и метилового спирта. Хорошие результаты получают и при использовании в качестве источника углерода этилового спирта. Применение названных соединений углерода (метана, метанола, этанола) дает возможность получать микробную массу без каких-либо посторонних примесей, а это имеет существенное значение.

Последнее десятилетие обогатило промышленную микробиологию введением в практику иммобилизованных ферментов и иммобилизованных клеток микроорганизмов. Использование иммобилизованных ферментов в технологии (инженерная энзимология) значительно повышает эффективность микробных биокатализаторов (ферментов) в производстве ряда ценных веществ, позволяет получать чистые продукты. Применение иммобилизованных клеток микроорганизмов испытано с целью получения некоторых органических кислот, отдельных антибиотиков (пенициллина, бацитрацина, низина) и других соединений. Положительные результаты исследований позволили организовать некоторые производства, основанные на использовании иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Развивающимся разделом промышленной микробиологии является процесс трансформации различных природных и химически синтезированных соединений с помощью микроорганизмов для получения более ценных препаратов, используемых прежде всего в медицинской практике, а также для очистки сбросов ряда производств от токсичных соединений. В качестве примера можно указать на биологическую трансформацию стероидов, антибиотиков, соединений пиридинового ряда.

Современная промышленная микробиология — основа биотехнологии — решает многие вопросы, связанные с биосинтезом, трансформацией и другими направлениями индустриальной деятельности, где главными «технологами» служат клетки микроорганизмов или их ферментные системы, иммобилизованные на определенном нейтральном носителе.

В связи с широким использованием микроорганизмов — продуцентов разнообразных продуктов их жизнедеятельности — первоочередными следует назвать задачи получения их высокопродуктивных штаммов, обладающих ценными биосинтетическими свойствами. Эти задачи в тесном контакте с микробиологами реша-

ют генетики, а также специалисты, владеющие методами генетической инженерии. Путем повышения биосинтеза и выхода нужного конечного продукта следует признать создание вместо монокультуры смешанных микробиологических систем, состоящих не менее чем из двух организмов: продуцента того или иного соединения и организма, стимулирующего образование этого вещества. Методы смешанного культивирования микроорганизмов находят применение при промышленном получении некоторых антибиотиков, ферментов, витаминов, метана. Используются эти методы и при очистке сточных вод. Изучение процессов, осуществляемых смешанными культурами микроорганизмов для получения ряда ценных продуктов биосинтеза, весьма прогрессивно и заслуживает серьезного внимания.

К проблемам промышленной микробиологии относятся вопросы защиты высокоактивных продуцентов различных ценных продуктов метаболизма микроорганизмов от фаговых атак, от фагового загрязнения культур микроорганизмов, используемых в промышленности. Противофаговая защита промышленных штаммов микроорганизмов представляет серьезную научную и экономическую проблему.

Разработка и совершенствование методов сохранения высокопродуктивных штаммов микроорганизмов, используемых на практике, также представляет одну из задач современной промышленной микробиологии.

Все вышесказанное — свидетельство того, что промышленная микробиология объединяет большой перечень проблем, решение которых требует широкого использования современных методов исследования и участия в этом не только микробиологов, но и специалистов других областей биологии, а также инженеров и технологов.



# Научные основы промышленной микробиологии

## Глава 1 ИСТОРИЯ ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Человек с древних времен начал использовать деятельность микроорганизмов, не подозревая об их существовании, и эмпирически совершенствовал технологию применения этих организмов во многих отраслях хозяйства. Трудно точно установить, где и в каких отраслях хозяйства впервые начали использовать жизнедеятельность микроорганизмов. По-видимому, это определялось многими факторами и шло иногда параллельными путями у разных народов.

Еще в древние времена процессы брожения использовались при приготовлении теста. В пирамидах Египта, построенных около 6000 лет назад, находили караван хлеба. Египтяне для приготовления хлеба использовали осадки броющего пивного сула. С незапамятных времен хлебные лепешки готовили в Средней Азии и других регионах.

Об изготовлении вина до нас дошло много поэтических мифов и легенд. Наибольшее количество их было создано античным миром, особенно в Греции. Находим мы их в фольклорах Греции, Италии, Персии и других стран. В пирамидах Египта сохранились рисунки, изображающие технологию приготовления вина. Около двух тысяч лет назад начало развиваться виноделие во Франции, а затем и в других странах Европейского континента. На территории Советского Союза (в Грузии, Армении, на побережье Азовского моря) вина также стали изготавливать с давних времен. Бродительные напитки в древности готовили не только из винограда, но и из других ягод (малины, ежевики, кизила). С первых шагов развития виноделия человек неизбежно сталкивался с процессом скисания вина — с образованием уксуса.

Хлебные напитки, напоминавшие современное пиво, также имеют многовековую историю. Считают, что пиво изготавливали за 7000 лет до н. э. Технология приготовления его была высоко развита в Вавилоне, откуда искусство приготовления пива было заимствовано Египтом, Персией, Грецией и другими странами. В Германии пивоварением начали заниматься одновременно с земледелием. В Армении в IV в. до н. э. умели готовить крепкое пиво. С IX в. пиво получило довольно широкое распространение

в России. В XI—XII вв. его готовили в Киевской и Новгородской Руси.

История оставила мало документов о времени возникновения изготовления кисломолочных продуктов. Однако можно утверждать, что их приготовление было известно уже в начале развития животноводства. До сих пор сохранилось много народных способов приготовления различных национальных продуктов, получаемых на основе молочнокислого и спиртового брожения: простокваша, кефир, кумыс, мацони, аэран, сузьма и др.

Пектиновое брожение, лежащее в основе мочки льна, конопля и других прядильных растений, при котором происходит разрушение пектиновых веществ с выделением из них прядильных волокон, также известно человеку 3—4 тысячелетия.

Значительно позже научились получать этиловый спирт. Спирт вначале применяли только в медицине под названием «Aquata vitae» — вода жизни. Водка вошла в быт позже. В Европе заводы, производящие винный спирт, появились в середине VII в. Получение этилового спирта описано в Вятской летописи XII в.

Эмпирически для процессов брожения были разработаны довольно сложные технологические приемы. Например, в папирусах египтян изложены способы исключения воздуха на второй ступени этих процессов.

Уже на заре своего развития человечество столкнулось не только с полезной деятельностью микроорганизмов, но и с результатами их негативного воздействия на продукты питания, здоровье человека и домашних животных и искало способы борьбы с этими явлениями.

С развитием скотоводства и земледелия и появлением в результате этого некоторых излишков пищи, которые надо было хранить, возникла необходимость разработки методов предотвращения порчи продуктов. Использовали сушку, замораживание, соление, квашение, а также исключали доступ воздуха для остановки аэробных процессов разложения (например, мясо заливали жиром). Интересно отметить, что многие практические приемы, использующиеся для приготовления пищи, напитков и для их хранения, разработанные в различных странах, были идентичны.

Во второй половине XV в. наметилось зарождение современного естествознания. В это время вышли труды группы алхимиков, подписанные «Василий Валентин», в которых отмечалась связь брожения с химическими преобразованиями. В XVII в. стало ощутимым влияние материалистических идей в естествознании. Многие крупные исследователи того времени интересовались проблемой брожения. Английский физик и химик Р. Бойль в 1661 г. писал, что, поняв природу ферментов и ферментации, можно будет лучше понять и природу возникновения различных болезней. Немецкий врач и химик Г. Э. Шталь выдвинул концепцию, согласно которой брожение — это процесс внутреннего движения белковых веществ, а фермент переносит это движение на сбраживаемые вещества.



Большой вклад в изучение химизма брожения внес французский химик А. Л. Лавуазье (1743—1794). Он почти точно количественно определил весовые пропорции водорода, углерода и кислорода в исходных и конечных продуктах брожения. Именно в этих работах была изложена основная идея закона сохранения материи.

Открыть, увидеть микроорганизмы позволило создание достаточно сильных оптических приборов. К середине XVIII в. было описано большое количество микроорганизмов. Это, как отмечал К. А. Тимирязев, был блестящий дебют микроскопа. Однако успехи в изучении свойств микроскопических организмов были незначительны.

Плодотворные исследования в этом направлении были начаты в 40-х годах XIX в. Французский ботаник Ш. Каньяр-де-Латур (1837) высказал мысль, что брожение вызывают дрожжи, которые, по его мнению, имеют растительное происхождение. Одновременно к такому же выводу пришли немецкие ученые Т. Шванн и Ф. Кютцинг. Однако теория о биологической природе брожения подверглась атаке со стороны высокоавторитетных химиков — Ю. Либиха, Ф. Вёлера, И. Я. Берцелиуса, Э. Митчерлиха. Общепринятым было мнение Либиха о том, что брожение — это химическое явление, вызываемое в разнообразных телах разлагающимися белковыми веществами.

Формирование микробиологии как науки связано с работами знаменитого французского ученого Луи Пастера (1822—1895). В истории мировой науки трудно найти другого исследователя, чьи работы имели бы такое большое теоретическое значение и вместе с тем дали бы такой большой практический эффект. К. А. Тимирязев считал, что Пастер оказал такое влияние на практические стороны человеческой деятельности, какого не оказывал ни один человек за всю историю цивилизации. В цикле замечательных трудов Пастер неоспоримо доказал, что процессы брожения — не простые химические явления, а результат воздействия на субстраты определенных микроорганизмов. Это было показано им при исследовании молочнокислого, спиртового и маслянокислого брожений. Пастер первый установил также, что не все микроорганизмы нуждаются в молекулярном кислороде. Изучая маслянокислые бактерии, он показал, что воздух вреден для них. Так были открыты облигатные анаэробы. Эти результаты вызвали бурю протеста, так как было признано, что без молекулярного кислорода жизнь невозможна. Брожение, по утверждению Пастера, — это «жизнь без кислорода воздуха». На основе своих исследований Пастер разрабатывает теорию ведения процессов брожения в ряде производств, учит, как следует «разводить» полезные микроорганизмы и вести борьбу с вредными.

Исследования Пастера завершили многовековой спор о возможности самопроизвольного зарождения жизни. Изящными, легко воспроизводимыми опытами он доказал, что в питательных

средах, в которых убиты микроорганизмы, жизнь не зарождается даже при соприкосновении с воздухом, если в последнем они отсутствуют.

Велики заслуги Пастера и в познании причин болезней вин, инфекционных заболеваний шелковичных червей, домашних животных и человека, а также в разработке способов борьбы с ними.

Многие рекомендации Пастера, в частности прогрев до температур, уничтожающих вредных микроорганизмов, но не влияющих на качество продукта (впоследствии получивший название пастеризации), широко применяются и сейчас в винодельческой, молочной и других отраслях пищевой промышленности.

Гениальный ученый, самоотверженный труженик лабораторного стола, решивший огромное количество проблем, важных для человечества, Луи Пастер по праву считается основоположником современной микробиологии, в том числе промышленной.

Крупной вехой в развитии микробиологии и в разработке технологии микробиологических производств было получение чистых культур микроорганизмов. Значительный вклад в решение этой проблемы внес известный немецкий ученый Р. Кох (1843—1910).

Работа с чистыми культурами не могла быть осуществлена без аппаратуры для стерилизации посуды и сред, применяемых для культивирования микроорганизмов (автоклавы, сушильные шкафы и т. д.) и определения технологии этого процесса. В разработку таких методов большой вклад внесли Л. Пастер, Р. Кох, Д. Тиндаль, Ш. Шамберлен и другие ученые. Большая заслуга по внедрению чистых культур в промышленность принадлежит датскому ученому Э. Х. Гапсену. Разработка метода чистых культур позволила создать научно обоснованную технологию процессов, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов, и способствовала получению стабильных продуктов.

В познании химизма процессов брожения большое значение имело изучение ферментов, осуществляющих этот процесс.

В 1872 г. русский врач и биохимик М. М. Манассеин отметил, что спиртовое брожение может проходить в отсутствие живых клеток. Окончательно вопрос о возможности осуществления брожения без живых клеток микроорганизмов был решен в конце XIX в. Немецкие ученые — братья Г. и Э. Бухнеры в 1897 г. показали, что экстракт растертых дрожжей способен вызывать спиртовое брожение. Они предполагали, что этот процесс вызывается одним ферментом. Русский ученый А. Н. Лебедев усовершенствовал способ получения из дрожжей экстракта, содержащего ферменты, и показал, что процесс брожения осуществляется во много этапов рядом ферментов. Так было установлено, что причиной брожения могут быть как сами живые клетки, так и ферменты, образуемые клеткой. Работы по изучению ферментов, вызывающих брожение, послужили основой для становления

биохимии как науки. Они послужили также стимулом для изучения ферментов микроорганизмов.

В развитие отечественной и мировой микробиологии большой вклад внес С. Н. Виноградский (1856—1953). Наряду с фундаментальными работами по микробиологии почвы он совместно с В. Л. Фрибесом выделил и изучил анаэробную бактерию, разлагающую пектиновые вещества и вызывающую разрыхление льняных волокон при промышленном процессе — мочке лубяных культур. Эти работы имели не только теоретическое, но и большое практическое значение. Ученику Виноградского В. Л. Омелянскому (1867—1928) принадлежат классические исследования по анаэробному разложению целлюлозы и образованию микроорганизмами метана.

В начале XX в. в России, Англии, США, Германии начались исследования промежуточных этапов процесса спиртового брожения. В первые два десятилетия исследование спиртового брожения шло параллельно изучению гликолиза в мышцах (было установлено сходство этих процессов). Дальнейшие глубокие исследования путей превращения углеводов и других веществ микроорганизмами позволили влиять на ход вызываемых ими процессов, направляя его в сторону, нужную для получения желаемого продукта. Это создало научные предпосылки для значительного расширения микробиологических производств.

Во время первой мировой войны военные потребности оказали влияние на появление ряда новых производств. Так, Германия остро нуждалась для военных целей в глицерине (ранее его получали из естественных, в основном животных жиров). Изучение биохимических процессов, лежащих в основе синтеза глицерина, позволило наладить микробиологический способ его производства из сахара и мелассы. Недостаток жиров способствовал организации их производства с помощью гриба *Endomyces vernalis* по технологии, разработанной П. Линднером.

В эти годы возросла также потребность в ацетоне для производства взрывчатых веществ. Х. Вайсман организовал в Англии микробиологическое производство ацетона из кукурузной муки. В Америке также было налажено получение ацетона и бутилового спирта из сахара при помощи бактерий по способу Фернбаха — Вайсмана.

С конца XIX в. в ряде стран появились сообщения о возможности получения органических кислот с помощью микроорганизмов, делались попытки наладить их производство. В 1923 г. было организовано первое микробиологическое промышленное производство лимонной кислоты, затем были созданы возможности производства молочной, глюконовой и некоторых других органических кислот. На этом этапе они оказались более рентабельными и вытеснили другие химические процессы. Вплоть до 1940 г. производство ряда органических кислот, ацетона, бутанола, пропанола, этилового спирта, глицерина осуществлялось в основном микробиологическими способами. Впоследствии методы органиче-

ского синтеза и очистки настолько усовершенствовались, что некоторые из этих веществ начали производить химическим способом. Следует, однако, отметить, что в последнее время в связи с недостатком энергетических ресурсов вновь возрос интерес к микробиологическим методам получения ряда таких продуктов.

После революции перед пищевой промышленностью нашей страны стояла задача перехода от кустарных производств к крупным. Это требовало проведения процессов по заранее устанавливаемым технологическим схемам. На теоретическую разработку биохимических и микробиологических процессов, лежащих в основе технологии приготовления пищевых продуктов, были направлены усилия ряда ученых. В. Л. Омелянский, В. А. Николаев, Г. Л. Селибер и другие исследователи изучали микроорганизмы хлебопекарного производства и разрабатывали научные основы брожения теста. Работы С. А. Королева, А. Ф. Войткевича и других ученых по микробиологии молока и молочных продуктов способствовали развитию этой отрасли производства.

Для подъема сельского хозяйства проводили исследования по бактериальным удобрениям и силосованию кормов.

В стране развивались и новые микробиологические производства. На основе исследований В. Н. Шапошникова и его сотрудников в 20-х годах было разработано микробиологическое производство молочной и масляной кислот, а в 30-х годах — ацетона и бутилового спирта.

Исследования по химизму образования лимонной кислоты грибами, проведенные под руководством В. С. Буткевича и С. П. Костычева, позволили организовать в 1933 г. первое промышленное производство ее в СССР. Большое значение имели работы по использованию целлюлозного сырья для получения спирта, фурфурола, кормовых дрожжей и других продуктов. В 30-е годы в СССР было организовано производство микробиологическим способом технических препаратов некоторых ферментов и витаминов (эргостерин — провитамин D<sub>2</sub>).

Приоритетным достижением было открытие советскими учеными Г. А. Надсоном и Г. С. Филипповым (1925) мутагенного действия рентгеновского излучения на микроорганизмы. С начала 40-х годов в разных странах микроорганизмы стали объектом интенсивных генетических исследований.

Советский микробиолог В. О. Таусон изучил способность микроорганизмов потреблять парафины. Эти работы интенсифицировали исследования по микробиологии нефти, микробиологической очистке сточных вод от нефтепродуктов, по получению белка и других продуктов при выращивании микроорганизмов на углеводородах нефти.

Большое значение в развитии микробиологических производств имела разработка путей получения микробиологическим способом рибофлавина (1935). При этом впервые была использована способность некоторых микроорганизмов к сверхсинтезу продуктов метаболизма.

Однако до 40-х годов технология микробиологических процессов в разных странах была еще слабо разработана. Большинство процессов осуществлялось поверхностным способом, при котором микроорганизмы растут на поверхности среды. Глубинное их выращивание применяли в основном для анаэробных микроорганизмов. Лишь при производстве пекарских дрожжей, а впоследствии — органических кислот начали осуществлять аэробное глубинное культивирование микроорганизмов.

Новый этап в развитии микробиологической промышленности связан с началом производства антибиотиков. Открытие антибиотиков и организация их производства считаются одним из важнейших достижений биологии XX в. Применение антибиотиков имело огромное значение в лечении инфекционных болезней. Необходимость же разработки для организации таких производств аппаратуры привела к резкому повышению значения технических наук в микробиологической промышленности.

Опыт производства антибиотиков оказал также принципиальное влияние на развитие других отраслей микробиологической промышленности. Микроорганизмы начали использовать в качестве продуцентов ряда веществ, для получения которых ранее использовали растения и животных, а также некоторых принципиально новых продуктов. Ферменты микроорганизмов (бактерий и грибов) все более вытесняют ферменты растительного и животного происхождения. В 1948 г. было показано, что с помощью микроорганизмов можно получать витамин В<sub>12</sub>, который ни растения, ни животные не синтезируют. В СССР технология получения этого ценного витамина была разработана и внедрена В. Н. Букиным с сотрудниками.

Расширение сфер использования микроорганизмов в практических целях основывается на достижениях в изучении их физиологических и биохимических особенностей, а также познании механизмов регуляции процессов метаболизма.

До второй мировой войны в промышленности использовались сравнительно немногие микроорганизмы. Впоследствии в сферу исследований и практического использования начали вовлекаться многие группы этих организмов. Проводится усиленный поиск новых продуцентов в природе. Резко расширились исследования по селекции и генетике микроорганизмов. Использование физических и химических мутагенов позволяет значительно увеличить продуктивность исходных штаммов, а следовательно, и производительность предприятий.

Важным достижением промышленной микробиологии была разработка теории и широкое практическое внедрение непрерывного культивирования микроорганизмов. Эмпирически разработанные полуперерывные системы культивирования, при которых через определенные промежутки времени отбирается часть среды и добавляется эквивалентное количество свежей среды, применялись давно. Например, так получали уксус по методу, разработанному в 1823 г. немецким ученым Шюценбахом. Непрерыв-

ное спиртовое брожение в батарее аппаратов было разработано в начале века С. В. Лебедевым. Однако широкое внедрение в промышленность метода непрерывного культивирования началось лишь во второй половине XX в. после разработки математической основы теории этого процесса, изучения основ регуляции роста и развития микроорганизмов, способов воздействия на их обмен веществ и создания аппаратуры для строгого контроля параметров культивирования.

Большое значение имело обнаружение способности некоторых микроорганизмов к сверхсинтезу аминокислот (С. Киносита и др., 1955). В результате было налажено промышленное производство микробиологическим способом глутаминовой кислоты, а впоследствии лизина и ряда других аминокислот.

Неуклонно возрастает количество видов сырья, используемого для микробиологического синтеза. Наряду с традиционными источниками углеродного сырья — углеводами применяют жидкие и газообразные углеводороды (n-парафины, природный газ и т. д.) и их окисленные производные (метанол, этанол); ведутся работы по использованию молекулярного водорода. Большое внимание уделяется применению различных отходов промышленности, сельского и лесного хозяйства.

На основе углеводородного сырья в 70-х годах в СССР впервые было создано многотоннажное производство кормовых дрожжей. Построены заводы-гиганты производительностью 50—240 т в год. Научные основы производства белковых веществ из углеводородов нефти были заложены в Советском Союзе работами Н. Д. Иерусалимского, Г. К. Скрябина, Е. Н. Квасникова и ряда других исследователей.

В последнее время значительно расширились области применения продукции, полученной микробиологическим синтезом. Микробиология внедрилась в такие традиционно небиологические производства, как получение энергетического сырья (биогаз), добыча нефти, металлов. Микроорганизмы все шире используются для трансформации. Например, при трансформации стероидного сырья получают кортизон, гидрокортизон, преднизолон и другие фармацевтические препараты.

С возникновением геной инженерии появилась возможность направленно создавать для промышленности микроорганизмы с заданными свойствами. Это значительно расширяет области практического использования микроорганизмов.

В заключение необходимо подчеркнуть, что одной из характерных черт научно-технического прогресса нашей эпохи является интеграция наук, которые не так давно были дифференцированы. Это вызвано необходимостью быстрее решения как фундаментальных, так и народнохозяйственных проблем. Именно это обусловило расцвет промышленной микробиологии. Только обогатившись методами смежных наук — химии, физики, математики, биохимии, молекулярной биологии и генетики, промышленная микробиология могла поставить и решить ряд актуальных проб-

лем. В свою очередь достижения промышленной микробиологии оказывают глубокое влияние на развитие смежных наук.

Освоение «микробных богатств» природы только началось. Полагают, что мы знаем лишь около 10 % обитающих в ней мельчайших живых существ. Мир микроорганизмов дал человечеству уже очень много. Нет сомнения, что дальнейшие исследования позволят найти новые пути их широкого использования в народном хозяйстве, здравоохранении и для охраны окружающей среды.

## Глава 2 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмами принято называть мельчайшие живые существа, размеры которых меньше или немногим превышают разрешающую способность человеческого глаза (0,2 мм).

Помимо применения микроскопов, изучение микроорганизмов связано с использованием особых методов их выделения из природных субстратов в виде чистых культур и выращивания на стерильных средах того или иного состава.

Число известных микроорганизмов составляет много тысяч, причем открываются все новые виды. Большинство микроорганизмов в отличие от макроорганизмов одноклеточные, а имеющие многоклеточные формы сравнительно мало дифференцированы. Но в систематическом отношении микроорганизмы не представляют собой единой группы.

На основании особенностей организации клеток, прежде всего генетического аппарата, они подразделяются на эукариот и прокариот. К эукариотным микроорганизмам относятся многие водоросли, грибы и простейшие. По строению клеток они не отличаются принципиально от макроорганизмов, включая высшие растения и животных, которые также являются эукариотами.

Для всех эукариот характерно наличие в клетках ядра, окруженного мембраной и содержащего набор хромосом, в которых находится ДНК, несущая основную генетическую информацию; распределение ДНК по хромосомам связано с процессом митоза.

Кроме того, клетки эукариот имеют развитый эндоплазматический ретикулум, митохондрии (фотосинтезирующие формы и хлоропласты), а также другие органеллы общего характера. Рибосомы, находящиеся в цитоплазме, относятся к 80S-типу. У части эукариотных микроорганизмов наряду с вегетативным и бесполом размножением установлена способность к половому процессу.

Прокариоты, или бактерии (в последнее время эти термины обычно рассматриваются как равнозначные), объединяют только микроформы. Организация их клеток более простая, чем у эукариот. Ядро прокариот, называемое часто нуклеондом, не окру-

жено мембраной и представлено одной молекулой ДНК кольцевого характера. Эндоплазматический ретикулум, митохондрии и другие обособленные органеллы, свойственные эукариотам, у прокариот отсутствуют, а их функции выполняют клеточная мембрана и (или) внутриклеточные мембраны, которые обычно из нее образуются. Рибосомы относятся к 70S-типу. У эукариот такие рибосомы, а также ДНК, похожая на бактериальную, присутствуют лишь в митохондриях и хлоропластах. Это является важным аргументом в пользу филогенетического родства данных органелл с бактериями и эндосимбиотической гипотезы происхождения эукариот.

Большинство бактерий, так же как водоросли и грибы, имеют ригидную клеточную стенку. Но ее состав иной, чем у эукариот. Типичным компонентом клеточной стенки большинства прокариот, относящихся к эубактериям, является пептидгликан (муреин), состоящий из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. Ни у одного из эукариот такой полимер не обнаружен. Имеются различия в строении жгутиков, которые обуславливают подвижность ряда эукариот и прокариот, в составе липидов и некоторых других компонентов клеток.

Размножение бактерий чаще всего происходит путем бинарного деления, реже почкованием, образованием экзоспор или другими бесполовыми способами. У ряда бактерий установлена способность к конъюгации. Но в отличие от полового процесса у эукариот при этом происходит, как правило, лишь частичная передача ДНК из одной клетки в другую.

За последние годы установлено, что среди бактерий есть виды, существенно отличающиеся от других организмов по ряду признаков. Их предложено называть архебактериями, а остальных прокариот — эубактериями. К числу архебактерий относятся метанообразующие микроорганизмы, галобактерии, ряд экстремальных термоацидофилов и некоторые другие формы. Главная особенность архебактерий выражена в последовательности нуклеотидов в 16S рРНК, об этом свидетельствует анализ олигонуклеотидов, которые из них получают. В связи с консервативностью молекул рРНК этот признак считается весьма важным для определения филогенетических связей различных организмов и построения естественной системы их классификации.

Кроме того, архебактерии не содержат муреина в клеточных стенках, образуют особые липиды, в которых нет жирных кислот, а также характеризуются рядом других особенностей своего состава и метаболизма.

Некоторые исследователи считают, что архебактерии можно рассматривать как отдельное царство живых существ, возникшее в результате особой линии эволюции.

Иногда к микроорганизмам относят и вирусы. Но чаще их рассматривают как особую категорию биологических объектов, поскольку они не имеют клеточного строения, содержат в отличие от эукариот и прокариот лишь один тип нуклеиновых кислот



(ДНК или РНК) и размножаются только в клетках хозяина, каковыми могут быть разные организмы, в том числе бактерии.

Помимо вирусов, в клетках микроорганизмов могут находиться другие дополнительные элементы, несущие генетическую информацию. К числу таковых относятся плазмиды, распространенные у бактерий. Они представляют собой небольшие кольцевые молекулы ДНК, определяющие устойчивость содержащих их штаммов к лекарственным препаратам, способность воздействовать на определенные субстраты и некоторые другие признаки.

Микроорганизмам принадлежит важная роль в природных процессах, а также в практической деятельности человека. Объясняется это рядом причин.

Благодаря небольшим размерам микроорганизмы легко перемещаются с токами воздуха, по воде и другими способами. Поэтому они быстро распространяются и встречаются в самых разных местах, включая и те, где другие формы жизни иногда отсутствуют.

Важным свойством микроорганизмов является их способность к быстрому размножению. Известны бактерии, которые делятся каждые 30—60 мин и даже через 8—10 мин. В результате из одной клетки массой около  $2,5 \cdot 10^{-12}$  г за 2—4 сут в условиях, обеспечивающих активный рост, могла бы образоваться биомасса порядка  $10^{10}$  г и более. В действительности этого не происходит, так как действуют разные ограничивающие факторы. Но возможности микроорганизмов к быстрому размножению намного превосходят и растения и животных.

Третье, что характеризует микроорганизмы, — это разнообразие их физиологических и биохимических свойств. В результате некоторые из них могут расти в так называемых экстремальных условиях, которые для большинства других организмов неблагоприятны или вообще не поддерживают рост. Особенно разнообразны по свойствам бактерии.

Наряду с мезофилами, оптимальная температура для роста которых составляет 25—35 °С, среди микроорганизмов есть так называемые психрофилы, некоторые из которых при температуре выше 20 °С не растут, но могут довольно быстро развиваться при температуре, близкой к нулю. Такие микроорганизмы распространены в морях и океанах, в пещерах, но обнаруживаются и в других местах, в том числе в холодильных установках. Значительное число микроорганизмов остаются живыми при температуре — 196 °С (t жидкого азота) и даже ниже. Этим часто пользуются для их длительного хранения.

С другой стороны, такие покоящиеся формы, как эндоспоры, образуемые рядом бактерий, у некоторых видов сохраняют способность к прорастанию после кипячения в течение 1—2 ч. У отдельных видов бактерий (например, *Clostridium botulinum*) споры не погибают при кратковременном повышении температуры до 160—180 °С. Известны также термофильные микроорганизмы, рост которых наблюдается при 60—80 °С и даже выше (90—

110 °С). Некоторые из них при температуре ниже 60—80 °С не растут. Такие экстремальные термофилы обнаружены, например, среди бактерий, встречающихся в геотермальных источниках.

Довольно много микроорганизмов проявляют значительную устойчивость к высокому гидростатическому давлению, а некоторые из них даже лучше растут при давлении  $(1,0—3,5) \cdot 10^7$  Па. Имеются и облигатно барофильные формы. В природных условиях высокое давление бывает в глубинах морей и океанов, в придонных слоях отдельных озер (например, Байкала), а также в глубинных месторождениях нефти, где встречаются микроорганизмы.

В то же время многие микроорганизмы сохраняют жизнеспособность в условиях глубокого вакуума, особенно, если произвести высушивание клеток после предварительного их замораживания. На этом основан такой широко известный способ хранения микроорганизмов, как лиофилизация (см. гл. 8).

Некоторые микроорганизмы выдерживают высокие дозы ультрафиолетовой и (или) ионизирующей радиации. К таковым относится *Micrococcus radiodurans*, обнаруженный впервые в консервированном мясе, подвергнутом воздействию  $\gamma$ -излучения. Констатировано также наличие радиорезистентных микроорганизмов в атомных реакторах.

Рост микроорганизмов зависит от активной кислотности (рН) среды. Для большинства видов оптимальное значение рН близко к 7,0, т. е. благоприятна нейтральная среда. Однако известны и ацидофильные формы, которые не растут при рН выше 5,0—5,5. Некоторые из них являются к тому же термофилами. К числу типичных ацидофильных микроорганизмов относится *Thiobacillus ferrooxidans*, встречающийся в кислых серных источниках и распространенный в шахтных водах месторождений разных сульфидных минералов, где в значительном количестве присутствует серная кислота и рН иногда меньше единицы. С другой стороны, есть алкалофильные микроорганизмы, оптимальное значение рН среды для роста которых 10,0—11,0. Примером могут служить некоторые бактерии рода *Bacillus*, разлагающие мочевины с образованием аммиака.

Одним из факторов, ограничивающих рост многих микроорганизмов, является высокое осмотическое давление среды. Это важно учитывать при выборе условий их культивирования. Однако есть осмоотолерантные и даже осмофильные виды. К ним принадлежат некоторые представители дрожжей и мицелиальных грибов (например, *Xeromyces bisporus*), рост которых наблюдается на средах, содержащих 20 % сахара и более. Такие микроорганизмы нередко обнаруживаются в сладких сиропах и варенье.

Известны также бактерии, называемые экстремальными галофилами, оптимальная концентрация хлористого натрия для которых 20—25%, а рост их возможен и при более высоком содержании NaCl (30—32%), т. е. практически в насыщенном его растворе. Если же концентрация хлористого натрия ниже

8—12 %, то рост большинства таких бактерий, относящихся в основном к семейству Halobacteriaceae, не происходит, а у некоторых видов клетки лизируются.

Значительные различия обнаруживаются в действии на разные микроорганизмы меди, мышьяка, сурьмы, ртути и других тяжелых металлов. Некоторые виды и штаммы проявляют к ним большую чувствительность, другие способны расти при сравнительно высоком содержании соединений этих элементов.

В зависимости от отношения микроорганизмов к молекулярному кислороду их принято делить на облигатные аэробы, факультативные анаэробы, азотолерантные анаэробы и облигатные анаэробы. Большинство микроорганизмов, как и макроорганизмы, являются облигатными аэробами (для роста им необходим молекулярный кислород). Отдельные виды могут расти даже в атмосфере чистого кислорода. Наряду с этим есть микроорганизмы, которые хотя и нуждаются в наличии  $O_2$ , но могут расти или лучше растут только при низком его содержании (2—10 %). Такие микроорганизмы называют микроаэрофилами, а условия, в которых они растут, микроаэробными.

Факультативные анаэробы растут как в присутствии, так и в отсутствие  $O_2$ . Но в зависимости от условий роста происходят изменения в их метаболизме, прежде всего в энергетических процессах. Как правило, при наличии молекулярного кислорода такие микроорганизмы переключаются на окисление субстрата с участием  $O_2$ , т. е. на аэробное дыхание, поскольку оно более выгодно, чем получение энергии в результате анаэробных процессов. Наглядным примером могут служить некоторые дрожжи, способные осуществлять в анаэробных условиях спиртовое брожение, а в аэробных полностью окисляющие в процессе дыхания сахар с образованием углекислоты и воды. Довольно много факультативных анаэробов и среди бактерий. Это *Escherichia*, некоторые представители рода *Bacillus*, *Paracoccus denitrificans* и ряд других.

К азотолерантным анаэробам принадлежат многие молочнокислые бактерии, способные расти в присутствии молекулярного кислорода, но при этом их метаболизм остается таким же, как и в анаэробных условиях. И в том и в другом случае они осуществляют брожение.

Облигатные анаэробы не только не нуждаются для роста в наличии молекулярного кислорода, но для многих видов он токсичен даже в ничтожно малой концентрации. Поэтому выделение и культивирование таких микроорганизмов часто сложно. К числу строгих анаэробов относятся метанообразующие, сульфатредуцирующие бактерии и ряд других прокариот. Среди эукариотных микроорганизмов облигатными анаэробами являются некоторые простейшие, в частности отдельные представители трихомонад. Обнаружены такие формы и среди грибов, но, видимо, это свойство имеет у эукариот вторичное происхождение — возникло в результате утраты способности использовать моле-

**Т а б л и ц а 2.1. Возможные типы питания микроорганизмов**

Источник энергии	Доноры электронов	Источник углерода	
		органические вещества	углекислота
Свет	Органические вещества	Фотоорганогетеротрофия	Фотоорганавтотрофия
	Неорганические вещества	Фотолитогетеротрофия	Фотолитоавтотрофия
Органические вещества	Органические вещества	Хемоорганогетеротрофия	Хемоорганавтотрофия
Неорганические вещества	Неорганические вещества	Хемолитогетеротрофия	Хемолитоавтотрофия

Примечание. Гетеротрофные организмы помимо органических веществ часто используют и углекислоту, но лишь как дополнительный источник углерода.

кулярный кислород в своем метаболизме. Напротив, облигатные анаэробы из числа бактерий рассматриваются как наиболее древние формы жизни.

Разнообразны возможные типы питания микроорганизмов (табл. 2.1). Часть из них, называемые фототрофами, как и зеленые растения, способны использовать для роста энергию света (пурпурные и зеленые бактерии, цианобактерии, прохлорофиты, некоторые галобактерии и водоросли). Остальные микроорганизмы, носящие название хемотрофов, так же как животные и человек, получают энергию в результате окисления различных химических веществ. Среди фото- и хемотрофов известны виды, способные все соединения клеток синтезировать из углекислоты. Их называют автотрофами. Особенно много автотрофов среди организмов, использующих в качестве источника энергии свет (возможность фотосинтеза).

Многим микроорганизмам, как и животным, необходимы для роста органические соединения, которые используются ими в биосинтетических целях. Они носят название гетеротрофов.

В случае хемотрофов окисляемый субстрат, иначе называемый донором электронов, обеспечивает получение организмом энергии и биосинтетические реакции восстановительного характера. У фототрофов донор электронов выполняет обычно только вторую функцию, поскольку источником энергии служит свет.

Таким образом, с учетом источника энергии, донора электронов и характера веществ, используемых в биосинтетических процессах, возможных типов питания восемь; каждый из них реализуется большим или меньшим числом микроорганизмов, относящихся к прокариотам. В отличие от этого эукариотные микроорганизмы, как и макроорганизмы, проявляют способность

либо к фотолитоавтотрофии, либо к хемоорганогетеротрофии. Первый тип питания присущ водорослям и высшим растениям, второй — грибам, животным, включая простейшие, и человеку. Другие типы питания, очевидно, оказались менее удачными и не явились основой для двух основных направлений эволюции, приведших к возникновению высокоорганизованных форм эукариот.

В то же время сохранение у бактерий разных типов питания, видимо, имеет существенное значение для их выживания при наличии более совершенных форм и позволяет нередко расти в весьма специфических условиях.

Кроме того, микроорганизмы в целом характеризуются способностью использовать гораздо больше химических веществ, чем макроорганизмы. Это касается прежде всего соединений углерода.

Некоторые микроорганизмы растут на очень сложных органических средах, содержащих те или иные факторы роста, т. е. вещества, которые необходимы им в готовом виде, поскольку синтезировать их они сами не могут. Чаще всего факторами роста являются витамины, но могут быть аминокислоты, пурины, пиримидины и другие органические соединения. Даже отдельные виды и штаммы микроорганизмов, которых относят к автотрофам, обнаруживают такую потребность.

Организмы, нуждающиеся в факторах роста, называют *ауксотрофами* с указанием на то, в каком или в каких конкретно готовых соединениях они нуждаются. Соответственно виды и штаммы, не обнаруживающие эту потребность, носят название *прототрофов*. К числу микроорганизмов, проявляющих высокую требовательность к составу среды и нуждающихся в ряде факторов роста, относятся многие молочнокислые бактерии, а также представители простейших. Ауксотрофные штаммы микроорганизмов легко образуются в результате мутаций.

Известны также микроорганизмы (называемые *парапротрофами*), которые являются облигатными внутриклеточными паразитами. К числу таковых относятся риккетсии.

Из-за высокой требовательности в отношении питания подбор сред для выращивания некоторых микроорганизмов является сложной проблемой, а часть видов на искусственных средах культивировать вообще пока не удастся. Но многие микроорганизмы, даже из числа гетеротрофов, хорошо растут на синтетических средах, содержащих всего одно органическое соединение углерода, которое используется как источник энергии и в биосинтетических целях.

Значительное число микроорганизмов способно использовать белки, нуклеиновые кислоты, парафины, разные углеводы, включая целлюлозу и другие высокомолекулярные вещества.

С другой стороны, есть микроорганизмы, рост которых обеспечивают такие простые органические вещества, как этанол, ацетат, гликолат и многие другие. Широко распространены

так называемые метилотрофы, использующие в качестве источника энергии и углерода метан, метанол, метилированные амины и монооксид углерода, которые рост макроорганизмов не поддерживают, а многие даже токсичны.

Наряду с использованием различных природных соединений углерода некоторые микроорганизмы могут воздействовать и на синтетические вещества, включая пластмассы и пестициды.

Характерная особенность ряда бактерий — способность расти, получая энергию в результате окисления молекулярного водорода, сероводорода, аммония, нитритов, солей двухвалентного железа и некоторых других неорганических соединений. При этом многие из них растут в автотрофных условиях. Соответственно окисляемым субстратам выделяют такие группы хемолитоавтотрофов, как водородные, нитрифицирующие, серные бактерии, железобактерии. К числу хемолитоавтотрофных микроорганизмов, окисляющих  $H_2$ , относятся также многие метанобразующие бактерии, отдельные представители ацетатобразующих, сульфат- и серувосстанавливающих бактерий.

Различные возможности проявляют микроорганизмы в отношении источников азота. Некоторые виды хорошо растут на средах с пептоном и другими органическими азотсодержащими соединениями, в том числе мочевиной. Значительное число микроорганизмов могут ассимилировать нитраты и еще больше аммоний.

Интересной и важной особенностью ряда прокариотных микроорганизмов является их способность фиксировать молекулярный азот. Долгое время считалось, что это свойство проявляется лишь у немногих видов, как-то у азотобактеров, отдельных представителей клостридий и фототрофных бактерий, а также у клубеньковых бактерий. Однако в последние годы показано, что способность к ассимиляции молекулярного азота распространена более широко.

Многие микроорганизмы, как и растения, могут использовать для синтеза серусодержащих соединений клеток сульфаты. Но некоторые виды способностью к ассимиляционной сульфат-редукции не обладают и поэтому нуждаются для роста в наличии восстановленных соединений серы.

Помимо потребности в так называемых макроэлементах, или основных биоэлементах, к которым относят углерод, азот, кислород, водород, фосфор, серу, магний, железо, калий и кальций, микроорганизмы нуждаются для роста в ряде других элементов, но обычно в гораздо меньшем количестве. Поэтому их называют микроэлементами или минорными биоэлементами. В основном это различные металлы (цинк, медь, кобальт, никель, молибден, медь и ряд других), входящие в состав отдельных ферментов. Однако следует отметить, что потребность отдельных микроорганизмов в некоторых элементах может существенно различаться и зависит иногда от условий их роста.

Например, потребность бактерий в молибдене существенно

возрастает при использовании ими в качестве источника азота нитратов или молекулярного азота, поскольку этот элемент входит в состав нитратредуктазы и нитрогеназы, т. е. ферментов, участвующих в ассимиляции клетками соответственно  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{N}_2$ . Для роста бактерий, получающих энергию в результате окисления  $\text{Fe}^{2+}$  до  $\text{Fe}^{3+}$ , железо необходимо в значительно большем количестве, чем требуется другим организмам.

Для многих известных микроорганизмов характерен лабильный метаболизм. Такая способность выражается не только в их способности использовать большое число разных соединений углерода, азота и других элементов, но нередко проявляется в переключении с одного типа питания на другой. Например, значительное число фототрофных микроорганизмов могут расти в темноте в гетеротрофных, а некоторые и в автотрофных условиях. Ряд бактерий проявляет способность и к хемолитоавтотрофии, и к хемоорганогетеротрофии. Такие организмы принято называть факультативными автотрофами.

Некоторые микроорганизмы обнаруживают способность к так называемой миксотрофии, или смешанному типу питания. Например, одновременное использование в процессах биосинтеза органических веществ и ассимиляции углекислоты по тому же типу, как в автотрофных условиях. Известны также случаи, когда микроорганизмы одновременно окисляют и органические и неорганические субстраты. Особенно четко способность к миксотрофии проявляется при их культивировании в проточных условиях с лимитированием по разным субстратам.

Однако ряд микроорганизмов характеризуется постоянством своих потребностей в питании и, соответственно, процессах метаболизма. Среди них есть облигатные фототрофы и облигатные хемотрофы. Известны облигатные автотрофы, которые используют органические вещества, в очень ограниченной степени и во всех условиях основным источником углерода для них служит углекислота. Примером могут служить многие цианобактерии и нитрифицирующие бактерии. Напротив, некоторым гетеротрофам всегда необходимы определенные органические соединения. Часть из них, как уже отмечалось, удается культивировать только на сложных средах, содержащих ряд факторов роста. К числу таковых относятся, например, ряд молочнокислых бактерий. Но есть микроорганизмы, рост которых возможен на средах, содержащих очень простые органические вещества, например метан или метанол. Однако другие соединения углерода их заменить не могут.

Изучение различных микроорганизмов значительно расширило представление о том, в каких условиях возможно существование жизни. В результате проведенных исследований установлен также ряд важнейших биохимических закономерностей. Оказалось, что многие реакции, которые имеют место у микроорганизмов, аналогичны таковым у растений и животных. Это подтверждает биохимическое единство всех организмов,

обитающих на Земле. Вместе с тем установлено, что некоторые микроорганизмы имеют особенности не только в составе своих клеток, но и в тех процессах, которые могут осуществлять.

Выше уже отмечалось, что только некоторые бактерии способны ассимилировать молекулярный азот с образованием из него аммиака, который используется для синтеза аминокислот и других азотсодержащих веществ клеток. Лишь некоторые микроорганизмы могут расти, используя углеводороды, лигнин и ряд других соединений углерода, а также получая энергию в результате окисления ряда неорганических веществ. Это определяется наличием у них особых ферментов, катализирующих реакции, к которым микроорганизмы не способны. Только среди микроорганизмов есть виды, способные расти в отсутствие молекулярного кислорода в результате таких энергетических процессов, как различные брожения и анаэробное дыхание.

До недавнего времени считали, что фотосинтез облигатно связан с наличием у организмов, которые его осуществляют, того или иного хлорофилла, представляющего собой магнийсодержащие тетрапиррольные пигменты. Однако недавно установлено, что у галобактерий, способных к фотосинтезу, данный процесс происходит при участии пигментбелкового комплекса бактериородопсина, в который входит  $C_{20}$ -каротиноид ретиналь. Этот комплекс очень похож на ретиналь, являющийся зрительным пигментом животных.

Большинство автотрофов, включая растения и микроорганизмы, ассимилируют углекислоту в результате действия рибулезобисфосфатного цикла, называемого также циклом Кальвина. Однако у фототрофных зеленых серобактерий, а также у некоторых хемотрофных бактерий (*Hydrogenobacter* и *Sulfolobus*), как недавно установлено, функционирует совершенно иная система автотрофной ассимиляции углекислоты, получившая название восстановительного цикла трикарбоновых кислот.

Похожим путем ассимилируют углекислоту метанобразующие бактерии, но процесс не имеет циклического характера. Аналогичным образом, видимо, происходит усвоение углекислоты анаэробными бактериями, образующими ацетат, а также некоторыми другими анаэробами из числа прокариот.

Важным результатом изучения метаболизма микроорганизмов, способных расти за счет использования метана, метанола и других  $C_1$ -соединений, более восстановленных, чем  $CO_2$ , является открытие у них трех принципиально различных путей ассимиляции формальдегида: серинового, рибулезомонофосфатного и ксилулезофосфатного циклов. Таких примеров, свидетельствующих о разнообразии путей ассимиляции и диссимиляции микроорганизмов различных соединений, можно привести очень много.

Огромное значение имело и продолжает иметь изучение микроорганизмов для развития молекулярной биологии и генетики. Достаточно напомнить, что первые данные относительно роли дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) как носителя



генетической информации были получены в опытах на бактериях. Достижения в области молекулярной биологии и генетики микроорганизмов явились основой развития генетической инженерии. Изучение микроорганизмов вносит также много нового в понимание биологической эволюции и представляет большой интерес в связи с вопросом о существовании жизни на других планетах.

Трудно переоценить значение микроорганизмов в круговороте веществ, который осуществляется в природе. В результате способности воздействовать на разнообразные субстраты, нередко накапливая при этом в среде те или иные продукты метаболизма, и быстро расти в разных условиях микроорганизмы вызывают существенные изменения в окружающей среде. Они играют важнейшую роль в превращении многих веществ в почве и водоемах, участвуют в формировании и разрушении месторождений ряда полезных ископаемых, а также других природных процессах.

Без многих процессов, которые осуществляют микроорганизмы в природе, жизнь на Земле давно бы прекратилась или приняла другие формы. Наглядным примером значения микроорганизмов в природе является их активное участие в разложении азотсодержащих органических веществ в почве, ведущем к образованию аммония и нитратов, а также фиксация молекулярного азота, от чего зависит рост растений.

Не меньшее значение имеет разложение микроорганизмами и безазотистых полимерных соединений, прежде всего целлюлозы, которая в огромных количествах образуется ежегодно растениями. В результате деятельности микроорганизмов происходит также освобождение окружающей среды от ряда загрязняющих и ядовитых веществ, в частности пестицидов.

Однако не все микроорганизмы и не всегда полезны. Некоторые из них, как известно, являются возбудителями разных заболеваний человека, животных и растений. Не все микробиологические процессы, происходящие в почвах, повышают их плодородие, некоторые из них имеют обратное действие. При массовом развитии водорослей и ряда других микроорганизмов в водоемах могут происходить нежелательные изменения их режимов, а также накопление веществ, токсичных для человека и животных.

В результате роста микроорганизмов нередко происходит порча сельскохозяйственной продукции, промышленных изделий и сооружений, в частности подземных трубопроводов и металлического оборудования в шахтах. Поэтому необходима работа по предупреждению таких явлений, наносящих существенный ущерб народному хозяйству.

С другой стороны, микроорганизмы давно используются человеком для получения некоторых продуктов питания и для других целей. Особенно интенсивно микробиологическая промышленность развивается в последние годы. Основой для этого служит изучение свойств разных микроорганизмов, прежде всего их физиологии, биохимии и генетики. В результате этого уста-

новлено, что с помощью микроорганизмов можно получать самые разные вещества, в том числе те, которые химическим путем синтезировать еще не удастся или такой путь более сложный и дорогой.

Из разных микроорганизмов наиболее широкое применение имеют дрожжи, относящиеся к одноклеточным грибам. Отдельные производства основаны на использовании мицелиальных грибов. Ряд промышленных процессов связан с применением бактерий, принадлежащих к разным систематическим группам. Среди них есть и анаэробы и аэробы, в меньшей степени используются пока водоросли и еще реже простейшие. Можно полагать, что в ближайшее время будут найдены новые микроорганизмы, представляющие практический интерес. Примером могут служить недавно обнаруженные термофильные анаэробы, образующие в значительном количестве уксусную кислоту и другие продукты, имеющие практическое значение. Использование их в производстве дает ряд преимуществ по сравнению с теми видами, которые нашли применение раньше.

Важное значение для микробиологической промышленности имеет получение мутантов, способных к образованию требуемых продуктов в большем количестве, чем исходные штаммы. Некоторые из таких мутантов, например, синтезирующих пенициллин, с успехом используют в заводских условиях.

В последнее время для получения штаммов микроорганизмов с полезными свойствами начали применять генную инженерию. Таким путем удалось, например, перенести гены, обуславливающие способность к азотфиксации, в бактерии, которые таким свойством не обладали. В результате введения в клетки *Methylophilus methylotrophus* гена, ответственного за синтез глутаматдегидрогеназы, повышена скорость роста этой бактерии, используемой в крупнотоннажном производстве белка на основе переработки метанола.

Большим успехом является клонирование в клетках микроорганизмов генов, определяющих способность к синтезу проинсулина, интерферона и гормона роста человека. В результате появилась возможность с помощью соответствующих штаммов микроорганизмов получать эти ценные для медицины соединения.

Очень важным для использования микроорганизмов в промышленности является подбор сред и условий культивирования на основе глубокого знания процессов метаболизма, что позволяет регулировать их биохимическую активность.

Многие микробиологические производства основаны на использовании растущих культур соответствующих видов. Из разных способов выращивания микроорганизмов наибольшие возможности дает непрерывно-проточное культивирование, применение которого в производственных условиях все расширяется.

Для получения некоторых продуктов используют суспензии клеток, а также клетки микроорганизмов в иммобилизованном состоянии, связанные с тем или иным носителем. В таком виде

они могут длительное время сохранять свою ферментативную активность и многократно применяться для синтеза ряда веществ, в частности некоторых аминокислот.

Продолжаются также работы по совершенствованию приборов и аппаратов, используемых в микробиологических производствах. Таким образом, в настоящее время промышленная микробиология представляет собой важную область биотехнологии, базирующуюся на достижениях микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, генетики, математики и техники.

### Глава 3    **ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА И СКОРОСТИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ**

#### **3.1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ**

В широком смысле под регуляцией метаболизма следует понимать управление *скоростью* биохимических процессов путем обратимого изменения *количества* белковых посредников, участвующих в этих процессах, или их *активности*.

В большинстве биохимических процессов белковые посредники представляют собой катализаторы химических реакций — *ферменты*. Однако некоторые процессы, например транспорт многих субстратов через биологические мембраны, осуществляются белками, которые не катализируют каких-либо химических превращений, а обуславливают «узнавание» и транслокацию субстратов.

В соответствии с указанным определением целесообразно рассматривать два основных уровня регуляции: уровень регуляции биосинтеза белковых посредников и уровень регуляции их *активности* в процессе функционирования.

В свою очередь уровень регуляции биосинтеза белковых посредников складывается из ряда этапов: подготовительные стадии включают *репликацию* генома и его *транскрипцию*, т. е. *биосинтез* информационных РНК (мРНК); завершающая стадия — *трансляция* — приводит к сборке молекул белковых посредников, конечных акцепторов генетической информации клетки.

При дальнейшем рассмотрении механизмов регуляции метаболизма основное внимание будет уделено описанию недавно изученных механизмов, а также взаимодействию регуляторных процессов в развивающейся клетке. Подробности, касающиеся классических механизмов регуляции, можно найти в литературе, приведенной в конце книги.

## 3.2. РЕГУЛЯЦИЯ НА УРОВНЕ БИОСИНТЕЗА БЕЛКОВ

### 3.2.1. Регуляция репликации ДНК

Процесс репликации, как и процессы транскрипции и трансляции, складываются из трех этапов: инициации, элонгации и терминации.

Основными особенностями процесса репликации ДНК являются его полуконсервативный механизм, прерывистость синтеза (с промежуточным образованием так называемых «фрагментов Оказаки»), протекающего всегда в направлении  $5' \longrightarrow 3'$ , а также наличие РНК-затравки (оРНК, или «праймера») в каждом фрагменте. На конечных этапах репликации цепочки оРНК выщепляются, а фрагменты объединяются с помощью ДНК-лигазы. Возможно, что та из цепей ДНК, которая синтезируется сразу в направлении от  $5'$  к  $3'$  («лидирующая» цепь), растет непрерывно без формирования фрагментов.

Специфика системы репликации определяется ее ярко выраженным мультимерным характером. В этом процессе принимают участие две ДНК-полимеразы (I и III) и ДНК-лигаза. Кроме того, для дестабилизации двойной спирали ДНК и «раскручивания» ее цепей необходимы специальные релаксирующие белки: хеликазы и топоизомеразы I ( $\omega$ -белок). Восстановление суперспирализации молекулы ДНК осуществляется АТФ-зависимой топоизомеразой II (ДНК-гиразой).

Расшифровка роли всех необходимых для репликации компонентов усложняется тем, что в клетке могут одновременно протекать репликации нескольких типов: кроме редупликации генома имеет место репарационный и рекомбинационный синтез ДНК, а также репликация внехромосомных генетических детерминант — плазмид.

Всего к настоящему времени идентифицировано около 15 генетических локусов (dna), повреждение которых вызывает нарушение репликации ДНК. Каждый из них, по-видимому, кодирует один из полипептидов, необходимых для процесса репликации.

Роль отдельных продуктов в значительной степени расшифрована. Так, продукт локуса dnaA необходим для синтеза оРНК и играет роль положительного регулятора в этом процессе. В свою очередь, его образование подвержено авторегуляции. Некоторые белки оказались полифункциональными. Например, продукт локуса dnaC необходим для включения оРНК в цепь ДНК, после чего этот белок становится компонентом репликационного комплекса и участвует в процессе элонгации.

Наиболее жесткая регуляция, несомненно, осуществляется на стадии инициации репликации. Помимо перечисленных продуктов цистронов dnaA и dnaC, в инициации принимают также участие продукты ряда других цистронов: dnaB, dnaI и dnaP.

Есть данные, что репликация ДНК находится как под *положительным*, так и под *отрицательным* контролем белков-регуля-

торов. В общем виде положительный контроль предполагает, что накопление активатора до порогового уровня, достаточного для инициации нового цикла репликации, должно быть координировано с удвоением массы клетки. Напротив, при отрицательном контроле ингибитор должен синтезироваться лишь в ограниченном количестве вскоре после начала предыдущего цикла репликации (такой ингибитор может быть продуктом гена, локализованного вблизи от начала репликации, транскрипция которого осуществляется только в период репликации этого участка ДНК). В процессе клеточного роста ингибитор разбавляется, а в момент удвоения массы клетки уровень его должен падать ниже критического.

Однако раскрытие механизмов регуляции репликации затрудняется сложным, многоступенчатым характером этого процесса и его легкой повреждаемостью, препятствующей воспроизведению *in vitro* в полностью реконструированной системе. До сих пор большая часть работ по изучению репликации ДНК осуществляется в модельных фаговых системах (фаги G4, M13, ФХ174 Т-фаги и др.). Значительные успехи достигнуты также при использовании термочувствительных мутантов бактерий, у которых процесс репликации повреждается при температурах выше оптимальной (*ts*-мутанты).

В разделе, посвященном регуляции клеточного деления, мы несколько подробнее остановимся на взаимосвязи регуляции процессов репликации, роста и деления клеток.

### 3.2.2. Регуляция процесса транскрипции

#### 3.2.2.1. Индукция и репрессия

Ферменты и другие белковые посредники биохимических процессов можно подразделить на два основных класса в зависимости от влияния субстратов и продуктов на синтез этих белков.

Синтез одних белков не зависит (или мало зависит) от наличия в клетке или среде соответствующих субстратов или продуктов. Такие белки называют *конститутивными*. Синтез других белков резко ускоряется в присутствии их субстратов. Подобное явление было названо *индукцией*, а сами белки получили название *индуцибельных*.

В дальнейшем было обнаружено, что уровень некоторых белков в клетке может сильно снижаться при избытке конечного продукта данного метаболического пути. Это явление получило название *репрессии*.

В 60-е годы было установлено, что в явлениях индукции и репрессии принимают участие белковые репрессоры, продукты специальных генетических элементов — генов-регуляторов (*i*-генов), способные в определенных условиях тормозить процесс транскрипции — образование информационных РНК (мРНК). Поэтому два упомянутых типа регуляции относят к негативным,

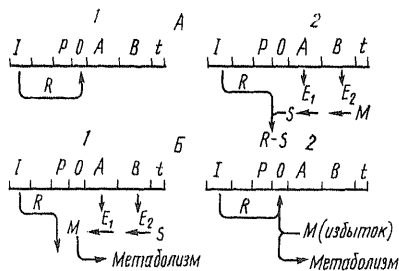


Рис. 3.1. Принципы оперонного управления транскрипцией (по Ратнеру, 1983, с изменениями). А — индуцируемый оперон (I — в отсутствие субстрата транскрипция блокирована; 2 — в присутствии субстрата репрессор инактивируется); Б — репрессируемый оперон (I — в отсутствие избытка продукта репрессор неактивен; 2 — избыток продукта активирует репрессор, транскрипция блокирована):

I — ген-регулятор, P — промотор, O — оператор, A, B — структурные гены, t — терминатор, R — репрессор, S — субстрат, M — конечный продукт метаболического пути, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> — ферменты

или отрицательным, механизмам регуляции метаболизма.

Для реализации этих механизмов необходима высокая степень организации генетического аппарата клетки и существование в геноме специальных кластеров, формируемых генами, расположенными в определенной последовательности в виде так называемых *оперонов* или, в более общем виде, *регулонов*, если контроль транскрипции осуществляется общим геном-регулятором (рис. 3.1).

Как правило, по типу индукции регулируется синтез белков, принимающих участие в процессах катаболизма, а по типу репрессии — белков, участвующих в процессах анаболизма.

Различия в этих механизмах сводятся к тому, что в случае индуцибельных белков репрессор, кодируемый геном-регулятором, блокирует транскрипцию структурных генов, взаимодействуя с операторным участком ДНК в отсутствие *индуктора* (обычно являющегося субстратом), а соединяясь с индуктором, репрессор инактивируется.

Напротив, в случае репрессибельных белков кодируемый геном-регулятором репрессор не активен и не препятствует транскрипции, а взаимодействуя с конечным продуктом метаболического пути (*корепрессором*), претерпевает аллостерическое конформационное изменение, приобретая способность присоединяться к оператору и блокировать транскрипцию структурных генов.

### 3.2.2.2. Катаболитная репрессия

Оказалось, что для функционирования даже такого относительно просто устроенного регулона, как лактозный оперон, наряду с lac-репрессором, выполняющим роль отрицательного регулятора, необходим белковый элемент, служащий положительным регулятором. Сам по себе такой регулятор не активен, однако, присоединяя циклический АМФ (цАМФ), он приобретает способность взаимодействовать со специальным сайтом на промоторном участке оперона, создавая условия для «запуска» транскрипции (рис. 3.2).

Белок, активирующий транскрипцию лактозного оперона, получил название белка CAP (Catabolite gene activating protein)

или CRP (catabolic repression protein). Соответствующие русские аббревиатуры — БАК или БКР.

Полагают, что присоединение к ДНК продукта взаимодействия цАМФ и САР облегчает образование «свободного» комплекса РНК-полимеразы (РНКП) с промоторным участком ДНК, ослабляя спаривание оснований GC и способствуя частичному разделению цепей ДНК.

Уровень цАМФ в клетке обратно пропорционален уровню АТФ, поэтому в присутствии эффективно катаболизируемого субстрата (например, глюкозы) цАМФ не хватает для активирования САР-белка, и транскрипция *lac*-оперона, а также ряда других регулонов с аналогично устроенными промоторами подавляется. Это явление получило название *катаболитной репрессии*. Ранее это явление было известно как «глюкозный эффект», выражающийся в феномене «диауксического роста» (наблюдается при одновременном присутствии в среде глюкозы и субстрата-индуктора).

Катаболитная репрессия представляет собой способ регуляции активности ряда «слабых» оперонов, транскрипция которых нуждается в наличии активатора — комплекса специального белка с цАМФ. Чаще всего в качестве катаболита-регулятора выступает глюкоза, контролирующая регулоны, ответственные за катаболизм других сахаров. Однако в случае некоторых микроорганизмов, относящихся к родам *Pseudomonas* и *Arthrobacter*, катаболитной репрессии подвергается регулон, ответственный за катаболизм глюкозы, а регуляторами служат, например, органические кислоты.

### 3.2.2.3. Примеры регуляции активности других регулонов

Отрицательная регуляция по типу индукции характерна для регулонов, ответственных за катаболизм многих сахаров и сахароспиртов. Как правило, отрицательная регуляция в этих случаях дополняется зависимостью транскрипции от положительного регулятора. Классическим примером является арабинозный оперон *Escherichia coli*, в котором индуктор (арабиноза) не просто инактивирует репрессор, но и превращает его в положительный регулятор. Положительная регуляция транскрипции отмечена также для оперонов, ответственных за катаболизм галактозы и рамнозы.

Следует отметить, что индуктором биосинтеза ферментов данного метаболического пути не всегда служит их субстрат. Так,

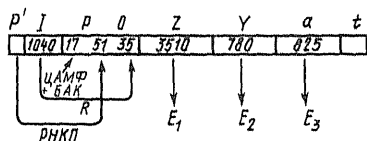


Рис. 3.2. Структура *lac*-оперона и участие цАМФ в транскрипции (по Ратнеру, 1983, с изменениями):

P — промотор, O — оператор, I — ген-регулятор, Z, Y, a — структурные гены, t — терминатор, R — репрессор, E<sub>1</sub> — β-галактозидаза, E<sub>2</sub> — галактозидпермеаза, E<sub>3</sub> — трансацетилаза.

Цифрами указана протяженность (количество оснований) соответствующих генов и сайтов связывания

истинным индуктором *lac*-оперона является не лактоза, а продукт ее изомеризации — аллолактоза.

Отрицательная регуляция по типу репрессии характерна для большинства изученных в этом отношении регулонов, ответственных за биосинтез аминокислот.

Ферменты пути биосинтеза лизина не организованы в какой-либо кластер, напоминающий классический оперон, а рассредоточены на разных участках хромосомы. Дерепрессия образования ферментов, наступающая при дефиците лизина, протекает некоординированно. Лизин-тРНК, по-видимому, не может выполнять роль корепрессора. Первый фермент метаболического пути синтеза лизина из аспартата — аспартаткиназа (НФ 2.7.2.4) существует в виде трех изоферментов, причем один из них, активность которого подавляется лизином, вероятно, играет роль регулятора биосинтеза некоторых других ферментов этого пути (например, диаминопимелатдекарбоксилазы, НФ 4.1.1.20).

Восемь основных ферментов, участвующих в биосинтезе аргинина из глутамата, кодируются у *E. coli* генами, также распределенными на разных участках хромосомы. Однако все они находятся под контролем единственного гена-регулятора, и избыток аргинина вызывает репрессию синтеза всех этих ферментов. Четыре из восьми генов объединены в общий кластер, *argECBHI*, представляющий собой пример *дивергентного* регулона, поскольку транскрипция генов *E* и *СВН* регулируется некоординированно и, по-видимому, протекает в направлениях, противоположных от общего оператора (вероятно, считывание происходит с разных цепей ДНК).

К дивергентным оперонам у *E. coli* относятся также кластеры генов, кодирующих синтез биотина и использование мальтозы.

### 3.2.2.4. Другие механизмы регуляции транскрипции на уровне функционирования РНК-полимеразы

Наряду с контролем транскрипции путем взаимодействия белков-регуляторов (репрессоров или активаторов) с регуляторными участками ДНК существует и другой способ регуляции транскрипции в процессе функционирования самой РНКП за счет изменения частоты или специфичности инициации и терминирования процесса. Эти механизмы пока еще изучены на небольшом количестве примеров, однако несомненно, что они имеют очень важное значение для жизнедеятельности клетки.

РНКП эубактерий представляет собой очень сложную устроенный фермент с молекулярной массой около полумиллиона. Его «сердцевина» (*core*) состоит из четырех полипептидов: двух идентичных  $\alpha$ -субъединиц и двух различных  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц. Дополнительным компонентом, участвующим в узнавании некоторых промоторов, является еще один полипептид —  $\sigma$ -фактор, образующий с «сердцевинной» полный, или «холофермент» (*holo-*



loenzyme). Некоторые археобактериальные РНКП-зы устроены еще более сложно, содержат 9—11 белковых компонентов и напоминают РНКП-зы эукариот.

Интересно, что собственно РНК-полимеразная реакция может осуществляться в более простой системе, так как РНКП фагов T3 и T7 представляют собой мономерные полипептиды с молекулярной массой около 110 тыс. Поэтому можно сделать вывод, что сложное устройство бактериальной РНКП, с одной стороны, обусловлено необходимостью специфичного взаимодействия с большим числом промоторов, а с другой — создает потенциальную возможность регуляции скорости транскрипции за счет модификации структуры самой РНКП.

Имеются данные, что в клетках некоторых бактерий РНКП гетерогенна по полипептидному составу, а это открывает возможность дифференциального транскрибирования различных участков ДНК.

Одним из прямых способов регуляции скорости транскрипции является изменение количества молекул РНКП, функционирующих в клетке.

Уровень РНКП в клетке может регулироваться не только путем воздействия на биосинтез субъединиц. Известно, что при улучшении условий питания (перенос на более богатую среду) в клетках *E. coli* мобилизуется эндогенный резерв РНКП и скорость транскрипции возрастает без увеличения общего ее количества. Важно отметить, что в этом случае частота инициации транскрипции разных локусов ДНК увеличивается в разной степени (с преимущественным транскрибированием локусов рРНК). Таким образом, часть РНКП в клетке может находиться в скрытом (латентном) состоянии. Подробные данные о способах регуляции транскрипции в этих условиях приведены в разделе, посвященном регуляции скорости роста бактерий.

Регуляция транскрипции может быть основана не только на управлении инициацией этого процесса, но и его терминацией. РНКП, по-видимому, способна «узнавать» специфические последовательности ДНК, сигнализирующие об окончании транскрипции. Способность «узнавать» может усиливаться или модифицироваться под влиянием специальных полипептидов (например,  $\rho$ -фактора), что приводит к обрыву транскрипции в строго определенных местах регулона.

Сравнительно недавно сделано важное открытие: в составе некоторых регулонов обнаружены так называемые аттенуаторы (attenuators), т. е. участки ДНК, регуляторная роль которых заключается в обрыве транскрипции (как правило, в присутствии  $\rho$ -фактора). Эти участки располагаются в промежутке между оператором и первым структурным геном, как, например, в триптофановом, гистидиновом и изолейцин-валиновом регулонах *E. coli*, гистидиновом регулоне *Salmonella typhimurium*, а также в геноме профага  $\lambda$ . Делеция этого участка, а также мутация генетического локуса, ответственного за образование

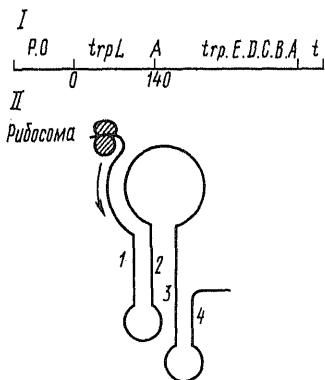


Рис. 3.3. Триптофановый оперон и структура транскрипта его «лидерного» участка у *Escherichia coli* (по Mandelstam et al., 1982). I — начальный отрезок *trp*-оперона; II — транскрипт «лидерного» участка (от 50 до 140 нуклеотида):

P — промотор, O — оператор, A — аттенюатор, *trp* E, D, C, B, A — структурные гены, *trpL* — лидерный участок. Цифрами указано место потенциального формирования внутримолекулярных водородных связей

лот), оказывающей регуляторное действие (обычно конечного продукта данного метаболического пути).

Указанное свойство «лидерных» пептидов должно приводить к замедлению их сборки при дефиците соответствующей аминокислоты. Предполагается, что в этом случае торможение движения рибосомы по растущей цепи мРНК предотвращает образование такой вторичной структуры мРНК, которая способствовала бы диссоциации РНКП от матрицы ДНК.

Наиболее подробно такая модель разработана для триптофанового оперона *E. coli* (рис. 3.3). На «лидерном» участке мРНК возможно образование трех типов петель: 1—2, 2—3 и 3—4. Полагают, что только образование структуры 3—4 служит для РНКП сигналом терминации и обрывает транскрипцию. В процессе трансляции растущей цепи «лидерного» участка мРНК рибосома блокирует около 10 нуклеотидов и определяет, какая именно из вторичных структур мРНК может сформироваться.

Если в клетке нет триптофана, то рибосома «застревает» на участке 1, где находятся два триптофановых кодона (UGA), и, предотвращая формирование структуры 1—2, способствует образованию петли 2—3 в момент прохождения РНКП-й аттенюатора. В результате терминация предотвращается. Если уровень триптофана превышает определенную величину, то рибосо-

м-фактора, приводят к усилению транскрипции структурных генов. При индукции фага  $\lambda$  действие  $\rho$ -зависимого аттенюатора снимается специальным полипептидом — антитерминатором (продуктом гена N). Можно предполагать, что и в бактериальных клетках существуют регуляторные белки с аналогичными функциями. В частности, есть сведения, что комплекс БАК + цАМФ играет в галактозном опероне именно роль «антитерминатора», противодействующего  $\rho$ -фактору и усиливающего транскрипцию дистальных (удаленных от промотора) структурных генов.

Существенной особенностью всех регулонов, управляемых с помощью аттенюации, является обогащение «лидерного» участка мРНК (т. е. той части транскрипта, которая соответствует расстоянию между промоторно-операторным участком и аттенюатором) (рис. 3.3) кодонами аминокислоты (или аминокис-

ма проходит до участка 2, где локализован терминирующий кодон «лидерного» пептида (UGA). При этом структура 2—3 не может образоваться и формируется петля 3—4, сигнализирующая о терминации. В результате 90—95% молекул РНКП диссоциируют от матрицы ДНК в точке аттенюации, образуя только укороченный «лидерный» транскрипт.

Все до сих пор описанные механизмы регуляции транскрипции достаточно быстро откликаются на изменение условий (концентрации эффекторов), но управляют работой лишь одного или ограниченного числа регулонов.

Регуляция, связанная с одновременным изменением работы большого числа регулонов, носит название *системной* регуляции.

Если в клетках эукариот такие глобальные системные изменения могут быть достигнуты путем конформационных перестроек хроматина, процессинга мРНК, а также за счет управления процессом трансляции генетической информации, то в случае прокариотных организмов тот же эффект может быть достигнут за счет изменения специфичности работы РНКП путем модификации ее компонентного состава (и на основе других механизмов, которые будут рассмотрены ниже).

Наиболее изученными примерами регуляции такого типа является управление транскрипцией при развитии некоторых бактериофагов.

Некоторые бактериофаги образуют свою собственную РНКП, устроенную более просто, чем РНКП бактерий, как это имеет место в случае нечетных фагов T3 и T7 *E. coli*. В этом случае РНКП бактерии-хозяина выключается путем воздействия на нее специфических полипептидов-ингибиторов. Однако другие бактериофаги на протяжении всего цикла развития используют РНКП бактерии-хозяина. При этом «ранние» гены транскрибируются интактной РНКП хозяина. Среди продуктов, «ранних» генов присутствуют полипептиды, заменяющие  $\sigma$ -фактор бактерии-хозяина. Так, у фага *sPO1 Bac. subtilis* сначала образуется полипептид (продукт «раннего» гена 28), заменяющий  $\sigma$ -фактор и обеспечивающий транскрипцию «средних» генов. В свою очередь два полипептида — продукты «средних» генов 33 и 34, замещая  $\sigma$ -фактор, обеспечивают транскрипцию «поздних» генов бактериофага. Одновременно подавляется способность РНКП транскрибировать бактериальные гены, а также «ранние» и «средние» фаговые гены.

Возможен еще один вариант, имеющий место при развитии T-четных фагов *E. coli*. В этом случае на протяжении всего цикла развития фага сохраняется  $\sigma$ -фактор, характерный для исходной РНКП бактерии-хозяина, однако происходит модификация компонентов «сердцевины» РНКП. Такая модификация включает АДФ-рибозилирование  $\alpha$ -субъединицы, а также присоединение к «сердцевине» РНКП нескольких новых полипептидов — продуктов «ранних» фаговых генов. Модифицированная РНКП

теряет способность транскрибировать ДНК бактерии-хозяина и «ранние» гены ДНК фага. Эта модификация дополняется специфическими требованиями к матрице — ДНК фага, «поздние» гены которой способны транскрибироваться только в процессе репликации фаговой ДНК.

Другой областью реализации возможности управления транскрипцией в процессе функционирования РНКП является клеточная дифференцировка у бактерий, в частности управление процессом спорообразования.

Набор из нескольких сотен генов, кодирующих необходимые для спорообразования компоненты, по-видимому, объединен в специфический кластер, занимающий особое положение на хромосоме. Однако эти гены входят в десятки структур, подобных регулонам («спорулоны»), каждая из которых может регулироваться самостоятельно. Одним из возможных механизмов координации работы столь обширного и разнообразного генного материала могла бы быть последовательная активация «спорулонов» в процессе репликации ДНК, однако порядок их расположения на хромосоме не соответствует последовательности включения соответствующих продуктов в процессе спорообразования. Следовательно, для согласования функционирования этих генетических элементов должны существовать другие эффективные механизмы. В качестве одного из таких механизмов постулирована возможность регуляции транскрипции путем изменения специфичности работы РНКП.

Косвенным указанием на изменение специфичности РНКП в процессе спорообразования служит тот факт, что в клетках *Bac. subtilis* в период спорообразования становится невозможным размножение некоторых фагов, а выделенная из таких клеток РНКП не способна транскрибировать фаговую ДНК *in vitro*.

Сведения о природе химических изменений состава РНКП в процессе спорообразования пока ограничены и в значительной степени противоречивы. По-видимому, в спорулирующих клетках сохраняется РНКП, характерная для вегетативных клеток, но наряду с этим появляются новые полипептиды, подобные  $\sigma$ -фактору, которые взаимодействуют с «сердцевинной» фермента и изменяют специфичность узнавания промоторов. Несомненно, что управление таким сложным, многостадийным процессом, как спорообразование, должно осуществляться путем взаимодействия нескольких механизмов, и изменение матричной специфичности РНКП, по-видимому, лишь один из них. В последнее время накапливаются данные о значении роли регуляции процесса трансляции при управлении клеточной дифференцировкой не только у эукариот, но и у прокариот, о чем будет идти речь в следующих разделах.

### 3.2.2.5. Регуляция транскрипции путем изменения конформации или структуры ДНК

**Изменение степени сверхспирализации ДНК.** Системная регуляция транскрипции, т. е. включение или выключение одновременно большого числа регулонов, может достигаться путем изменения конформации матрицы ДНК.

В настоящее время интенсивно изучается обнаруженный в бактериальных клетках новый класс белковых катализаторов, для которых предложено общее название *топоизомеразы*. Эти белки могут изменять степень сверхспирализации ДНК, не нарушая ее замкнутой кольцевой природы. По-видимому, при этом они производят разрывы в одной из цепей ДНК, а затем после соответствующего скручивания или раскручивания молекулы «зашивают» разрыв.

Известны топоизомеразы двух типов. Первый — *релаксирующие белки*, понижающие степень сверхспирализации ДНК, уменьшая свободную энергию молекулы, и принимающие участие в инициации репликации. Типичным примером является  $\omega$ -белок *E. coli*.

Другой тип топоизомераз — это белки, повышающие степень сверхспирализации ДНК. Примером может служить ДНК-гираза *E. coli*. Фермент состоит из двух типов субъединиц: субъединица А катализирует разрыв и замыкание фосфодиэфирной связи, а субъединица В обладает АТФ-азной активностью и использует энергию АТФ для закручивания цепей ДНК (при этом энергия АТФ преобразуется в энергию сверхспирали). Нативный фермент, по-видимому, является тетрамером ( $A_2B_2$ ) с молекулярной массой около 350 000. ДНК-гираза участвует в процессе репликации ДНК, необходима для осуществления рекомбинаций и конъюгативной передачи генетического материала.

Косвенным указанием на то, что степень сверхспирализации ДНК влияет на специфичность транскрипции, служит действие ингибиторов ДНК-гиразы *E. coli*. К таким ингибиторам относятся некоторые антибиотики (налидиксовая кислота, новобиоцин и коумермицин). Так, например, в присутствии коумермицина, который сам по себе не подавляет ни транскрипцию, ни трансляцию, синтез белков продолжается, однако спектр синтезируемых белков сильно изменяется: образование одних белков тормозится, а других активизируется. У мутанта с устойчивой к коумермицину ДНК-гиразой антибиотик не вызывает изменения белкового синтеза. Таким образом, наблюдаемые эффекты являются результатом сдвигов в специфичности транскрипции вследствие релаксации ДНК-матрицы, а не результатом побочного действия антибиотика.

Перестройка транскрипции при изменении степени сверхспирализации ДНК может объясняться по крайней мере двумя причинами. Во-первых, при этом может изменяться специфичность узнавания промоторов РНКП. Действительно, хотя «сердце-

вина» РНКП транскрибирует ДНК *in vitro* и в отсутствие  $\sigma$ -фактора, но, если ДНК релаксирована, наблюдается неспецифическая, симметричная транскрипция. Однако если ДНК сверхспирализована, то регистрируется протекание более избирательной, асимметричной, транскрипции. Очевидно, в случае сверхспирализованной ДНК минимальный фермент обнаруживает способность к выбору промоторов и в отсутствие  $\sigma$ -фактора.

Во-вторых, при изменении сверхспирализованности ДНК может регулироваться сила взаимодействия (сродство) с ДНК белковых репрессоров и активаторов. Например, присоединение  $\lambda$ -репрессора к сверхспирализованной ДНК энергетически более выгодно, чем взаимодействие с релаксированной ДНК.

**Изменение структуры ДНК-матрицы.** В последнее время на примере функционирования плазмид, а также геномов некоторых фагов показана возможность выщепления определенных участков генома и встраивания их в другие места хромосомы или плазмиды. При этом может изменяться характер регуляции или нарушаться транскрипция как генетических локусов, входящих в состав перемещаемых участков, так и соседних с ними локусов. Возможно встраивание генетического элемента в тот же участок ДНК, откуда он был выщеплен, но в инвертированном виде («задом—наперед»). Такая инверсия иногда служит способом регуляции развития фагов (например, фага *Mu E. coli*).

У эукариот сходные подвижные генетические элементы получили название «мобильно диспергированных генов».

Выщепляемые участки ДНК обозначают термином *инсертосомы*. Кроме фагов *Mu* и  $\lambda$  известны еще два основных типа транспозируемых элементов. Тп-элементы (транспозоны) представляют собой сегменты R-факторов — плазмид, кодирующих устойчивость к антибиотикам. Транспозоны содержат несколько тысяч пар нуклеотидов и часто имеют на концах специфические последовательности в прямой или обратной ориентации друг к другу, которые и обеспечивают транслокацию заключенного между ними генетического материала. Как правило, каждый из транспозонов содержит информацию, достаточную для фенотипического проявления устойчивости микроорганизма к одному или группе родственных антибиотиков.

Другой вид инсертосом — IS-элементы состоят из нескольких сот пар нуклеотидов и не имеют определенного фенотипического выражения, хотя могут содержать сигналы для инициации или терминации транскрипции, а также кодировать ферменты, осуществляющие процесс транспозиции.

У *E. coli* известно несколько типов IS-элементов. Инсертосомы IS1 и IS2 могут регулировать скорость транскрипции лактозного и галактозного оперонов. Встраиваясь в галактозный оперон между промотором и первым структурным геном, элемент IS2 играет роль  $q$ -зависимого терминатора и резко тормозит транскрипцию. Встраиваясь в обратной ориентации, элемент IS2 обнаруживает свойства нового промотора (независимого от репрес-

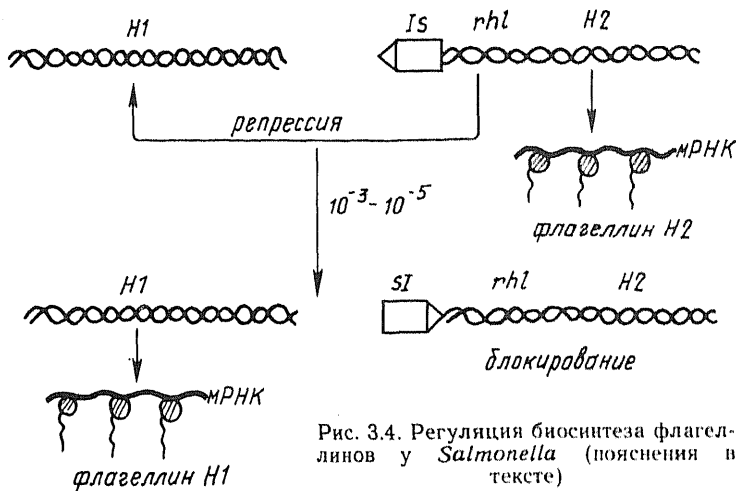


Рис. 3.4. Регуляция биосинтеза флагеллинов у *Salmonella* (пояснения в тексте)

сора данного оперона) и резко увеличивает скорость транскрипции расположенных после него структурных генов, превращая их из индуцируемых в конститутивные.

Недавно установлено, что регуляция транскрипции с помощью инсертосом происходит также при биосинтезе белков жгутиков сальмонелл. У этих бактерий существует несколько типов флагеллинов — структурных белков, из которых собираются жгутики. Так, в геноме штамма SL 4213 есть два отдельно локализованных гена H1 и H2, кодирующих два разных флагеллина (рис. 3.4). В одном из состояний генома транскрибируется только ген H1 и образуется кодируемый им флагеллин. В другом состоянии включается транскрипция генов rhl и H2, причем продукт гена rhl является репрессором транскрипции гена H1. Участок ДНК, содержащий гены rhl и H2, включает небольшую область (около 800 пар нуклеотидов), которая представляет собой инсертосому и может существовать в прямом и инвертированном состоянии.

Когда этот участок находится в одном из состояний, транскрипция локусов rhl и H2 протекает нормально и образуется репрессор локуса H1, а после инверсии транскрипция локусов rhl и H2 блокируется и освобождается локус H1.

Переход из одного состояния в другое обратим, требует специфического клеточного фактора (vh2) и у разных штаммов сальмонелл совершается с разной частотой. Биологическое значение этого явления может заключаться в создании гетерогенности популяции бактерий по данному антигену (флагеллину), что способствует выживанию клонов в условиях воздействия иммунологических механизмов хозяина.

Остается пока неизвестным значение метилирования ДНК для регуляции процесса транскрипции.

### 3.2.2.6. Регуляция транскрипции у эукариот

В клетках микроорганизмов-эукариот, по-видимому, отсутствуют генетические структуры, образованные по типу классических оперонов. Основную роль в регуляции транскрипции в этом случае должны играть структурные компоненты хроматина, поскольку показано, что транскрипция хроматиновой матрицы в системах *in vitro* сохраняет специфичность, присущую клеткам, из которых этот хроматин получен. Среди структурных компонентов хроматина привлекают внимание гистоны — белки основного характера, в которых остатки основных аминокислот сосредоточены главным образом на участке молекулы, обеспечивающем присоединение к ДНК. Остальная часть молекулы образует  $\alpha$ -спиральную структуру и, по-видимому, обуславливает взаимодействие гистонов друг с другом. Однако сами по себе гистоны вряд ли могут создать необходимую степень избирательности транскрипции, хотя выполняют важную структурную роль. Другим вероятным элементом регуляторного механизма в ДНК эукариот являются «умеренно повторяющиеся» последовательности оснований, встроенные между уникальными их последовательностями, выполняющими функции структурных генов, кодирующих конкретные белковые посредники. Такие умеренные повторы могут играть роль центров узнавания для РНКII и в определенных условиях подвергаться конформационным модификациям, освобождающим определенные локусы ДНК для РНК-полимеразной реакции.

Важную роль в регуляции транскрипции у эукариот, по-видимому, играет перемещение «мобильных генов».

В настоящее время трудно сделать окончательный вывод о природе тонких механизмов регуляции транскрипции в эукариотической клетке. Следует отметить, что в управлении скоростью синтеза белков у эукариот очень важную роль играет также трансляционный уровень регуляции.

### 3.2.3. Регуляция процесса трансляции

До последнего времени в общепринятых схемах регуляция биосинтеза белков на уровне трансляции у прокариот не предусматривалась, хотя указания на возможность такого механизма имелись. Об этом свидетельствовали различия в скоростях образования некоторых белков (например, субъединиц РНКII и рибосомных белков), кодируемых одним и тем же регулоном, а также управление скоростью трансляции фаговых РНК с помощью белков того же фага (MS2).

Потенциальные возможности регуляции процесса трансляции связаны с этапами биосинтеза компонентов аппарата трансляции, сборки этого аппарата и управлением его функциями.



### 3.2.3.1. Регуляция на этапе биосинтеза и сборки компонентов аппарата трансляции

Основными высокомолекулярными компонентами аппарата трансляции являются аминокцил-тРНК-синтетазы (aa-тРНК-синтетазы; КФ 6.1.1), тРНК, рРНК, мРНК, рибосомные белки и белковые факторы трансляции.

Существовало представление, что уровень aa-тРНК-синтетаз регулируется количеством доступных аминокислот, а корепрессором биосинтеза этих ферментов служит aa-тРНК. Однако при оценке подобных данных не всегда учитывались обстоятельства, связанные со сложным круговоротом данных ферментов. Тщательно поставленные опыты показали, что добавление аминокислот существенно не влияет на прямую связь между скоростью роста и скоростью биосинтеза aa-тРНК-синтетаз. Таким образом, связь между уровнями аминокислот и aa-тРНК-синтетаз более сложная, чем простая репрессия — дерепрессия. Так или иначе, но уровень всех (или большинства) aa-тРНК-синтетаз регулируется координированно.

Синтез тРНК идет через промежуточное образование более длинных предшественников, которые в дальнейшем укорачиваются и модифицируются, подвергаясь «созреванию», или «процессингу». Одна и та же модификация данного основания (например, его метилирование) может осуществляться разными ферментами в зависимости от положения этого основания в цепи тРНК. Синтез этих ферментов, в свою очередь, может подвергаться строгой регуляции.

Рибосомная РНК также синтезируется в виде более длинных предшественников и подвергается «процессингу». Образование рРНК и рибосомных белков регулируется координированно и определяется эффективностью функционирования аппарата трансляции. Так, при дефиците аминокислот транскрипция локусов, кодирующих рРНК и рибосомные белки, подавляется одновременно (о механизме этого явления см. раздел «Регуляция скорости роста»). С другой стороны, по-видимому, существует специальный механизм, контролирующий процесс сборки рибосом, так как в условиях, допускающих только медленный рост микроорганизма, скорость сборки рРНК и рибосомных белков в рибосомы ниже, чем скорость образования этих компонентов.

Информационная РНК также часто образуется в виде более длинного предшественника, содержащего дополнительные последовательности оснований, которые удаляются нуклеазами, однако в отличие от эукариот у прокариот этот процесс протекает быстро.

У эукариот дальнейшая модификация мРНК касается 5'-конца, где может достигаться специфическая группировка из нескольких оснований («кеп»), служащих, по-видимому, для защиты от экзонуклеаз и повышающих эффективность трансляции.

Имеются данные об образовании полиаденилированных (на 3'-конце) аналогичных эукариотическим мРНК, содержащих до 180 аденильных остатков, в процессе спорообразования у бацилл. Аналогичные формы мРНК теперь находят и в их вегетативных клетках (при условии тщательного ингибирования активности РНКаз).

Практически отсутствуют данные о регуляции биосинтеза белковых факторов трансляции. Недавно обнаружено, что некоторые из них могут подвергаться модификации (метилирование фактора EF-Tu у *E. coli*). Однако значение этого явления пока неизвестно.

### 3.2.3.2. Регуляция процесса функционирования аппарата трансляции

Один из возможных способов регуляции аппарата трансляции заключается в селективности рибосом в отношении матрицы — мРНК.

Необходимая степень селективности рибосом создается, как правило, модификацией (или заменой) их белковых компонентов. Это можно рассматривать как один из видов системной перестройки управления метаболизмом клетки. Такая перестройка осуществляется, например, при развитии некоторых бактериофагов. Как уже упоминалось, в процессе развития Т-четных фагов *E. coli* происходит модификация компонентов «сердцевины» бактериальной РНКII; наряду с этим наблюдается изменение белковых компонентов 30S-субчастиц рибосом, в результате чего резко замедляется трансляция мРНК хозяина, а рибосомы приобретают устойчивость к стрептомицину (поражающему именно 30S-субчастицы). Сходное по характеру изменение специфичности рибосом отмечено в процессе спорообразования у *Bacillus subtilis*, а также в процессе перехода фототрофной бактерии *Rhodospseudomonas palustris* от автотрофных к гетеротрофным условиям существования.

Выбор матрицы (мРНК) может осуществляться также на основе специфичности изоакцепторных тРНК. Часть молекул тРНК, присутствующих в клетке, по-видимому, является резервом, который подключается к трансляции при высокой скорости роста. Другие изоакцепторные тРНК могут играть чисто регуляторную роль. Важно отметить, что ряд тРНК обладает практически абсолютной специфичностью только к одному из кодонов, характерных для данной аминокислоты.

Известны случаи, когда при смене условий существования клеток в них резко меняется набор тРНК, взаимодействующих с рибосомами. Так происходит на разных фазах роста *E. coli*, а также при переходе от хемотрофии к фототрофии *Rhodobacter sphaeroides*.

Показано, что кодирование той или иной аминокислоты может избирательно осуществляться только одним из возможных

кодонов. Так, в случае фага MS2 четыре остатка тирозина белка оболочки кодируются только одним из возможных кодонов. Особенно важно, что некоторые аминокислоты, входящие как в белок оболочки, так и в РНКП фага (лизин, глутамин), избирательно кодируются только одним из кодонов, причем для белка оболочки и РНКП эти кодоны различаются. Указанное обстоятельство открывает возможности для избирательного управления синтезом того или другого белка путем обрыва процесса трансляции в связи с отсутствием необходимой изоакцепторной тРНК.

Возможно блокирование трансляции путем присоединения комплементарной регуляторной РНК (*mic* РНК) к участку инициации на мРНК.

Необходимо также вернуться к ранее упомянутой способности некоторых белков подавлять трансляцию как собственных, так и других матриц. Так, белок оболочки фага MS2 ингибирует трансляцию матрицы для репликазы этого же фага путем взаимодействия с точкой инициации. Аналогичным действием на трансляцию собственных матриц обладают рибосомные белки L10 и L12, однако они взаимодействуют с матрицей на некотором расстоянии от иницирующего кодона. Есть сведения, что РНКП *E. coli* обнаруживает способность к отрицательной регуляции собственного синтеза на уровне трансляции.

Наконец, нельзя исключить возможность регуляции процесса трансляции путем изменения скорости перемещения рибосом по матрице, мРНК. Если нормальная скорость трансляции у *E. coli* соответствует включению 15—17 аминокислот в секунду на рибосому, то при медленном росте на минимальной среде эта скорость может снижаться почти вдвое. Механизмы управления в этом случае остаются неизвестными.

### **3.2.4. Регуляция биосинтеза белков путем посттрансляционной модификации**

В клетках эукариот полицистронные матрицы часто транслируются целиком, а образующаяся общая полипептидная цепь в дальнейшем «разрезается» на индивидуальные полипептиды. У организмов этого типа широко распространен также синтез белков в виде более длинных предшественников, которые затем укорачиваются, следовательно, как и в случае синтеза РНК, молекулы проходят стадию «созревания», или «процессинга», характерную для многих пищеварительных ферментов, инсулина, коллагена и других белков.

Сходные процессы, хотя и в меньшем масштабе, обнаружены в последнее время в клетках прокариот. Например,  $\beta$ -лактамаза (пенициллиназа; КФ 3.5.2.6) *E. coli* синтезируется в виде предшественника, содержащего 286 аминокислот, а в процессе секреции укорачивается на 23 аминокислотных остатка. Сходное явление отмечено и для щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1).

По-видимому, это характерно для большинства экзоферментов и периплазматических белков, которые должны обладать способностью проникать через цитоплазматическую мембрану. На NH<sub>2</sub>-конце такого белка синтезируется «лишний», так называемый «сигнальный» или «лидерный» полипептид, определяющий специфическое взаимодействие с определенными компонентами цитоплазматической мембраны. В процессе трансляции этих белков возникает полисомно-мембранный комплекс, а растущий полипептид «проталкивается» через мембрану.

К той же группе процессов посттрансляционной модификации можно отнести ферментативное присоединение коферментов (биотина, флавинов, гемов и др.) к готовой молекуле апофермента, а также формирование третичной и четвертичной структуры их молекул.

### **3.2.5. Регуляция круговорота белков путем избирательного протеолиза**

Постоянный круговорот белков и в том числе ферментов, состоящий в их расщеплении специфическими протеиназами с последующим ресинтезом тех же самых или других белков — одно из важнейших свойств клеточного метаболизма. Для различных белков и у разных типов клеток скорость круговорота составляет от нескольких процентов до нескольких десятков процентов за клеточный цикл.

Особенно важное значение приобретает такой круговорот в процессе клеточной дифференцировки, например спорообразования у бактерий. В этот период активируется синтез внутриклеточных протеиназ, и происходит распад почти половины всего клеточного белка. Однако протеиназы действуют не хаотично, а избирательно, расщепляя лишь определенные ферменты и структурные белки. Такая избирательность, по-видимому, обеспечивается специальной подготовкой белка-субстрата путем АТФ-зависимого присоединения к нему денатурирующего белкового агента (*убихитина*). Механизм регуляции биосинтеза убихитинов не изучен и их участие в протеолизе доказано пока для ограниченного числа случаев, однако данный способ регуляции количественного (и качественного) состава клеточных белков на посттрансляционном уровне может оказаться одним из важных способов системного управления метаболизмом.

### **3.3. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГОТОВЫХ БЕЛКОВЫХ ПОСРЕДНИКОВ**

Уровень регуляции функционирования готовых белков является более «быстродействующим», чем уровень регуляции их биосинтеза, и скорее «откликается» на изменение условий существования клетки. Оба способа управления метаболизмом допол-

няют друг друга, и мутанты, дефектные по одному из указанных способов регуляции, как правило, вытесняются из популяции.

В настоящее время способы регуляции активности ферментов хорошо изучены и описаны в учебниках. Мы ограничимся лишь краткой характеристикой основных типов регуляторных механизмов. Вопросы, связанные с регуляцией активности белковых посредников транспортных систем, будут рассмотрены в разделе главы, посвященном транспортным процессам.

### **3.3.1. Регуляция активности ферментов путем обратимой ковалентной модификации**

В отличие от посттрансляционной модификации белков, действующей на стадии их биосинтеза, способ регуляции активности ферментов путем обратимой ковалентной модификации характеризуется обратимостью и отсутствием изменения длины полипептидной цепи. Этот механизм более изучен у эукариот. Например, хорошо известна регуляция путем фосфорилирования и дефосфорилирования активности гликогенфосфорилазы (КФ 2.4.1.1) и гликогенсинтазы (КФ 2.4.1.11).

Наиболее изученным параметром аналогичной регуляции в клетках ряда граммотрицательных прокариот может служить регуляция активности глутаминсинтетазы (КФ 6.3.1.2) путем ее обратимого аденилирования. Бактериальный фермент имеет молекулярную массу около 600 000 и состоит из 12 субъединиц, каждая из которых может присоединять АМФ (к остатку тирозина). При этом изменяется не только активность фермента, но и его регуляторные свойства.

Имеются данные, свидетельствующие о том, что такой механизм регуляции может иметь более широкое распространение, чем считали до сих пор. Дополнительные примеры будут приведены в разделе посвященном регуляции транспортных процессов.

### **3.3.2. Регуляция активности ферментов путем взаимодействия с субстратом (гомotropная кооперативность)**

Для осуществления этого типа регуляции фермент должен иметь несколько активных центров одинаковой природы, способных взаимодействовать с молекулами субстрата. При этом присоединение первой молекулы субстрата облегчает присоединение последующих молекул, и скорость реакции возрастает по экспоненциальному закону. Поэтому график зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата имеет сигмовидную форму.

Типичным примером фермента, активность которого регулируется подобным образом, служит НАД<sup>+</sup>-зависимая глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (КФ 1.2.1.12), выделенная из

дрожжей. Интересно, что аналогичная дегидрогеназа мышц кролика обнаруживает отрицательную кооперативность в отношении связывания НАД<sup>+</sup>, в результате чего присоединение каждой последующей молекулы кофермента затрудняется.

Высказано предположение, что отрицательная кооперативность при связывании субстратов (коферментов) обусловлена наличием сильного взаимодействия субъединиц в молекуле фермента, приводящим к тому, что при связывании субстрата одной субъединицей изменяется конформация соседней субъединицы и происходит снижение ее сродства к субстрату. После химической трансформации субстрата исходная конформация субъединицы восстанавливается, что может облегчить диссоциацию продуктов реакции. Такой механизм чередования конформационных состояний субъединиц фермента получил название механизма *качелей*, или *флип-флоп*-механизма. Сходная последовательность событий предложена для описания поведения щелочной фосфатазы *E. coli*.

Физиологическое значение отрицательной кооперативности, по-видимому, состоит в поддержании своеобразной «буферности» в отношении концентрации субстратов, что обеспечивает сохранение равновесных условий. Это же явление имеет место и в процессе регуляции активности некоторых транспортных переносчиков в мембране.

### **3.3.3. Регуляция активности ферментов путем взаимодействия с продуктом (гетеротропная кооперативность)**

Для проявления данного типа регуляции фермент должен обладать отдельными активными центрами: каталитическим (связывающим субстрат) и регуляторным (связывающим продукт или другой эффектор). Эти активные центры обычно размещены на разных субъединицах фермента (или в общем виде *аллостерического белка*). Однако связывание эффектора с регуляторным центром влияет на конформацию каталитического центра и изменяет его сродство к субстрату, как правило, снижая это сродство.

Классическим примером фермента, регуляция активности которого осуществляется по механизму отрицательной гетеротропной кооперативности, может служить треониндегидратаза (КФ 4.2.1.16) *E. coli*. В этом случае активность фермента подавляется конечным продуктом метаболического пути — изолейцином. Аналогичный тип регуляции характерен для аспартат-карбамоилтрансферазы (КФ 2.1.3.2), отрицательным эффектором которой служит ЦТФ.

Указанный тип регуляции характерен для анаболических (конструктивных) путей метаболизма. В этом случае конечный продукт метаболического пути, накапливающийся до определен-

ного уровня, подавляет свой биосинтез, ингибируя активность первого (или одного из первых) фермента данного пути. Таким образом обеспечивается экономия конструктивного материала и энергии.

В катаболических (энергетических) путях метаболизма отрицательным эффектором для ферментов часто служит соединение, являющееся аккумулятором энергии (АТФ, пирофосфат и др.), тогда как другие компоненты аденилатной системы (АМФ, АДФ) могут выступать в качестве положительных эффекторов. Например, фосфофруктокиназа (КФ 2.7.1.11) активируется АДФ, но ингибируется фосфоенолпируватом. Следовательно, активность рассмотренных ферментов определяется общим «энергетическим зарядом» клетки; последний вычисляется по формуле

$$\text{Энергетический заряд} = \frac{\text{АТФ} + 1/2 \text{АДФ}}{\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}}$$

Величина «энергетического заряда» характеризует молярную долю АТФ в общем балансе адениновых нуклеотидов (у большинства живых клеток в пределах 0,75—0,90).

Ферменты, играющие роль в конструктивном и энергетическом метаболизме (*амфиболические* ферменты), могут регулироваться одновременно с помощью обоих механизмов. Кроме того, отрицательное воздействие конечных продуктов может сочетаться с активацией фермента субстратом или его предшественником. Например, активность НАД<sup>+</sup>-зависимой изоцитратдегидрогеназы у *E. coli* (КФ 1.1.1.41) стимулируется АДФ и цитратом, но подавляется α-кетоглутаратом и глутаматом.

В разветвленных биосинтетических путях подавление активности фермента, катализирующего начальные стадии процесса, одним из конечных продуктов приводило бы к дефициту остальных конечных продуктов. Это обстоятельство требует особой организации регуляторных механизмов в таких путях.

Известны две основные возможности: первая из них — образование нескольких аналогичных ферментов, катализирующих одну и ту же стадию процесса, но регулируемых избирательно только одним из конечных продуктов (*изоферменты*); вторая — наличие в молекуле фермента пространственно обособленных, но взаимодействующих центров связывания каждого из эффекторов, в результате чего последние не оказывают порознь существенного влияния на активность фермента, а при совместном присутствии подавляют эту активность (*согласованное*, или *мультивалентное*, ингибирование). Например, активность аспараткиназы (КФ 2.7.2.4) *E. coli* подавляется лизином только в сочетании с метионином, лейцином или изолейцином.

**Т а б л и ц а 3.1. Основные способы регуляции процессов метаболизма у прокариот и природы эффекторов**

Тип метаболических процессов	Уровни регуляции и эффекторы						
	Биосинтез белков			Функционирование белков			
	индукция	репрессия	катаболическая репрессия	аттеннуация	гомолотропная кооперативность	гетеротропная кооперативность	
Энергетические	Да, субстраты или аналогии	Нет	Да, более выгодные субстраты	Нет	Да, субстраты ( $\pm$ )	Да, АТФ, ФФ <sub>n</sub> и др. (-) АДФ, АМФ и др. (+)	
Конструктивные	Нет	Да, конечные продукты	Нет	Да, конечные продукты	Нет (да)	Да, конечные продукты (-)	
Амфибилические	Да, нет	Да, нет	Да, нет	Да, нет	Да, субстраты ( $\pm$ )	Да, конечные продукты (-) АТФ и др. (-) АДФ и др. (+)	

Примечание. Двойной ответ (да, нет) означает наличие как одного, так и других случаев. Знак «+» — положительный эффект, знак «-» — отрицательный эффект.



### 3.3.4. Регуляция активности ферментов путем пространственного разобщения и взаимодействия с мембранами

Эукариотные и прокариотные клетки имеют пространственные «отсеки», в которых локализована часть их ферментативного аппарата. Так, у грамотрицательных бактерий некоторые гидролазы локализованы в периплазматическом пространстве (между внешней и цитоплазматической мембранами). Эти обстоятельства создают возможность регуляции ферментативной активности путем управления скоростью проникновения в «отсек» субстрата или выхода из него фермента (*компартаментация*).

Многие белки и в том числе ферменты способны обратимо взаимодействовать с клеточной мембраной, что приводит к изменению физико-химических свойств белков и их ферментативной активности (*аллотопия*). Показано, например, что гидрофобные взаимодействия липидов и белков могут переводить последние в неактивное (латентное) состояние, напротив, электростатические взаимодействия вызывают активирование некоторых ферментов. В свою очередь степень и характер взаимодействия ферментов с другими мембранными белками и липидами в определенной степени зависят от внутриклеточной концентрации электролитов, а следовательно, могут регулироваться при изменении физиологических условий.

Ферменты, катализирующие серию последовательных реакций, иногда образуют *ансамбли*, локализованные в цитоплазме (дегидрогеназы  $\alpha$ -кетокислот) или в клеточной мембране (ферменты дыхательной и фотосинтетической цепей). Регуляция в таких ансамблях имеет свои особенности, так как продукт, образующийся на предыдущей стадии, «подхватывается» следующим ферментом без выхода в окружающую среду.

Рассмотренные выше способы регуляции метаболических процессов обобщены в табл. 3.1.

### 3.4. РЕГУЛЯЦИЯ ИНТЕГРАЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ ПРОЦЕССОВ У МИКРООРГАНИЗМОВ

Рассмотрев основные механизмы регуляции биосинтеза и активности белковых посредников метаболизма, следует остановиться на возможностях и особенностях реализации этих механизмов в регуляции интегральных мембранных процессов.

С клеточной мембраной микроорганизмов связан целый ряд метаболических реакций и их организованных последовательностей. Прежде всего, это дыхание, окислительное и фотосинтетическое фосфорилирование, репликация ДНК, биосинтез белка, биосинтез липидов и компонентов клеточной стенки, транспорт, клеточное деление и др. Однако истинно интегральными мембранными процессами, все важнейшие этапы которых связаны с мембранами, следует признать лишь некоторые из них, в первую оче-

редь транспорт и клеточное деление (образование клеточной перегородки). На примере этих процессов и будут рассмотрены способы и особенности регуляции физиологических функций биомембран.

### 3.4.1. Организация и регуляция транспортных процессов

Основную роль в транспорте веществ из окружающей среды в клетки большинства микроорганизмов выполняют компоненты аппарата, локализованного в *цитоплазматической* мембране.

Необходимо отметить, что клетки грамотрицательных микроорганизмов окружены *наружной* мембраной, которая является барьером для проникновения большинства гидрофильных (и некоторых гидрофобных) веществ. Избирательная проницаемость наружной мембраны обеспечивается двумя основными способами: образованием гидрофильных «каналов», или «пор», с помощью специальных структурных белков (*поринов*), обеспечивающих проникновение гидрофильных веществ с молекулярной массой до нескольких сотен дальтон, а также локализацией в наружной мембране ряда специфических транспортных систем (для ионов железа, мальтозы, витамина В<sub>12</sub>, нуклеозидов).

Отметим, что специальный транспортный аппарат локализован также в некоторых субклеточных структурах эукариот (например, в митохондриях). Свойства этих транспортных систем рассматриваются в соответствующих разделах учебников биохимии.

#### 3.4.1.1. Пассивная проницаемость цитоплазматической мембраны

Пассивная проницаемость мембраны — проникновение через нее веществ без прямого участия мембранных посредников за счет теплового движения молекул (*физическая* диффузия). Конечным итогом физической диффузии обычно является уравнивание внеклеточной ( $S_o$ ) и внутриклеточной ( $S_i$ ) концентраций вещества. Начальная скорость физической диффузии линейно зависит от внешней концентрации вещества, точнее от градиента концентраций ( $\Delta S = S_i - S_o$ ), а изменение температуры (в пределах физиологического диапазона) мало влияет на скорость процесса (рис. 3.5, 1).

Поскольку для большинства гидрофильных природных субстратов (сахаров, аминокислот, органических кислот и т. д.) коэффициент диффузии через двойной липидный слой мембраны имеет очень низкую величину, скорость их диффузии недостаточна для обеспечения нормальной скорости метаболических процессов.

### 3.4.1.2. Транспортные функции цитоплазматической мембраны

В некоторых случаях транспортные процессы так же, как и физическая диффузия, могут приводить лишь к уравниванию внешней и внутренней концентраций вещества. Однако транспортные процессы всегда протекают с участием белковых посредников (*переносчиков*), и скорость их достаточно велика, чтобы обеспечить протекание метаболических реакций. В указанном случае ( $S_o = S_i$ ) для транспортного процесса предложено название *облегченная диффузия*.

Однако значительно чаще результатом транспортного процесса является заметная аккумуляция вещества в клетке ( $S_i \gg S_o$ ). Такой транспортный процесс требует затраты энергии и носит название *концентрирующего* («активного») транспорта.

Особенностью транспортных процессов в отличие от физической диффузии является их *стереоспецифичность*, в этом случае близкие по химической структуре вещества конкурируют при транспорте за общий переносчик. Ограниченное количество молекул переносчика в мембране приводит к тому, что зависимость начальной скорости транспортного процесса от концентрации субстрата описывается уравнением ферментативной кинетики Михаэлиса — Ментен с аналогичными параметрами ( $K_m$  и  $V_{max}$ ), а графически выражается гиперболой (рис. 3.5, 2)

$$V = \frac{V_{max}}{1 + K_m/S_o},$$

где  $V$  — начальная скорость транспорта;  $V_{max}$  — максимальная скорость транспорта при насыщающей концентрации субстрата,  $S_o$ ;  $K_m$  — концентрация субстрата, при которой скорость транспорта равна половине максимальной. В этом случае говорят, что транспортный процесс подчиняется кинетике «насыщения».

**Организация транспортных систем.** Одной из первых моделей транслокации субстрата через биомембраны была модель «подвижного» переносчика, в которой предполагалось присутствие интегрального мембранного белкового компонента, способного к образованию гидрофобного комплекса с гидрофильным субстратом, экранирующего последний от гидрофобной внутримембранной среды. Предполагалось, что образовавшийся комплекс далее поступает путем диффузии на внутреннюю сторону мембраны, где субстрат освобождается во внутриклеточное пространство

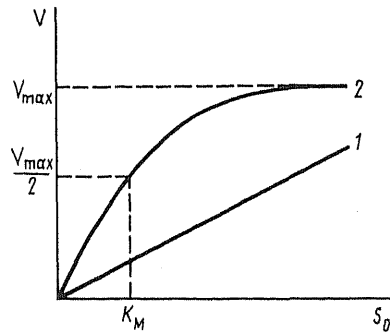


Рис. 3.5. Зависимость начальной скорости ( $V$ ) поступления субстрата в клетку от его внешней концентрации ( $S_o$ ):

1 — физическая диффузия; 2 — транспортный процесс с участием переносчика (показано определение параметров  $V_{max}$  и  $K_m$ )

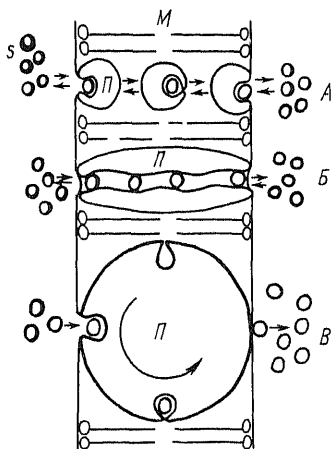


Рис. 3.6. Основные модели опосредованного транспорта субстратов. А — «подвижный» переносчик; Б — трансмембранный канал; В — конформационная транслокация:

М — мембрана, П — переносчик, S — субстрат

(рис. 3.6, А). По этому типу осуществляется например, транспорт ионов, некоторыми ионофорами (валиномицином, моненсином и др.).

Хотя в простейшем виде эта модель вызвала ряд замечаний, связанных с трудностью объяснения некоторых кинетических особенностей транспортных процессов, термин «переносчик» сохранился и употребляется наряду с термином *пермеаза*, предложенным на генетической основе, для обозначения интегрального мембранного компонента, кодируемого специальным структурным геном и предназначенного для транслокации субстрата.

Вторая в значительной степени альтернативная модель предполагает наличие в мембране гидрофильного «канала», через который могут проникать гидрофильные субстраты. Однако в отличие от малоспецифичного канала, образуемого поринами во внешней мембране, стереоспецифичность транслокации субстратов через цитоплазматическую мембрану, вероятно, может достигаться путем «эстафетной» передачи молекул субстрата от одной функциональной группы, «выстилающей» внутреннюю поверхность канала, к другой. Высказывалось также предположение, что субстрат как ключ открывает предназначенный для него канал и т. д. (рис. 6, Б). Такой гидрофильный канал может обеспечить концентрирование субстрата в клетке.

Третья модель, которую можно рассматривать как комбинацию первых двух, позволяет использовать их положительные стороны. В ней предполагается наличие гидрофобного мембранного переносчика, который путем конформационных изменений, вызываемых субстратом, «протаскивает» последний с внешней стороны мембраны на ее внутреннюю сторону. Одним из упрощенных вариантов последней модели может служить представление о переносчике как о трансмембранном «колесе», вращающемся в мембране и захватывающем субстрат на ее внешней стороне. Образующийся гидрофобный комплекс распадается на внутренней стороне мембраны (рис. 3.6, В).

В действительности в состав мембранных транспортных систем часто входит более одного белкового посредника, причем между ними может существовать разделение функций, а сами переносчики организованы в виде мультимеров (по крайней мере, димеров).

Оказалось, что из клеток грамотрицательных бактерий, подвергнутых на холоду осмотическому шоку (быстрому переносу из гипертонической среды в гипотоническую в присутствии ЭДТА), освобождается ряд периплазматических ферментов и наряду с ними белки, способные активно связывать некоторые субстраты, образуя с ними прочные комплексы с константами диссоциации, близкими к величинам  $K_m$ , для соответствующих транспортных систем. Одновременно с освобождением периплазматических белков нарушается транспорт этих субстратов в клетки бактерий, а добавление «шоковой» жидкости или очищенных *связывающих* белков в некоторых случаях восстанавливает нормальный транспортный процесс. Синтез связывающих белков индуцируется параллельно с индукцией транспортной системы, а у мутантов, дефектных по транспорту, соответствующие связывающие белки отсутствуют. Таким образом, участие связывающих белков в транспорте не вызывает сомнений.

Однако связывающие белки не могут выполнять функции переносчиков, так как они являются гидрофильными периферическими белками, а не интегральными компонентами мембраны. Их роль, по-видимому, заключается в «узнавании» субстрата, концентрировании его на внешней поверхности мембраны и последующей передаче компоненту, осуществляющему транслокацию субстрата через мембрану.

Связывающие белки могут принимать участие в хемотаксисе, где они, по-видимому, также выполняют функцию «узнавания». В настоящее время выделены белки, участвующие в связывании (и транспорте) ряда аминокислот, сахаров, карбоновых кислот и неорганических ионов в клетках грамотрицательных бактерий, грибов и животных.

Таким образом, можно представить два основных типа транспортных систем. В состав систем первого типа входят 2—3 белковых посредника, из которых один является истинным транслокатором (переносчиком), а другие, располагаясь на внешней и внутренней поверхности мембраны, определяют специфичность транспорта и способы его регуляции.

В моделях транспортных систем второго типа можно ограничиться лишь одним белковым посредником, однако обязательным свойством его должна быть сложность четвертичной структуры (мультимерность), приводящая к появлению аллостерических свойств, определяющих возможность гомотропных и гетеротропных кооперативных взаимодействий с субстратом и эффекторами. Такие переносчики, как правило, осуществляют так называемый симпорт, т. е. одновременную транслокацию субстрата и эффекторов, в качестве которых чаще всего выступают одновалентные неорганические катионы ( $H^+$  или  $Na^+$ ). Подробнее об их участии в транспортных процессах будет идти речь в следующем разделе.

Необходимо обратить внимание на то, что структурная дивергенция транспортных систем коррелирует с их специализа-

цией в отношении источника энергии, используемого для концентрирования субстрата в клетках. Системы, включающие «связывающие» белки, преимущественно используют АТФ (или близкие к нему интермедиаты), тогда как энергизация транспортных систем второго рода осуществляется за счет трансмембранного электрохимического потенциала.

**Энергетика транспортных процессов.** Концентрирование веществ внутри клеток требует затраты энергии, создания своего рода «энергетического привода», который превращает равновесный процесс «облегченной» диффузии в одновекторный процесс «активного» транспорта. Сопряжение транслокации субстрата с энергией метаболизма может осуществляться двумя основными путями.

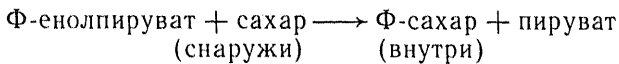
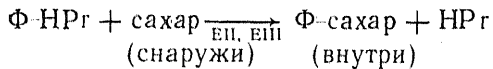
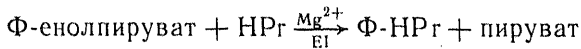
В первом случае энергия затрачивается на такую химическую модификацию *субстрата* в процессе транслокации, которая делает его не способным как взаимодействовать с переносчиком, так и проникать через мембрану диффузионным путем, поэтому продукт модификации субстрата накапливается в клетке. Следовательно, транспорт вещества непосредственно связан с первыми этапами его метаболизма. Транспортные системы такого типа получили название систем «переноса радикалов» или «векторного метаболизма». У микроорганизмов наиболее изучены три типа таких систем, с помощью которых осуществляется транспорт сахаров и сахароспиртов (фосфотрансферазная система или система векторного фосфорилирования, источник энергии фосфоенолпируват — ФЕП), органических кислот (система векторного ацилирования, источник энергии тиюэфирная связь ацил-КоА), пуринов и пиримидинов (система векторного фосфорибозилирования, источник энергии фосфорибозилпирофосфат).

Во втором случае энергия затрачивается на такую модификацию *переносчика* в процессе транслокации, которая затрудняет или делает невозможной обратную транслокацию субстрата из клетки. В этом случае источником энергии для транспортных систем, содержащих связывающие белки (первичный активный транспорт), может служить АТФ (или родственный макроэрг) либо трансмембранный электрохимический потенциал (вторичный активный транспорт).

Фосфотрансферазная система (ФТС) широко распространена у многих прокариот, главным образом факультативных анаэробов, обладающих достаточным эндогенным ресурсом ФЕП, за счет сбраживания сахаров по пути Эмбдена — Мейергофа, но не обнаружена у эукариот.

В переносе фосфорильного остатка с ФЕП на сахар с образованием фосфорного эфира по шестому (иногда по первому) атому углерода молекулы сахара участвует ряд белковых посредников.

Последовательность протекающих реакций можно записать следующим образом:



Фермент I (EI) и низкомолекулярный белок НРГ — цитоплазматические компоненты, кодируемые соответственно генами *ptsI* и *ptsH* специального *pts*-оперона *E. coli*. Хотя синтез этих белков, как правило, протекает конститутивно, в присутствии углеводных субстратов, их образование может стимулироваться в 3—4 раза. В процессе переноса фосфорила на НРГ промежуточно образуется фосфорилированная форма EI. «Узнающим» компонентом ФТС является фермент II (EII), интегральный мембранный белок, по-видимому, осуществляющий транслокацию сахаров и катализирующий их фосфорилирование при участии фосфорилированной формы периферического фермента III (EIII) (см. также рис. 3.8). EII и EIII специфичны к углеводным субстратам ФТС, и их синтез обычно индуцируется этими субстратами.

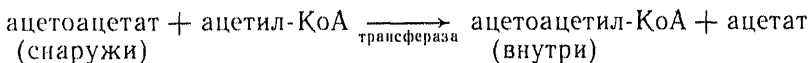
Есть указания на то, что в некоторых случаях EII способен осуществлять «облегченную» диффузию сахаров в отсутствие их фосфорилирования.

Функционирование ФТС является необходимым условием проявления катаболитной репрессии в присутствии глюкозы (см. раздел о регуляции транспортных процессов).

Транспорт жирных кислот в клетки прокариот осуществляется двумя основными системами, выбор которых определяется длиной углеводной цепи жирной кислоты.

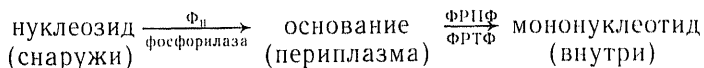
Длинноцепочечные жирные кислоты ( $C_8$  и более) индуцируют у *E. coli* собственную транспортную систему. Их транспорт сопровождается образованием ацил-КоА. Мутанты, дефектные по ацил-КоА-синтетазам (КФ 6.2.1.3), утрачивают способность к транспорту этих кислот, а мутанты с дефектом ферментов деградации жирных кислот: тиолазы (КФ 2.3.1.9),  $\beta$ -оксиацил-КоА-дегидрогеназы (КФ 1.1.1.35) и др. — обнаруживают снижение скорости транспорта.

У короткоцепочечных жирных кислот ключевым ферментом транспортного процесса, по-видимому, служит КоА-трансфераза; например, в транспорте масляной (или ацетоуксусной) кислоты:



Для транспорта свободных пуриновых и пиримидиновых оснований у ряда микроорганизмов используется система векторного фосфорилирования при использовании фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ). В этом случае в процессе транслокации основание превращается в мононуклеотид при участии фосфорибозилтрансферазы (ФРТФ). В случае транспорта нуклеозидов у

грамотрицательных бактерий первым этапом является проникновение через внешнюю мембрану с помощью специальной транспортной системы, причем одновременно осуществляется фосфорилирование нуклеозида. Затем свободное основание может поступать в клетку через посредство системы векторного фосфорилирования:



Положение осложняется наличием многочисленных систем «активного» транспорта свободных оснований без их химической модификации, а также строгой регуляцией транспорта, например путем репрессии. Поэтому во многих случаях отсутствуют однозначные убедительные данные о природе транспортного механизма, включающего в транслокацию пуриновых и пиримидиновых оснований у конкретных микроорганизмов.

Системы «первичного» активного транспорта, в которых энергия, освобождающаяся при гидролизе АТФ (или родственного макроэрга), используется для переноса субстратов через клеточную мембрану против градиента их концентрации, широко распространены в животных, растительных и бактериальных клетках (примерами служат  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза саркоплазматического ретикулула,  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФаза животных клеток,  $\text{H}^+$ -АТФаза бактериальных клеток). Правда, чаще всего такие системы используются для создания первичного градиента неорганических катионов. Энергия, обусловленная этим градиентом, в дальнейшем может использоваться на различные (в том числе транспортные) нужды клетки.

Однако функции ряда АТФ-зависимых систем состоят непосредственно в активном транспорте и аккумуляции в клетках тех или иных субстратов. Так, поглощение ионов  $\text{K}^+$  клетками *E. coli* осуществляется АТФ-зависимой Kdp-системой, позволяющей эффективно концентрировать ионы  $\text{K}^+$  (до уровня, превышающего 0,1 М) в клетках даже при очень низком содержании этих ионов в среде (менее  $10^{-4}$  М). У *Streptococcus faecalis* существует АТФ-зависимая система удаления из клеток ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . В ряде случаев бактерии осуществляют АТФ-зависимый транспорт и других электролитов, а также неэлектролитов.

К сожалению, данные о природе источника энергии, используемого для транспорта того или иного субстрата, основаны чаще всего на ингибиторном анализе, а поэтому не всегда могут быть поняты однозначно. Тем не менее достаточно общим правилом является корреляция между участием в транспортном процессе «связывающих» белков, о которых уже было сказано ранее, и использованием в этом процессе в качестве источника энергии АТФ или родственного макроэрга. Такие транспортные системы получили название «систем, чувствительных к осмотическому шоку». К подобным транспортным системам у *E. coli* можно отнести системы транспорта ряда углеводов (арабинозы,



мальтозы, рибозы, ксилозы,  $\beta$ -метилгалактозы), а также аминокислот (аргинина, метионина, гистидина, глутамина, орнитина, диаминопимелиновой кислоты).

Значительно чаще у микроорганизмов встречаются системы «вторичного» активного транспорта, в случае которых для переноса субстратов через клеточную мембрану против концентрационного градиента используется энергия, обусловленная первичным градиентом ионов  $H^+$  или других катионов.

Возможность запасаения энергии в процессе дыхания в виде градиента ионов  $H^+$  постулирована Лундегардом еще в 1945 г., а в 1961 г. Митчелл сформулировал на этой основе хемиосмотическую теорию сопряжения. В настоящее время экспериментально доказано, что у микроорганизмов градиент ионов  $H^+$  через клеточные мембраны может создаваться либо непосредственно за счет энергии окисления (в процессе дыхания) и световой энергии (в процессе фотосинтеза), либо опосредованно с использованием АТФ, образованной путем субстратного фосфорилирования и утилизируемой мембранной  $H^+$ -АТФазой (а у ряда прокариот еще и за счет обращения трансгидрогеназной реакции).

При этом возникает трансмембранный электрохимический потенциал (ТЭП) или «протон-движущая сила», величина которой определяется уравнением

$$\Delta\mu_{H^+} = F \cdot \Delta\psi - 2,3RT \cdot \Delta pH,$$

где  $\Delta\mu_{H^+}$  — ТЭП;  $F$  — постоянная Фарадея;  $\Delta\psi$  — электрический трансмембранный потенциал,  $R$  — газовая постоянная;  $T$  — абсолютная температура.

Это уравнение можно переписать в виде

$$\frac{\Delta\mu_{H^+}}{F} = \Delta\psi - \frac{2,3RT}{F} \Delta pH,$$

или

$$\Delta p = \Delta\psi - Z\Delta pH.$$

При 37 °С величина  $Z$  приблизительно равна 60 мВ.

Энергия, запасенная в ТЭП, может далее использоваться для синтеза АТФ или непосредственно на транспортные и другие нужды клетки, например как «топливо» в двигательном аппарате клетки.

В ряде случаев первичный градиент ионов  $H^+$  преобразуется в градиент других катионов, например  $Na^+$ , в результате функционирования  $Na^+/H^+$ -«насосов» (мембранных транслокаторов), осуществляющих обмен  $H^+$  и  $Na^+$ :

$$\Delta p = \Delta\psi - Z\Delta pNa.$$

Электрический градиент ионов  $Na^+$  может создаваться и прямым путем в процессе работы  $Na^+$ -насосов, например бактериальной оксалоацетатдекарбоксилазы (у *Klebsiella aerogenes*) или дыхательной цепи (у некоторых морских бактерий).

Поскольку при формировании ТЭП внутри клеток создается избыток отрицательных зарядов, положительно заряженные молекулы субстратов (или их комплексы с переносчиками) могут двигаться по градиенту электрической составляющей ( $\Delta\psi$ ) ТЭП и проникать через мембрану путем «электрофореза» (*унипорта*). В случае отрицательно заряженных субстратов для осуществления транспорта необходим обмен на эквивалентное количество внутриклеточных анионов (*антипорт*) или перенос в клетку совместно с внеклеточными катионами ( $H^+$  или  $Na^+$ ) по концентрационной составляющей ТЭП ( $\Delta pH$  или  $\Delta pNa$ ); последний случай получил название *симпорт*.

Транспортные системы, зависящие от ТЭП, как правило, не содержат «связывающих» белков и сохраняют активность в модельных субклеточных мембранных системах (везикулах и липосомах), получаемых после лизиса сферо- и протопластов или путем реконструкции мембранных структур; они получили название «мембранно-связанных систем».

У *E. coli* к системам симпорта относятся транспортные системы лактозы и дикарбоновых кислот (симпорт с ионами  $H^+$ ), глутамата и мелибиозы (симпорт с ионами  $Na^+$ ). Системы симпорта органических субстратов с катионами обнаружены у ряда других микроорганизмов. Наиболее подробно изучены системы симпорта с  $Na^+$  аминокислот у *Halobacterium halobium* и дикарбоновых кислот у фототрофных пурпурных бактерий.

**Регуляция транспортных процессов.** Регуляция процессов транспорта, как и регуляция процессов внутриклеточного метаболизма, осуществляется на двух уровнях: на уровне биосинтеза белковых посредников (переносчиков) и на уровне функционирования готовых посредников.

Основными механизмами регуляции биосинтеза переносчиков транспортных систем являются индукция, репрессия и катаболитная репрессия (см. раздел о регуляции процессов транскрипции). Уровень регуляции трансляции в процессе биосинтеза белковых компонентов транспортных систем практически не изучен.

Как и в случае ферментов, по типу индукции и катаболитной репрессии регулируется биосинтез компонентов тех транспортных систем, субстраты которых участвуют в процессах катаболизма. В первую очередь это относится к транспортным системам углеводов и органических (ди- и трикарбоновых) кислот. По типу репрессии избытком субстрата регулируется биосинтез главным образом аминокислотных транспортных систем.

Картина регуляторных событий осложняется тем обстоятельством, что у микроорганизмов для одного и того же субстрата часто используется несколько транспортных систем, отличающихся по кинетическим параметрам. При этом часть систем обладает узкой специфичностью и предназначена для группы субстратов (иногда для единственного субстрата), близких по химическому строению, а часть систем обладает более широкой субстратной специфичностью.

Например, у *E. coli* существует по крайней мере 12 типов транспортных систем аминокислот, причем узкоспецифичные транспортные системы часто обладают более высоким сродством к субстрату, чем системы с широкой специфичностью. Например, сродство к аланину транспортной системы, общей для аланина и глицина, характеризуется  $K_m = 27$  мкМ, а сродство к аланину узкоспецифичной системы характеризуется  $K_m = 2$  мкМ.

Сходная ситуация существует в случае транспортных систем углеводов и  $C_4$ -дикарбоновых кислот.

Оказалось, что молекулярные механизмы индукции ряда транспортных систем отличаются от механизмов индукции ферментов *lac*-оперона и других регулонов, так как активным является только *внеклеточный* индуктор. Даже очень высокий внутриклеточный уровень индуктора в этих случаях оказывается неэффективным. Например, выращивание в присутствии глюкозы двойного мутанта *E. coli* с дефектами глюкозофосфатизомеразы (КФ 5.3.1.9) и глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназы (КФ 1.1.1.49), препятствующими метаболическим превращениям глюкозо-6-фосфата, приводит к тому, что внутриклеточное содержание последнего достигает 60 мМ, однако индукции транспортной системы гексозофосфатов при этом не наблюдается. Напротив, добавления во внешнюю среду всего лишь 0,5 мМ глюкозо-6-фосфата оказывается достаточным для индукции данной транспортной системы.

Как установлено в настоящее время, кроме транспортной системы гексозофосфатов у *E. coli* индукция *внеклеточным* субстратом характерна еще для ряда транспортных систем: систем транспорта фосфоглицерата и трикарбоновых кислот у *Salmonella typhimurium*, а также для белковых компонентов фосфотрансферазной системы транспорта углеводов (ферменты I, II и НРг).

Наглядное представление о возможных молекулярных механизмах индукции *внеклеточным* индуктором дает рис. 3.7.

Эта модель предполагает наличие дополнительного (кроме репрессора) регуляторного белка (МРБ), имеющего трансмембранную ориентацию и способного подвергаться конформационному переходу при присоединении субстрата на внешней стороне клеточной мембраны. В результате такого перехода регуляторный белок должен приобретать сродство к репрессору и способность связывать его на внутренней поверхности клеточной мембраны. Связывание репрессора белком МРБ должно приводить к освобождению оператора генетического локуса, кодирующего белковый компонент транспортной системы, что вызывает индукцию транскрипции этого локуса.

Рассматривая потенциальные возможности регуляции активности уже сформированных транспортных систем в ходе их функционирования, следует остановиться на двух основных случаях.

В первом случае регуляция активности белковых посредни-

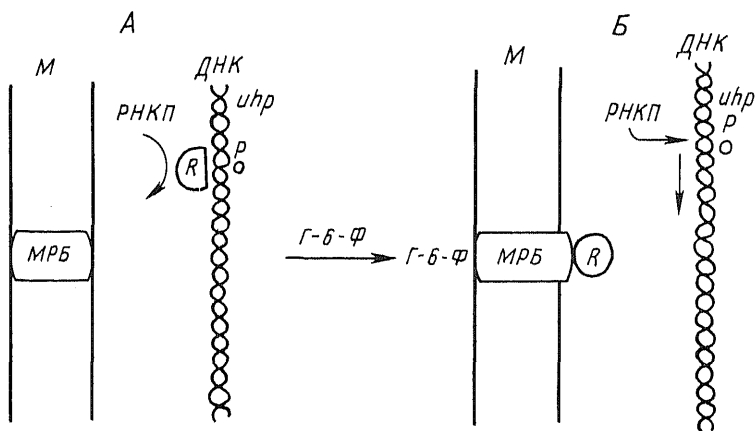


Рис. 3.7. Схема экзогенной индукции транспортной системы гексозофосфатов (локус *uhp*) (по Dills et al., 1980). А — в отсутствие внеклеточного индуктора (транскрипция блокирована); Б — в присутствии внеклеточного индуктора:

М — мембрана, Р — промотор, О — оператор, МРБ — мембранный регуляторный белок, Р — репрессор, Г-б-Ф — гексозофосфат

ков транспортных систем способна осуществляться путем их химической модификации. Примеры такого рода известны для транспортных систем эукариот: например, активность  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФазы изменяется путем фосфорилирования, а степень этого фосфорилирования определяется соотношением концентраций ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  внутри и вне клеток.

У прокариот транспорт сахаров регулируется фосфорилированием компонентов ФТС. Можно отметить, что регуляция этого типа не является достаточно «гибкой» и могла бы использоваться, как правило, для системной перестройки транспортных процессов (при клеточной дифференцировке и т. д.).

Значительно большее распространение получили случаи регуляции активности белковых посредников транспортных систем без их химической модификации.

Одним из способов такой регуляции может быть взаимодействие белковых переносчиков с липидными компонентами мембран. Косвенные физико-химические данные свидетельствуют в пользу существования специфического липидного окружения белковых компонентов транспортных систем, отличающегося по температуре фазового перехода от основной массы мембранных липидов. Показано также, что в некоторых случаях избирательное подавление синтеза мембранных липидов при продолжающемся синтезе белка приводит к формированию транспортных систем с резко сниженной активностью ( $\beta$ -галактозидпермеаза *E. coli* и др.).

Другим способом регуляции служит взаимодействие транспортных переносчиков с избытком субстрата (кооперативность

гомоторпная) или с другими эффекторами (кооперативность гетеротропная).

В тех случаях, когда эффектор взаимодействует с транспортом субстрата, находясь на той же стороне мембраны, что и субстрат, имеет место *цис-регуляция*, а когда это взаимодействие осуществляется по разные стороны мембраны, — *транс-регуляция* транспортных процессов.

Одним из примеров цис-эффектов служит конкуренция сходных в химической отношении субстратов за общий переносчик, в результате которой преимущество при транспорте получает тот субстрат, который обладает наибольшим сродством к переносчику.

Иногда наблюдается отрицательная цис-кооперативность во взаимодействии субстрата с переносчиком, в результате которой избыток субстрата подавляет собственный транспорт в клетку (пролин у *E. coli*).

Аналогичные по характеру транс-эффекты обнаружены в случае аминокислот, которые, накапливаясь в клетках микроскопических грибов, могут подавлять свой транспорт из внешней среды, а также для сахарофосфатов, подавляющих транспорт сахаров в клетки бактерий.

Наконец, важным, но пока мало изученным способом регуляции активности транспортных переносчиков является воздействие трансмембранного электрохимического потенциала, который может играть не только энергетическую, но и регуляторную роль в транспортных процессах, изменяя величину сродства переносчиков к транспортируемому субстратам.

Примером может служить «запирающий эффект» в случае  $H^+$ -АТФазы *Streptococcus lactis*, когда транспорт протонов начинается лишь после достижения порогового уровня ТЭП. Напротив, у *Salmonella typhimurum* от величины ТЭП зависит максимальная скорость (а не  $K_m$ ) транспорта цитрата.

Красноречивым свидетельством важности последствий регуляторных событий, разыгрывающихся на уровне транспортных процессов, для клеточного метаболизма в целом является недавно расшифрованный механизм катаболитной репрессии, точнее та его сторона, которая непосредственно связана с управлением внутриклеточным уровнем циклического АМФ. Оказалось, что регуляция уровня цАМФ у *E. coli* облигатно зависит от целостности и функционирования фосфотрансферазной системы транспорта глюкозы.

Объяснение этой зависимости основано на постулировании существования регуляторного белка, который по крайней мере в некоторых случаях идентичен ферменту III (EIII) ФТС, способному акцептировать фосфорильный остаток от Ф-НРг (рис. 3.8), а может представлять собой собственно галактозидпермеазу.

В отсутствие глюкозы все компоненты ФТФ, в том числе EIII, находятся в фосфорилированной форме за счет резерва эндогенного ФЕП. Фосфорилированный EIII, взаимодействуя с аденилатциклазой, переводит ее в активное состояние, в результате чего

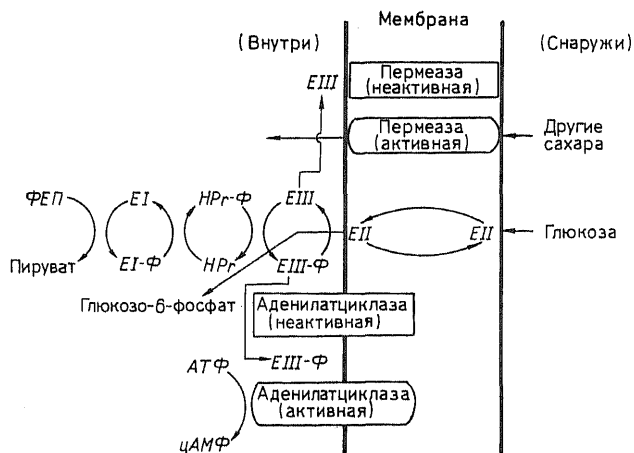


Рис. 3.8. Роль фосфотрансферной системы в катаболитной репрессии (пояснения в тексте)

внутриклеточный уровень цАМФ повышается и активируются транскрипция «слабых» оперонов и формирование транспортных систем других сахаров.

Напротив, в присутствии глюкозы степень фосфорилирования EIII снижается в связи с расходом фосфорильных остатков на фосфорилирование глюкозы в процессе ее транспорта через ФТФ, в результате чего уменьшается активность аденилатциклазы.

Кроме того, как полагают, нефосфорилированная форма EIII способна взаимодействовать с пермеазами других сахаров и инактивировать их.

Таким образом, в результате транспорта глюкозы не только снижается внутриклеточный уровень цАМФ и блокируется транскрипция «слабых» регулонов, но и прямо подавляется транспорт других сахаров. В результате всех этих событий и наступает состояние катаболитной репрессии.

### 3.4.2. Регуляция клеточного деления

**Общая характеристика процесса клеточного деления.** Наибольшие успехи в расшифровке механизмов регуляции клеточного деления достигнуты при молекулярно-биологических исследованиях палочковидных и кокковидных бактерий.

Следует отметить, что процесс клеточного роста и деления включает определенный набор событий:

- 1) накопление «критической» клеточной массы (объема), индуцирующей деление;
- 2) репликация ДНК генома;
- 3) построение новой клеточной оболочки (клеточной стенки и цитоплазматической мембраны), обеспечивающее рост клетки;

- 4) построение клеточной перегородки — собственно деление;
- 5) расхождение дочерних клеток.

Некоторые из этих событий протекают одновременно (параллельно), другие совершаются последовательно; наконец, некоторые из них вообще могут отсутствовать у данного микроорганизма. Например, деление клеток может осуществляться без участия клеточной стенки, как это имеет место у микроорганизмов порядка *Mycoplasmatales*, L-форм и протопластов некоторых бактерий; может отсутствовать этап расхождения дочерних клеток (*Streptococcales*, *Sarcina*, нитчатых форм и образующих трихомы и др.).

Регуляция клеточного деления осуществляется на двух уровнях: путем регуляции каждого из перечисленных процессов и путем организации их взаимодействия. Кратко остановимся на каждом из этих уровней.

#### **Накопление критической клеточной массы и репликация ДНК.**

Эти процессы являются подготовительными этапами к процессу собственно деления клетки. Механизмы регуляции биосинтеза макромолекулярных клеточных компонентов, составляющих основную часть биомассы, уже рассматривались в предыдущих разделах. Следует отметить, что хотя в различных условиях размер клеток (а следовательно, и пороговая биомасса) у данного организма может варьировать, в стандартных условиях этот признак достаточно стабилен и даже имеет определенное таксономическое значение. Таким образом, существуют специальные механизмы, включающие процесс деления клетки при накоплении критической (пороговой) биомассы.

**Построение новой клеточной оболочки.** При рассмотрении образования мембраны и клеточной стенки *de novo* следует различать *пролиферацию* данных клеточных структур, т. е. динамику накопления в них нового материала на протяжении клеточного цикла, и *сегрегацию* поверхностных структур, т. е. способ включения нового материала в предсуществующие структуры (локализацию соответствующих центров, или сайтов, включения новых фрагментов).

Изучение пролиферации поверхностных структур требует, как правило, применения синхронизированных культур микроорганизмов, а также использования равновесного (в течение длительного срока) и импульсного (на короткий срок) введения меченых предшественников (для мембранных белков — аминокислот; для мембранных липидов — глицерина или жирных кислот; для мукопептида клеточной стенки — N-ацетилглюкозамина, а также диаминопимелиновой кислоты).

Этими методами было установлено, что включение белков в мембрану *E. coli* и *Bac. subtilis* следует сложной кинетике, свидетельствующей о запасании предобразованных белков в цитоплазме в период подготовки клеточного деления и быстрой их мобилизации в процессе деления. К значению этого явления мы вернемся в разделе, посвященном взаимодействию процессов метаболизма при построении клеточной перегородки.

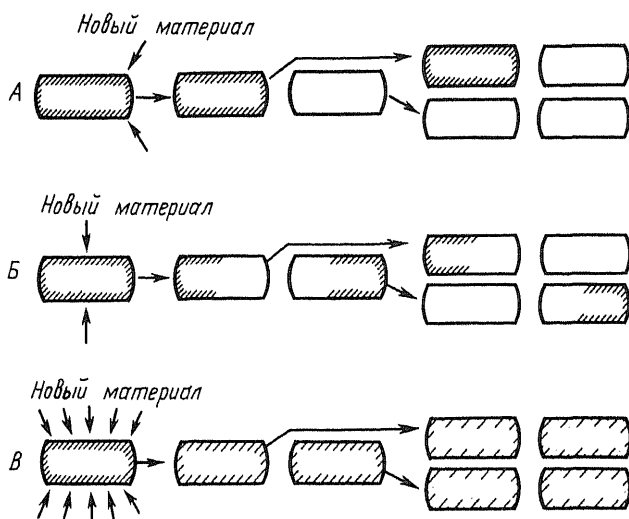


Рис. 3.9. Основные типы сегрегации поверхностных структур у прокариот. А — консервативный; Б — полуконсервативный; В — дисперсивный. Штриховкой показано распределение маркеров

В период деления возрастает активность некоторых литических ферментов (в частности, муреингидролаз), участвующих в образовании брешей в предсуществующем каркасе клеточной стенки, необходимых для включения новых ее фрагментов. Таким образом, регуляция активности этих ферментов осуществляется путем перевода их в скрытое, латентное состояние с последующей мобилизацией в определенный момент времени.

Изучение способов сегрегации поверхностных слоев осуществляется методом введения в эти структуры меченых предшественников с последующим прослеживанием их судьбы через несколько поколений после переноса клеток в среду, не содержащую метки (pulse-chase — эксперименты). Другой метод — прослеживание образования определенных компонентов поверхностных структур после их индукции с целью выявления распределения на поверхности клетки новообразованных участков. В этом случае вместо меченых предшественников удобно использовать специфические маркеры клеточной стенки (рецепторы фагов, колицинов, а также «матриксные» белки) или цитоплазматической мембраны (интегральные мембранные ферменты), а также такие общие маркеры, как жгутики.

При рассмотрении сегрегации поверхностных структур можно представить три основных способа локализации сайтов включения предшественников (рис. 3.9).

При консервативном механизме сегрегации включение новых фрагментов должно осуществляться на одном из полюсов клетки, при этом поверхностные слои всех дочерних клеток состоят из ново-



образованного материала. Такой способ сегрегации при обычном клеточном делении, по-видимому, не реализуется на практике и его осуществление можно ожидать лишь в процессе почкования, характерного для некоторых микроорганизмов.

*Полуконсервативный* механизм сегрегации предполагает локализацию сайтов включения новых фрагментов в экваториальной зоне клетки. Это также должно приводить к появлению дочерних клеток с полностью новообразованными поверхностными структурами, но лишь при второй генерации после начала наблюдения.

Наконец, при *дисперсивном* способе сегрегации включение новых фрагментов должно происходить во множестве сайтов по всей поверхности клетки, что приводило бы к постепенному «разбавлению» старых структур новыми и равномерному распределению маркеров на поверхности дочерних клеток.

Вопрос о механизме сегрегации поверхностных слоев более или менее однозначно решен лишь для кокковидных форм бактерий, для которых разные методы дают сходную картину, указывающую на реализацию полуконсервативного способа сегрегации. Для палочковидных форм бактерий сведения о способе сегрегации имеют противоречивый характер.

Результаты, полученные при изучении расхождения поверхностных маркеров (фаговых рецепторов, жгутиков) у температурочувствительных (*ts*) мутантов *E. coli* и *Bac. subtilis*, лучше всего соответствуют представлениям о полуконсервативном способе сегрегации, однако данные о разбавлении меток свидетельствуют в пользу дисперсивного механизма. Возможно, что мутации, приводящие к температурочувствительности синтеза маркеров клеточной поверхности, некоторым образом влияют и на способ сегрегации поверхностных слоев при повышенной температуре.

Однозначное установление локализации мест включения мембранных компонентов затрудняется их значительной латеральной (в плоскости мембраны) подвижностью, составляющей, например, для липополисахарида наружной мембраны *E. coli* около 1 мкм за 25 с. Кроме того, способ сегрегации мембраны может определяться скоростью роста микроорганизма: у медленно растущих клеток *E. coli* он близок к биполярному, а у быстро растущих клеток становится дисперсивным.

**Построение клеточной перегородки.** Данный этап завершает клеточный цикл. В раскрытии механизмов регуляции этого цикла важный вклад внесло изучение специфических мутантов, из которых наибольшую ценность представляют «условные» мутанты. У мутантов данного типа процесс протекает нормально при обычных физиологических условиях (пермиссивных условиях), а при непермиссивных условиях (повышенная температура, действие радиации) процесс подавляется. Иногда мутация приводит к появлению зависимости клеточного деления от дополнительных факторов, например, *god<sup>-</sup>*-мутанты *Bac. subtilis* и *Bac. licheniformis* на обычных средах в процессе роста образуют нити из кокковидных тел

разной величины, а в присутствии 0,8 М NaCl восстанавливают нормальный способ деления и палочковидную форму.

Большое значение для изучения регуляции процесса построения клеточной перегородки имело использование мутантов *E. coli* и *Vac. subtilis*, образующих «миниклетки» (min-мутанты). Миниклетки возникают на полюсах нормальных клеток, имеют небольшие размеры и не содержат хромосомной ДНК, но обладают аппаратами транскрипции и трансляции. Поэтому они могут быть использованы для изучения функционирования (захваченных из материнской клетки) плазмид, а также введенных извне искусственных генетических элементов, полученных методами генетической инженерии.

Однако этим значение миниклеток не исчерпывается, поскольку существование min-мутаций позволило определить, что сайт, ответственный за образование перегородки и локализуемый в процессе деления в экваториальной зоне клетки, сохраняется на полюсах дочерних клеток при последующем их расхождении. В норме сайты построения перегородки, локализованные на полюсах клетки, выключаются (блокируются) и могут функционировать наряду с экваториальными сайтами лишь у min-мутантов.

Оказалось, что хотя в любой из клеток min-мутанта существуют два типа функционально активных сайтов построения перегородки, в течение клеточного цикла срабатывает лишь один из них. Это обстоятельство позволяет постулировать существование определенного компонента — *активатора* сборки клеточной перегородки. По-видимому, на протяжении клеточного цикла образуется ограниченное количество («квант») этого активатора, достаточное для функционирования лишь одного сайта (при этом активатор, по-видимому, полностью расходуется).

В нормальных клетках количество «квантов» активатора и количество функционирующих сайтов построения перегородки совпадает, а у min-мутантов количество сайтов превышает количество «квантов» активатора.

**Взаимосвязь процессов накопления критической массы, репликации ДНК и сборки клеточной перегородки.** При организации взаимодействия указанных процессов устанавливается определенная их последовательность. Очевидно, в норме репликация ДНК должна завершаться до построения клеточной перегородки, чтобы каждая из дочерних клеток получила полный набор генетических детерминант. Поэтому в процессе эволюции выработались определенные *сигналы* для запуска (инициации) ключевых процессов. Вскрытие регуляторных механизмов, управляющих делением клетки, в значительной степени состоит в расшифровке таких сигналов.

Оказалось, что между рассматриваемыми процессами не существует облигатно-реципрокной связи, при которой подавление одного из процессов тормозило бы другой, и наоборот. Например, у *Vac. subtilis* возможно построение перегородок и образование клеток нормального размера после подавления репликации ДНК

налидиксовой кислотой. В результате одна из дочерних клеток не содержит ДНК. Можно получить и обратную картину, если ингибировать построение клеточной перегородки низкими концентрациями пенициллина (у *E. coli* сайт построения перегородки более чувствителен к антибиотику, чем сайты, ответственные за пролиферацию клеточной стенки) или повышением температуры (в случае *ts*-мутантов). При этом рост клетки и репликация ДНК могут продолжаться, приводя к возникновению «многоядерных» нитей (филамент), но после удаления ингибитора они фрагментируются на соответствующее число нормальных клеток.

Эти результаты подтвердили тот факт, что сайты, ответственные за построение перегородки, строго локализованы в поверхностных структурах клетки, а количество перегородок пропорционально количеству удвоенной клеточной массы. В связи с этим было высказано предположение, что сигналом для инициации сборки клеточной перегородки в норме служит удвоение клеточной массы (объема).

Замечено, что клеточный цикл можно подразделить на несколько периодов. Так, для синхронной культуры *E. coli*, растущей на минимальной среде с глюкозой (время генерации около 60 мин), можно выделить два основных периода: С и D (рис. 3.10).

Период С занимает около 40 мин и фактически представляет собой время полной репликации хромосомы *E. coli*, которое мало зависит от скорости роста микроорганизма.

Период D занимает 20 мин. Это время между моментом завершения репликации ДНК и моментом окончательного формирования клеточной перегородки.

Иногда выделяют также период Т — время от появления первых признаков клеточной перегородки до завершения деления — сборки перегородки (около 5 мин).

Для нормального протекания клеточного цикла необходимо, чтобы в период С происходила не только репликация ДНК, но также синтез РНК и белка, так как ингибиторы транскрипции (рифампицин) и трансляции (хлорамфеникол), введенные в течение периода С, тормозят клеточное деление и увеличивают время генерации. Те же ингибиторы, введенные в период D, не тормозят клеточное деление, и оно завершается в нормальный срок. Таким образом, предшественники, необходимые для построения перегородки (мембранные белки), и другие белки, необходимые для за-

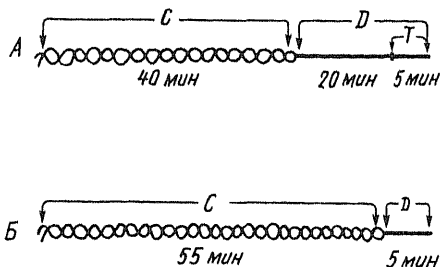


Рис. 3.10. Главные периоды клеточного цикла *Escherichia coli* (время генерации 60 мин). А — в норме; Б — после подавления репликации в течение 15 мин

вершения деления, синтезируются в период С и хранятся в резерве до начала сборки перегородки.

С другой стороны, если в период С репликацию ингибировать на время, не превышающее 15 мин, а затем быстро удалить ингибитор (налидиксовую кислоту), то клеточное деление завершается в нормальный срок. Следовательно, минимальная длительность периода D фактически равна 5 мин, т. е. периоду Т.

Очень важен вопрос о том, что же служит сигналом для сборки клеточной перегородки. Длительное время считали, что таким сигналом является терминация репликации ДНК. Однако рассмотренные нами свидетельства, указывающие на отсутствие облигатной связи между этими процессами, делают подобное заключение сомнительным.

Недавно установлено, что подавление сегрегации хромосомы после завершения ее репликации (период D) препятствует завершению клеточного цикла. Поэтому можно полагать, что для нормального построения клеточной перегородки должен быть освобожден от ДНК сайт, ответственный за сборку перегородки (сайт локализован в экваториальной части клеточной оболочки).

Следовательно, можно сделать вывод, что регуляторное взаимодействие между репликацией ДНК и построением клеточной перегородки ограничивается своеобразным правилом «вето» со стороны ДНК: если нарушен процесс нормальной сегрегации реплицированной ДНК и соответствующее место в экваториальной части клеточной мембраны оказывается занятым, то сборка клеточной перегородки не может быть осуществлена, и клеточное деление тормозится.

Формально в этом случае наблюдается строгая зависимость между репликацией ДНК и делением клетки.

### **3.5. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРИ УПРАВЛЕНИИ СКОРОСТЬЮ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ**

Проблема управления скоростью роста микроорганизмов — особый раздел микробиологии и биотехнологии. Часть вопросов, связанных с этой проблемой, освещается в соответствующих главах пособия.

В настоящем разделе мы остановимся на рассмотрении некоторых регуляторных механизмов, играющих важную роль в перестройке метаболизма микробной клетки в ответ на изменение состава питательной среды.

#### **3.5.1. Выявление «узких мест» в метаболизме клетки**

Скорость роста микроорганизмов — функция скоростей координированного биосинтеза всех компонентов биомассы и скорости клеточного деления — регулируется на многих этапах метаболизма. Однако в сложной сети биохимических реакций, где каждая из ячеек в определенных условиях может *лимитировать* об-

шую скорость процесса, удается выделить наиболее «слабое» звено, которое даже в оптимальных условиях роста остается «узким местом», лимитирующим скорость размножения клеток.

Выявление такого «узкого места» чрезвычайно важно для получения максимального выхода биомассы и ценных для человека продуктов метаболизма в случае использования микроорганизмов в биотехнологических процессах.

Рассмотрим последовательно значение для управления скоростью роста уровней регуляции метаболических процессов в соответствии со схемой (рис. 3.11).

Обычно скорость транспорта субстратов 7 более или менее точно сбалансирована со скоростью их метаболизма (для большинства сахаров и органических кислот), а иногда превышает ее (для аминокислот). В последнем случае в клетке формируется резерв (пул) субстратов, способный оказывать разнообразное, в том числе тормозящее, действие на метаболизм клетки, если отсутствует транс-регуляторное ингибирование транспорта этих субстратов из среды их внутриклеточным пулом.

При некоторых условиях транспорт оказывается лимитирующим этапом метаболизма; например, при дефиците в среде необходимых субстратов и кофакторов, в частности в случае микроорганизмов, не способных к синтезу данных веществ (ауксотрофы) или осуществляющих этот синтез с пониженной скоростью (брадитрофы).

Аналогичная ситуация создается при недостаточной эффективности транспортных систем («криптические» мутанты), даже при наличии избытка субстрата в среде.

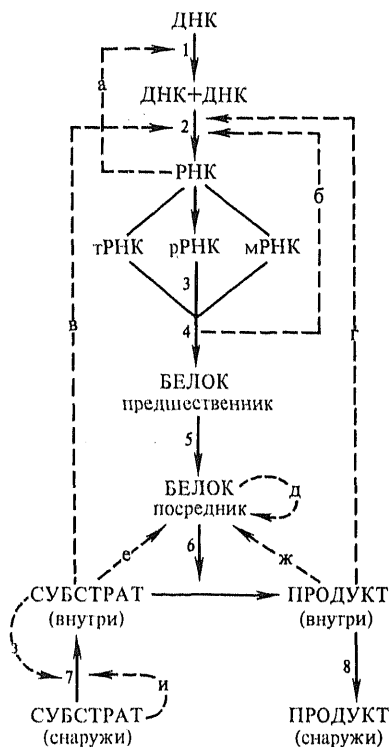


Рис. 3.11. Процессы метаболизма и их регуляция в прокариотной клетке:

1—5 — уровни регуляции биосинтеза белковых посредников (1 — репликация, 2 — транскрипция, 3 — сборка аппарата трансляции, 4 — трансляция, 5 — посттрансляционная модификация); а—г — основные механизмы регуляции (а — участие транскрипции в репликации (оРНК), б — воздействие транскрипции на транскрипцию (гуанозинполифосфаты и др.), в — индукция, г — репрессия); б—8 — уровни функционирования белковых посредников (б — ферментативная активность, 7 — транспорт субстратов, 8 — выделение продуктов); д—и — основные механизмы регуляции (д — обратимая ковалентная модификация, е — управление субстратом активностью ферментов, ж — управление продуктом активностью ферментов (аллостерическая регуляция), з — дис-управление транспортом, и — транс-управление транспортом).

На схеме не обозначено участие белков в процессах репликации, транскрипции, трансляции, транспорта и выделения веществ

Этап выделения продуктов 8 может лимитировать рост, если продукт обладает ингибиторным или отрицательным регуляторным действием на метаболизм. В этих случаях в клетке может вырабатываться специальный механизм (мембранный транспортный канал) для активного удаления указанных веществ.

В тех случаях, когда транспортный процесс становится «узким местом», лимитирующим общую скорость метаболизма, воздействие, активирующее транспортный процесс или избирательно повышающее проницаемость клеточной оболочки, может положительно влиять на скорость роста микроорганизма.

Этап функционирования ферментов 6 может оказаться рост-лимитирующим звеном метаболизма лишь при отсутствии в клетке необходимого количества фермента (либо у дефектных мутантов, у которых фермент малоактивен, хотя и синтезируется в большом количестве). В первом случае обычно включается механизм индукции синтеза фермента субстратом или происходит снятие репрессии, оказываемой конечным продуктом. Для конструктивных ферментов возможна также стимуляция на уровне трансляции. Только при недостаточной эффективности всех этих механизмов регуляции количество фермента может оказаться неадекватным условиям роста.

Процесс клеточного деления наиболее жестко регулируется на этапе сборки клеточной перегородки. Именно длительность этого этапа определяет теоретически возможное минимальное время генерации.

Что касается синтеза макромолекул, то этап репликации 1, по-видимому, не является обычно «узким местом» метаболизма, хотя скорость элонгации цепи ДНК — величина достаточно постоянная, составляющая примерно 2000 пар нуклеотидов в секунду (у *E. coli*), и мало зависит от условий роста (в оптимальной области концентраций предшественников). Объясняется это наличием специальной организации регуляторных механизмов, «настроенных» таким образом, что при улучшении условий повышается частота инициации новых циклов репликации ДНК. Поэтому если время генерации меньше, чем период репликации ДНК (у *E. coli* — 35—40 мин), то новые циклы репликации инициируются до завершения старых циклов и в быстро растущих клетках ДНК существует в виде сильно разветвленной структуры, соответствующей по общему количеству 3—6 эквивалентам хромосомы. При этом, очевидно, локусы, расположенные вблизи от точки начала репликации, присутствуют в клетке в значительно большем количестве копий, чем локусы, расположенные вблизи точки терминации, что также может оказывать регуляторное действие на скорость биосинтеза некоторых белков (эффект «дозы гена»).

Примерно аналогичная ситуация характерна и для процесса транскрипции 2, в котором скорость элонгации цепей РНК достаточно постоянна и составляет около 50—80 нуклеотидов в секунду, а увеличение общей скорости процесса достигается путем повышения частоты инициации (или снижения частоты терминации).

Скорость элонгации полипептидной цепи в процессе трансляции 4 также сравнительно мало зависит от условий среды, хотя в медленно растущих клетках скорость элонгации (10—12 аминокислот в секунду на рибосому) может быть в 1,5 раза ниже, чем в быстро растущих клетках (14—17 аминокислот в секунду на рибосому).

Основной способ повышения эффективности трансляции в быстро растущих клетках — увеличение скорости биосинтеза и сборки компонентов *аппарата* трансляции 3. По современным представлениям именно этот этап — одно из наиболее «узких мест» метаболизма, где концентрируются эффекты регуляторных механизмов управления скоростью роста, включающихся в ответ на сигналы, полученные из внешней среды. Этот вывод справедлив по крайней мере для прокариотных микроорганизмов, подобных *E. coli*, растущих с достаточно высокой скоростью и не обладающих сложным жизненным циклом.

О важной роли аппарата трансляции в регуляции скорости роста свидетельствуют следующие факты:

1) между содержанием рибосом (рРНК) и скоростью роста бактерий существует прямая пропорциональность;

2) при изменении условий выращивания, влияющих на скорость роста, в первую очередь изменяется скорость синтеза рРНК, а изменение скорости синтеза белка в основном определяется сдвигом в количестве функционирующих рибосом.

### 3.5.2. Связь скорости роста с биосинтезом стабильных форм РНК

Перенос клеток *E. coli* с минимальной среды на более богатую среду («эксперименты shift-up») сопровождается увеличением скорости биосинтеза рРНК и тРНК. Если на минимальной среде сумма рРНК + тРНК составляет 45—50 % от общей РНК, то при добавлении аминокислот эта величина возрастает до 70%, а затем снижается до 60—65%, что характерно для роста на богатой среде. Такое резкое увеличение скорости синтеза стабильных форм РНК обусловлено несколькими обстоятельствами.

Во-первых, происходит мобилизация имеющейся в клетке латентной РНК-полимеразы (РНКП), составляющей в медленно растущих клетках до 50% общего количества этого фермента.

Во-вторых, происходит переключение РНКП на преимущественную транскрипцию локусов рРНК и тРНК, в результате чего доля мРНК уменьшается (частично это связано с множественной репрессией определенных локусов на богатой среде), хотя общая скорость синтеза мРНК возрастает.

Транскрипция локусов рРНК усиливается за счет включения дополнительных промоторов и действия белковых активаторов транскрипции данных локусов. В результате всех этих событий количество рибосом в клетке увеличивается во много раз.

Однако иногда «вспышка» в биосинтезе белка предшествует на-

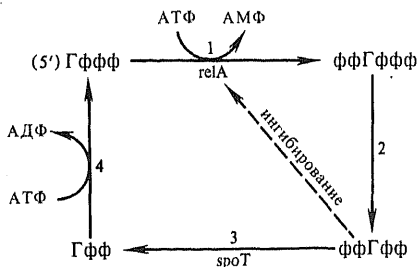


Рис. 3.12. Механизм образования гуанозинполифосфатов (пояснения в тексте)

сов мРНК рибосомных белков не подавляется при переносе на богатую среду, в результате их доля среди всех мРНК увеличивается.

Все эти события обеспечивают масштаб трансляции, достаточный для повышения скорости роста микроорганизма, адекватного составу питательной среды.

При обратном переносе с богатой среды на минимальную («эксперименты shift-down») включается эффективный регуляторный механизм, ограничивающий скорость транскрипции оперонов, кодирующих стабильные РНК, и в то же время иницируется синтез многих мРНК. Установлено, что решающую роль в этом случае играет накопление гуанозинполифосфатов, главным образом тетрафосфата (ффГфф), взаимодействующего с РНКП (рис. 3.12). Это взаимодействие изменяет специфичность РНКП и снижает ее активность. Кроме того, фффГфф оказывает ряд других регуляторных эффектов. При дефиците аминокислот, а также при лимитировании источников углерода и энергии в клетке накапливаются полифосфаты гуанина, образующиеся из ГТФ и АТФ. Реакция 1 (рис. 3.12) зависит от генетического локуса *relA* (ответственного за «строгий контроль», т. е. подавление биосинтеза рРНК при дефиците аминокислот) и осуществляется с участием белкового фактора (*stringent*-фактор), связывающегося с рибосомами и катализирующего синтез гуанозинпентафосфата при наличии мРНК и незаряженных тРНК. Пентафосфат достаточно быстро превращается в тетрафосфат (реакция 2). Реакция гидролиза тетрафосфата (реакция 3) зависит от генетического локуса *spoT* и подавляется при дефиците источников углерода и энергии. В свою очередь избыток фффГфф подавляет реакцию 1.

При накоплении в клетках *E. coli* 100—140 мкМ фффГфф синтез рРНК подавляется на 50%. К ингибиторному действию фффГфф чувствительна также транскрипция тРНК и мРНК для рибосомных белков, белковых факторов трансляции и  $\alpha$ -субъединиц РНКП.

Наряду с этими эффектами фффГфф активирует транскрипцию оперонов некоторых аминокислот (гистидина) и способствует

копленю заметных количеств рРНК. Это явление можно объяснить мобилизацией готовых рибосомных субчастиц, находящихся в клеточном пуле, а также некоторым увеличением скорости элонгации трансляции.

Следует отметить, что синтез мРНК, кодирующих рибосомные белки, регулируется независимо от синтеза рРНК. Транскрипция локу-



дерепрессии нитрогеназы, т. е. способствует снятию голодания по азоту.

В клетках эукариот роль, аналогичную роли ффГфф, играют другие полифосфаты.

### **3.5.3. Взаимосвязь регуляторных механизмов и их реализация в развивающихся микробных клетках**

Поддержание близких к оптимальным условий функционирования ферментных систем требует постоянства внутренней среды, в полной мере характерного лишь для многоклеточных организмов. Тем не менее микроорганизмы обладают замечательной способностью к *сбалансированному* росту, сохраняя более или менее стабильный общий химический состав на протяжении длительного времени.

С другой стороны, в связи со значительным варьированием химической природы доступных для микроорганизмов источников биогенных элементов и энергии в процессе роста микробной клетки ее ферментативный баланс подвержен чрезвычайно широким изменениям, в результате которых один и тот же фермент при определенных условиях может практически отсутствовать в клетках, а при других условиях его количество возрастает в сотни и тысячи раз. Такие изменения обычно адекватны природе используемых субстратов и обеспечивают оптимальную скорость размножения популяции.

В связи с отсутствием выраженной специализации клеток в популяции каждая микробная особь вынуждена выполнять сложные функции по обеспечению метаболических реакций необходимыми субстратами в оптимальных соотношениях.

В определенных экологических условиях единственным субстратом для микроорганизма может служить необычное или трудно утилизируемое соединение, что приводит к крайней узкой направленности метаболизма (или по крайней мере его первых этапов). В то же время микробная клетка должна сохранять потенциальную способность к быстрому переключению метаболических процессов при изменении условий среды. Лишь совокупность этих качеств обеспечивает микроорганизмам конкурентоспособность в современных биоценозах.

Реализация этих возможностей требует существования в микробных клетках мощного регуляторного аппарата, способного не только оперировать на каждом из метаболических уровней, но и осуществлять их взаимную координацию. В результате отдельные звенья метаболизма настолько точно «подогнаны» друг к другу, что в норме микробная клетка почти не образует избытка ни промежуточных, ни конечных продуктов метаболизма, а в среду в заметных количествах выделяются лишь такие «отбросы» энергетических процессов, как  $H_2O$ ,  $CO_2$ , некоторые кислоты и др.

Поэтому для получения с помощью микроорганизмов ценных для человека физиологически активных веществ обычно приходится использовать регуляторные мутанты с нарушениями координации регуляторных механизмов, возникающие спонтанно и отобранные путем сплошного скрининга, индуцированные искусственно с помощью мутагенов или, наконец, «сконструированные» методами генетической инженерии.

Взаимосвязь основных уровней регуляции в микробных клетках показана на схеме (см. рис. 3.11) пунктирными линиями. Представленные на схеме взаимоотношения являются не просто потенциальными возможностями регуляции, они оперируют в реальной микробной клетке в процессе ее роста и размножения. Наиболее убедительные данные об этом получены для прокариотных организмов.

Чувствительные методы гибридизации показывают, что при росте *E. coli* на минимальной среде транскрибируется почти вся информация (точнее 96%), содержащаяся в одной цепи ДНК, однако масштаб этой транскрипции для разных участков ДНК различен, что свидетельствует о разной степени репрессированности регулонов.

Таким образом, в развивающихся клетках *E. coli* механизмы индукции — репрессии оперируют достаточно широко.

При изменении окружающих условий кроме индукции (депрессии) или репрессии, наступающей в ответ на появление новых субстратов и продуктов, огромную роль играет взаимодействие процессов трансляции и транскрипции, протекающих соответственно уже рассмотренным механизмам. В медленно растущих клетках биосинтез компонентов аппарата трансляции ограничен, часть готовых рибосомных субчастиц переходит в пул, а около 50% РНКП находится в латентном состоянии. При возникновении условий для быстрого роста снижается уровень ффГфф и иницируется транскрипция оперонов рРНК и тРНК, активируется работа РНКП и мобилизуются резервы рибосомных субчастиц. В результате процесс трансляции начинает функционировать с максимальной скоростью.

К этому необходимо добавить, что существует строгая пространственная и временная координация процессов репликации и транскрипции, в результате чего возникает общий репликационно-транскрипционно-трансляционный комплекс, в котором к еще не завершившей репликацию молекуле ДНК прикрепляется РНКП, осуществляющая синтез мРНК, а незавершенные молекулы мРНК уже включаются в состав полисом, осуществляющих синтез белка. Весь этот сложный полиферментный комплекс определенным образом ориентирован на клеточной мембране. Поэтому воздействие на структуру мембраны или на процесс трансляции в таком надмолекулярном комплексе теоретически может вызывать в процессах транскрипции и репликации еще нерасшифрованные регуляторные эффекты.

## Глава 4\* СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ — ПРОДУЦЕНТОВ ПРАКТИЧЕСКИ ВАЖНЫХ ВЕЩЕСТВ

Промышленно важные продукты жизнедеятельности микроорганизмов по их природе и значению для самой микробной клетки делят на три основные группы: 1) крупные молекулы (ферменты, полисахариды с молекулярной массой от 10 тыс. до нескольких миллионов); 2) первичные метаболиты (соединения, необходимые микроорганизмам для роста: аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, витамины и др.); 3) вторичные метаболиты (соединения, ненужные микроорганизмам для роста: антибиотики, токсины, алкалоиды, факторы роста растений). Первичные и вторичные метаболиты микробного происхождения обычно имеют довольно низкую по сравнению с ферментами молекулярную массу — менее 1,5 тыс.

Биологическую активность эти вещества проявляют различно: удовлетворяют потребности человека и животных, взаимодействуют с микроорганизмами, насекомыми, растениями, участвуют в разложении различных органических субстратов. Кроме того, некоторые аминокислоты могут служить сырьем для дальнейших превращений на основе химического синтеза.

Продукты микробного синтеза для того, чтобы стать объектом рентабельного промышленного производства, должны выделяться микробной клеткой в питательную среду и накапливаться в среде в количествах, которые оправдывали бы сырьевые и энергетические затраты на культивирование микроорганизма и выделение продукта в удобной для дальнейшего использования форме. В большинстве случаев выбор микробиологического способа получения того или иного вещества обусловлен полным отсутствием или весьма ограниченной возможностью получения его другими способами, в первую очередь путем химического синтеза. Многие антибиотики, ферменты, биологически активные изомеры ряда аминокислот, пуриновые нуклеотиды, токсины, факторы роста растений в настоящее время возможно или по крайней мере гораздо проще получать с помощью микроорганизмов из доступного и дешевого сырья, чем осуществлять сложный, многоступенчатый химический синтез, или даже один-два этапа ферментативного синтеза, но на основе сложного и часто малодоступного сырья.

Однако природные штаммы микроорганизмов, как правило, не обладают способностью выделять и накапливать в питательной среде, т. е. продуцировать, такое количество нужного продукта, которое обеспечило бы достаточно низкую его стоимость и требуемый народному хозяйству или медицине объем производства. Природные штаммы некоторых групп микроорганизмов

---

\* Замысел этой главы принадлежал С. И. Алиханяну, памяти которого автор с глубокой признательностью ее посвящает.

(несовершенные грибы, актиномицеты, бациллы) способны выделять в окружающую среду сравнительно небольшие количества антибиотиков, токсинов или гидролитических ферментов. Первичные метаболиты, как правило, микроорганизмами не выделяются в значительном количестве (синтезируемое количество этих веществ строго ограничено и рассчитано на потребности самой клетки). Исключение из этого правила — выделение глутаминовой кислоты природными штаммами (так называемой группы глутаматпродуцирующих коринебактерий) не распространяется на подавляющее большинство других аминокислот.

В связи с этим задача селекционера — не только усиление природной способности микроорганизма продуцировать определенное вещество (антибиотик, фермент, токсин и др.), но во многих случаях и создание продуцента «заново» из штамма дикого типа, способного синтезировать вещество (например, аминокислоту), но не способного его продуцировать. Эти задачи осуществляются получением у природных штаммов *наследственных изменений* — *мутаций*, приводящих к усилению природной способности микроорганизмов синтезировать и продуцировать определенное вещество, а также появлению новой способности — синтезировать вещество в избытке — сверх своих потребностей и продуцировать его.

Дальнейшее повышение уровня продукции того или иного вещества у микроорганизма — это постоянная цель работы селекционеров, так как наиболее эффективный способ интенсификации микробиологического производства, не требующий дополнительных капиталовложений, заключается в использовании более продуктивного штамма.

Синтез микроорганизмами первичных или вторичных метаболитов можно представить себе как процесс, начинающийся с поглощения клеткой субстрата (источников углерода и азота, микроэлементов и т. д.) и проходящий затем ряд этапов, катализируемых различными ферментами, часть которых участвует в регуляции синтеза нужного вещества или его предшественников. На отдельных этапах промежуточные вещества могут служить предшественниками других метаболитов и расходоваться на их синтез. Предшественники определенного вещества могут быть промежуточными или конечными продуктами других путей синтеза, иметь собственную регуляцию и расходоваться на другие потребности клетки. Кроме того, продуцируемое вещество должно преодолевать барьер проницаемости и накапливаться в среде культивирования, не подвергаясь деградации под действием ферментов, которые может синтезировать микробная клетка.

Теоретически *мутации, способствующие сверхсинтезу продукта*, могут затрагивать большое число структурных генов, кодирующих ферменты всех этапов синтеза, транспорта и катаболизма данного продукта, а также регуляторные гены. Результат таких мутаций может проявиться в различных изменениях

метаболизма клетки: 1) повышение скорости поглощения и утилизации субстрата клеткой; 2) повышение уровня синтеза биосинтетических ферментов или их активности, в частности, за счет нарушения негативного контроля синтеза и активности регуляторных ферментов в пути синтеза продукта или его предшественников; 3) блокирование побочных реакций синтеза для снижения расхода общих предшественников на синтез других метаболитов; 4) блокирование дальнейшего внутриклеточного превращения продукта, если оно происходит; 5) обеспечение эффективной экскреции продукта из клетки; 6) блокирование деградации продукта; 7) усиление позитивных форм регуляции синтеза продукта.

Если желаемым продуктом является выделяемый клеткой фермент (чаще всего это гидролитические ферменты, хотя в последнее время большой интерес проявляется и к ряду оксидоредуктаз, в частности, участвующих в катаболизме аминокислот), то мутации, способствующие усилению его образования и активности, а также накоплению в среде, могут затрагивать: 1) структурный ген, приводя к синтезу мутантного фермента, не чувствительного к ингибированию конечным продуктом реакции, и (или) повышая его активность (число оборотов, т. е. число молей превращаемого субстрата в минуту); мутация в промоторной части гена должна усилить частоту инициации транскрипции или вызвать конститутивный синтез фермента; 2) гены, кодирующие белки, участвующие в регуляции синтеза данного фермента (в частности, по типу катаболитной репрессии, имеющей разнообразные формы проявления и в общем виде выражающейся в обратной зависимости синтеза катаболитчувствительного фермента от скорости роста клеток), мутации в этих генах должны устранить или ослабить факторы, ограничивающие синтез фермента; 3) гены, кодирующие ферменты, которые могут гидролизовать и инактивировать нужный фермент, мутации должны уменьшить или устранить такую возможность; 4) гены, ответственные за синтез компонентов клеточных мембран, которые участвуют в «сборке» (у эукариотов) и экскреции ферментов, мутации в этих генах могут повысить эффективность указанных процессов.

Приведенный перечень теоретически возможных, «участвующих» в сверхсинтезе мутаций, очевидно, не полон, так как наши сведения о регуляции биосинтеза того или иного метаболита и его взаимосвязях с другими процессами в клетке не являются исчерпывающими. Отнюдь не любая из перечисленных мутаций может вызвать сверхсинтез. Чаще всего требуется сочетание нескольких мутаций, среди которых могут быть «главные» и «вспомогательные». Последние необходимы для проявления или наибольшего выражения первых. Вместе с тем возможно и отсутствие значительного уровня продукции даже в случае, когда большинство из теоретически необходимых для этого мутаций получено у микроорганизма и, наоборот, селекционер может быть

избавлен от необходимости получать множество разных мутаций, если он удачно выбрал исходный природный тип микроорганизма.

#### 4.1. ВЫБОР ИСХОДНОГО МИКРООРГАНИЗМА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ

Разнообразие природных форм позволяет выбрать микроорганизм, который имеет меньшее число ограничений для сверхсинтеза какого-то вещества, хотя при этом и не продуцирует его. Так, оказалось очень сложным и на практике пока еще недостижимым получить промышленно значимый уровень продукции L-лизина у кишечной палочки или псевдомонад, но весьма легким — у представителей глутаматпродуцирующих коринебактерий: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* и др. Исходя из имеющихся данных объяснить это можно менее сложной регуляцией синтеза лизина у коринебактерий (в процессе синтеза лизина всего один фермент контролируется по типу поливалентного ингибирования активности лизином и треонином, и этот контроль устраняется мутацией, блокирующей синтез гомосерина — предшественника треонина и метионина, при этом поток общих предшественников направляется только на синтез лизина), а также отсутствием деградации лизина по сравнению с регуляцией у кишечной палочки (три контролируемых фермента и более сложные формы регуляции) и выраженной способностью к деградации лизина у псевдомонад.

В ряде случаев природные штаммы с менее сложными системами ограничений сверхсинтеза выделяют в среду некоторое количество первичного метаболита, например, штамм гриба *Eremothecium ashbyii* способен продуцировать витамин В<sub>2</sub>, а *Propionibacterium shermanii* — витамин В<sub>12</sub>. Такие микроорганизмы, конечно, становятся объектами селекции на повышение уровня продукции выделяемого вещества. Пригодность микроорганизма (не выделяющего нужное вещество, обычно первичный метаболит, но привлекающего исследователя какими-то свойствами) для использования в качестве объекта селекции на получение продуцента этого вещества можно проверить, введя ему одну или несколько определенных, легко тестируемых мутаций, которые теоретически должны вызвать сверхсинтез данного вещества и, может быть, уже были «апробированы» на другом микроорганизме. Это самый надежный способ выбора исходного штамма, даже если для этого вида микроорганизма нет данных о регуляции синтеза желаемого вещества. Для продуцентов вторичных метаболитов, а также ферментов или полисахаридов выбор исходного штамма предрешен способностью природного микроорганизма продуцировать какое-то количество нужного вещества. В тех случаях, когда одно и то же вещество выделяют природные штаммы, относящиеся к разным таксономическим группам (например, грибы и бациллы), это может позволить

выбрать более «технологичный» для будущего производства или более поддающийся селекции штамм.

Таким образом, селекционер чаще всего не свободен в выборе исходного для селекции штамма и не может считать критерием такого выбора генетическую изученность микробного объекта и возможность применения к нему разнообразных генетических методов. Природные свойства штаммов, определяющие этот выбор, безусловно, облегчают и ускоряют селекционную работу. Однако отсутствие у многих промышленных микроорганизмов систем обмена генетической информацией не позволяет ни изучить генетический контроль синтеза продуцируемого вещества, ни облегчить насыщение генома продуцента необходимыми для сверхсинтеза мутациями.

## 4.2. ПОДГОТОВКА ИСХОДНОГО ШТАММА К СЕЛЕКЦИОННОЙ РАБОТЕ

У микроорганизма, *выделяющего продукт* и взятого в качестве объекта селекции, необходимо изучить естественную изменчивость по морфологическим признакам и по количественному признаку — уровню продукции желаемого вещества<sup>1</sup>. После рассева исходного штамма на чашки Петри среди не менее 100 (а лучше нескольких сотен) колоний выявляют типичную для данной культуры морфологическую форму и отклонения от нее. Затем изолированные на косяки колонии (клоны) как типичной формы (не менее 100 клонов), так и доступное число ее морфологических вариантов (убедившись предварительно, что эти варианты сохраняют свои особенности при пересевах) оценивают после соответствующего способа культивирования по уровню продукции вещества, применяя надежный аналитический метод. Такая оценка позволяет выявить вполне возможную корреляцию между способностью продуцировать данное вещество и морфологией колоний.

Несколько клонов с наиболее высоким уровнем продукции по отношению к уровню контроля, которым является исходная (не рассевавшаяся) культура, отбирают и проверяют на продукцию в нескольких повторных опытах, а затем отбирают один клон, характеризующийся высоким и воспроизводимым уровнем. Такая процедура, которую иногда называют «чисткой» исходной культуры, довольно часто приводит к отбору клона с заметно повышенной продукцией, а в некоторых случаях — и с отклонением от типичной морфологии.

---

<sup>1</sup> Уровень продукции (накопление в среде) вещества (антибиотика, аминокислоты и т. д.) обозначают в единицах массы на объем культуральной жидкости после определенного периода культивирования микроорганизма: мкг/л, г/л и т. д.; если продукт микробного синтеза — экзогенный фермент, то его характеризуют единицами активности, что может отражать и количество фермента, и его активность. Для краткости в дальнейшем мы будем употреблять термин «уровень продукции» по отношению ко всем продуктам микробного синтеза.

Отобранный из посева исходной культуры клон снова засевают, отмечают морфологическую изменчивость, если она есть, и затем оценивают по уровню продукции не менее 100 типичных для данного клона изолированных на косяки колоний. Целесообразно значения уровней продукции таких субклонов, выраженные в процентах по отношению к продукции исходного для них (родительского) клона, распределить в вариационном ряду и вычислить статистические показатели: среднее арифметическое  $\bar{X}$ , квадратическое отклонение  $\sigma$  и коэффициент изменчивости  $cv = \sigma \cdot 100 / \bar{X}$ . Субклоны, попавшие в крайнюю правую часть этого ряда, отбирают, повторно оценивают по уровню продукции и оставляют один из них. Этот субклон засевают и, как и в предыдущем случае, проверив не менее 100 колоний, строят вариационный ряд и вычисляют его показатели. Получив таким образом два вариационных ряда, сравнивают значения  $cv$  этих рядов. Если эти значения достоверно не различаются, можно подготовку исходного штамма для дальнейшей селекции закончить отбором субклона из первого вариационного ряда, а второй ряд (собственный ряд этого субклона) считать контрольным для следующего этапа селекции с применением мутагенных факторов. При обнаружении у  $cv$  второго ряда явной тенденции к уменьшению целесообразно провести еще один этап клонирования, выбрав из правой части второго ряда «лучший» клон, построить третий вариационный ряд на основе его посева и определить  $cv$ . После сравнения значений  $cv$  второго и третьего рядов дальнейшее клонирование прекращают, если  $cv$  обоих рядов не различаются, и продолжают, если  $cv$  третьего ряда снижается. Цель такого ступенчатого клонирования «стабилизировать» исходную культуру по количественному признаку, получив на основе действия стабилизирующего отбора наиболее однородную по данному признаку популяцию как надежный контроль при оценке индуцируемой мутагенами изменчивости и последующем отборе мутантов. Следует иметь в виду, что однородность отобранной культуры снижается при многократном пассировании и длительном хранении. Поэтому исходную культуру, которая должна служить контролем при отборе мутантов, необходимо поддерживать периодическим клонированием, проводимым в установленные для данной культуры промежутки времени. Повысить уровень продукции таким клонированием, т. е. отобрать мутант, как правило, не удастся. Средний уровень продукции клонов, отбираемых из правой части вариационного ряда, построенного на основе естественной изменчивости культуры, обычно равен среднему уровню продукции родительской культуры.

В том случае, когда исходная культура *нужное вещество не продуцирует*, следует выбрать из ее посева колонию, которая по таксономической характеристике полностью соответствует данному виду микроорганизма, и использовать этот клон в дальнейшей работе с применением мутагенов.



#### 4.3. ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТОВ

Разнообразные типы мутаций получают с помощью различных физических и химических мутагенных факторов. Биологический материал, подвергаемый воздействию мутагенных факторов, должен быть дискретным и содержать минимальное количество ядер, что позволяет устранить или сократить стадию сегрегации. Обычно это споры, вегетативные клетки или даже обрывки мицелия у неспорулирующих организмов. Суспензия, содержащая клетки или споры, должна быть по возможности лишена комков — конгломератов, так как мутация в одной из клеток конгломерата при прорастании его на агаризованной среде будет утрачена или в лучшем случае проявится в виде сектора. Комки разбивают на качалке, фильтруют суспензию, но полностью избавиться от их присутствия в обрабатываемой мутагеном суспензии обычно не удается.

Физическими факторами (УФ-излучение и различные виды ионизирующей радиации) обрабатывают водную суспензию спор или клеток. При обработке химическими факторами (чаще всего это алкилирующие агенты: алкилметансульфонаты, алкилсульфаты, алкилнитрозомочевина, метилнитрозогуанидин и др.) следует соблюдать условия, способствующие максимальному проявлению мутагенной активности данного вещества. Большую роль в этом отношении играет рН раствора, поэтому обработку проводят в буферных растворах при наиболее эффективных для данного мутагена значениях рН. При этом надо иметь в виду, что один и тот же мутаген для разных микроорганизмов может быть активен при разных значениях рН. Показано, хотя и на разных типах мутаций, что метилнитрозогуанидин у кишечной палочки и дрожжей наибольшее число мутантов индуцирует при рН 6,0—6,5, а у актиномицетов — при 9,0. Иногда химический мутаген более эффективен в газовой фазе, а не в жидкой фазе.

У актиномицетов и коринебактерий, обработанных парами диэтилсульфата (для этого достаточно нанести каплю вещества на стенку пробирки с выросшей культурой и выдержать несколько часов в термостате), появляется в несколько раз больше морфологических мутаций, чем после обработки в водном растворе мутагена.

Доза воздействия мутагена выражается в единицах излучения, соответствующих типу радиации. Для химических мутагенов доза характеризуется концентрацией мутагена в обрабатываемой суспензии и экспозицией при определенной температуре. После истекшей экспозиции обработку химическим мутагеном прерывают отмыванием материала (применяя осаждение его центрифугированием), помещением в буферную смесь с неоптимальным для мутагенного эффекта значением рН и (или) серией разведений в физиологическом растворе, предшествующей высеву на агаризованную среду. Если при поиске определенных типов

мутаций суспензия должна быть высеяна на агар без разведения, то отмывание от мутагена необходимо.

При выборе дозы мутагена ориентируются на выживаемость обрабатываемого микроорганизма, последняя определяется отношением числа колоний, выросших на агаре после мутагенного воздействия, к числу колоний, выросших после посева той же, но не обработанной мутагеном (контрольной) суспензии клеток, выраженным в процентах. Выживаемость зависит как от дозы мутагена, так и от чувствительности данного микроорганизма к летальному эффекту мутагена, причем чувствительность может значительно различаться у нескольких штаммов одного вида микроорганизма. В селекционной работе, как правило, используются дозы, обеспечивающие выживаемость клеток в диапазоне от 0,1 до 50—80 %.

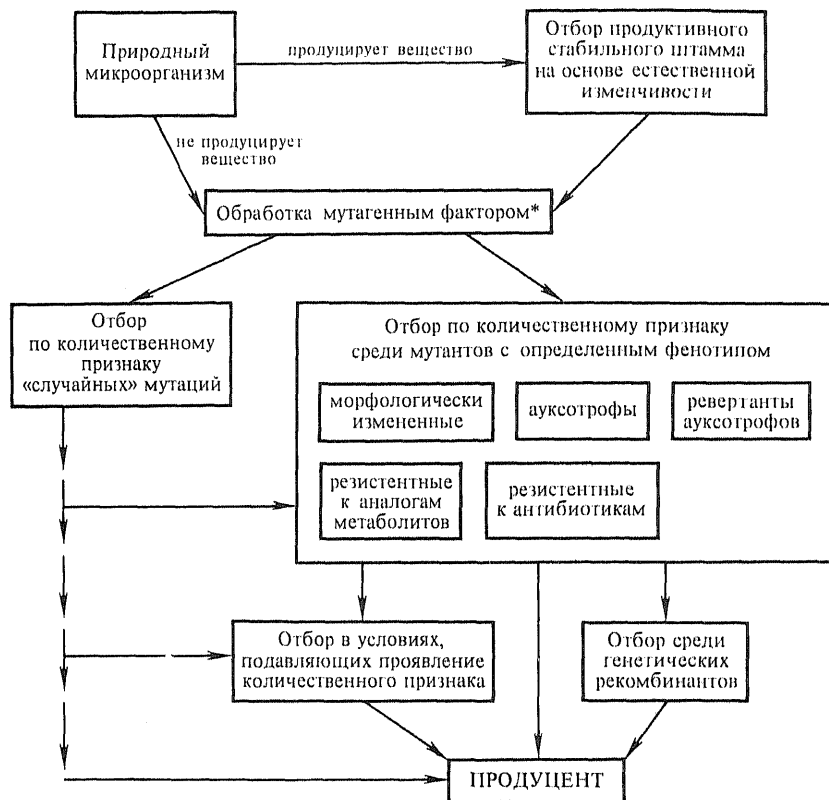


Рис. 4.1. Схема селекционной работы с продуцентами биологически активных веществ:

\* — обработка мутагеном может предшествовать всем этапам отбора

#### 4.4. МЕТОДЫ ОТБОРА МУТАНТОВ С ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ ПРОДУКЦИИ

Среди выживших после обработки мутагеном клеток исходного штамма микроорганизма предстоит отобрать мутанты с желаемыми свойствами. Для этого имеются два альтернативных пути: 1) отбор случайных мутаций после оценки данного количественного признака, т. е. уровня продукции желаемого вещества у возможно большего числа клонов, полученных из выживших клеток; 2) отбор по данному количественному признаку среди мутантов с определенным фенотипом, например ауксотрофных, резистентных к антиметаболиту и др., для выделения которых из числа выживших клонов в каждом случае применяют свой собственный метод отбора. На рис. 4.1 схематически показаны разные варианты отбора, подробно описанные далее.

##### 4.4.1. Отбор случайных (непредсказуемых) мутаций

Отбор случайных мутаций, контролирующих данный количественный признак, применяют в тех случаях, когда селекционер не располагает какими-либо сведениями о пути синтеза желаемого продукта, его регуляции и взаимосвязях с синтезом других метаболитов. 40 лет назад при открытии пенициллина и затем других антибиотиков этот метод был единственно возможным. С большим эффектом он применялся в течение многих лет в селекции продуцентов этих ценнейших лекарств и, в известном смысле, создал промышленное производство антибиотиков, доступных широким массам населения. Классическим примером такой селекции является знаменитая Висконсинская серия продуцентов пенициллина, проведенная в США на основе исходного штамма *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 с применением различных физических и химических мутагенов. Селекция штаммов этой серии, продолжавшаяся более 30 лет, позволила повысить уровень продукции пенициллина в несколько тысяч раз по сравнению с уровнем исходного штамма.

Метод отбора случайных мутаций всегда осуществляется в несколько последовательных этапов, или ступеней, и поэтому чаще называется *ступенчатым отбором с применением мутагенов*. Каждый этап (в современном варианте) заключается в следующем. Исходная, подготовленная к селекции культура обрабатывается мутагеном, как правило, взятым в нескольких дозах, обеспечивающих разную выживаемость. Используют и несколько разных мутагенов. Из числа колоний, выросших после воздействия каждой отдельной дозой мутагена, отсевают не менее 100 колоний для дальнейшей оценки у них уровня продукции желаемого вещества. Отсев колоний производят тотально (без выбора), но стараясь при этом сохранить в пределах взятой выборки процентное соотношение морфологически измененных

вариантов, характерное для данной дозы мутагена. Значения уровней продукции вариантов, полученных после обработки отдельной дозой мутагена, выражают в процентах по отношению к уровню продукции исходной культуры и распределяют в вариационном ряду. Полученные вариационные ряды, число которых соответствует числу примененных доз одного или нескольких мутагенов, сравнивают с контрольным рядом, построенным, как указывалось выше, на основе рассева исходной культуры. В результате сравнения выявляют так называемые плюс- и минус-варианты, которыми условно считают все клоны, уровень продукции у которых выходит за пределы  $\bar{X} \pm 2\sigma$  контрольного ряда. Плюс-варианты являются материалом для дальнейшей оценки и выбора мутанта с повышенной продуктивностью. Дозы мутагена, давшие наибольшее число плюс-вариантов, целесообразно еще раз использовать для обработки исходной культуры, с тем чтобы увеличить объем материала для оценки и повысить вероятность отбора мутанта. Затем плюс-варианты отбирают, оценивают в нескольких повторных опытах на способность продуцировать желаемое вещество, выбирают лучшие и проверяют их уровень продукции после 2—3 пересевов на агаризованной среде. Все проведенные опыты по проверке лучших вариантов суммируют, результаты обрабатывают статистически и на их основании выбирают вариант, уровень продукции которого достоверно превышает уровень продукции исходного штамма. Для получения такого варианта (мутанта), даже если превышение и не очень значительно, требуется проверка нескольких сотен клонов. Нередко повышенный уровень продукции — единственное отличие отобранного мутанта от исходной культуры. Однако в ряде случаев, особенно когда превышение по количественному признаку значительно, мутант может иметь и измененную морфологию колоний, например сниженную споруляцию, утрату или приобретение пигмента и др., или какие-то новые культуральные признаки: иную продолжительность культивирования, устойчивость к токсичным предшественникам, чувствительность к определенным компонентам среды и т. д. Некоторые из таких сопутствующих признаков могут являться результатом нарушения физиологического и метаболического баланса, вызванного какими-то не известными исследователю мутациями, приведшими к резкому повышению уровня продукции вещества, другие, например устойчивость к фенилуксусной кислоте у продуцента пенициллина, могут сами по себе быть причиной повышения продуктивности мутанта.

Отобранный на одном этапе селекции мутант служит исходным для следующего этапа после такой же процедуры подготовки, какая была описана для исходной культуры (субклонирование на основе естественной изменчивости с построением контрольного вариационного ряда). Известны случаи, когда субклонирование вновь полученного мутанта позволяло отобрать штамм с более высокой продуктивностью.

Последовательные этапы отбора, проводимого непосредственно по количественному признаку и требующего оценки многих тысяч клонов, позволяют «собрать» в геноме продуцента группу мутаций, сочетание которых и обеспечивает высокий уровень продукции. Наиболее эффективными обычно являются первые несколько этапов отбора, затем его темп падает; последнее в определенной степени преодолевается сменой мутагенного фактора, переходом на другую селекционную линию, введением некоторых мутаций.

#### 4.4.2. Модификация метода отбора случайных мутаций

В работе со случайными мутациями пользуются приемами, предусматривающими оценку количественного признака после культивирования выделенных в результате мутагенного воздействия клонов в условиях, специфически ограничивающих уровень продукции данного вещества у исходной культуры. Такие условия создаются обычно повышенным или, напротив, недостаточным содержанием какого-то компонента среды, влияющего на синтез продукта, неоптимальной температурой, продолжительностью культивирования, степенью аэрации и т. д. Оценка уровня продукции в таких условиях позволяет выявить мутанты, преодолевающие созданное ограничение и сохраняющие достаточно высокую продуктивность. Например, исходный штамм *Corynebacterium glutamicum* был способен продуцировать большие количества глутаминовой кислоты (до 50 г/л) только в присутствии 2—3 мкг/л биотина. Это не позволяло использовать в питательной среде в качестве источника углерода дешевое и доступное сырье — свекловичную мелассу, содержащую обычно много биотина. Оценка около 8000 клонов на средах с повышающимся от этапа к этапу содержанием биотина позволила получить в итоге такой селекции штамм, продуцирующий глутаминовую кислоту (50 г/л) на мелассных средах. Интересно, что на одном из этапов селекции были обнаружены две «сопутствующие» повышению продуктивности мутации: ауксотрофность по триптофану и чувствительность роста колоний к высокой температуре. Роль ауксотрофной мутации осталась неясной, однако мутацию удалось устранить (с помощью реверсии) без существенного ущерба для уровня продукции аминокислоты только через несколько последующих этапов селекции. Чувствительность к повышенной температуре сохранилась у всех продуктивных штаммов и, очевидно, явилась следствием структурных изменений в мембране. Такие изменения были необходимы клетке для выделения глутаминовой кислоты в присутствии избытка биотина, способствующего формированию «непроницаемой» для этой аминокислоты мембраны.

Таким образом, ступенчатый отбор с оценкой только по количественному признаку, который ведется фактически «вслепую»

по отношению к мутациям, вызывающим сверхсинтез, в ряде случаев сам выявляет эти мутации и как бы «подсказывает» правильное направление селекции.

#### 4.4.3. Отбор по количественному признаку среди мутантов с определенным фенотипом

Метод применяют, используя имеющиеся представления о пути, регуляции и взаимосвязях синтеза желаемого продукта у данного микроорганизма или у других, изученных в этом отношении. Такие представления в большей степени развиты сейчас для первичных метаболитов и в меньшей — для вторичных метаболитов и ферментов.

#### 4.4.4. Ауксотрофные мутации

Использование ауксотрофных мутаций позволяет блокировать образование ингибитора или корепрессора синтеза желаемого продукта, перераспределить поток общих предшественников в разветвленных путях биосинтеза, уменьшить или остановить дальнейшее превращение нужного продукта. Ауксотрофные мутанты получают с помощью мутагенов, применяя известные методы, облегчающие отбор таких мутантов: метод обогащения, основанный на действии антибиотиков, в частности пенициллина, на растущие в минимальной среде, т. е. прототрофные, клетки, а также метод реплик. У полученных ауксотрофных мутантов определяют питательные потребности, отбирают мутанты с той потребностью, которую хотели получить, и у последних оценивают способность продуцировать желаемое вещество. При этом необходимо помнить, что питательная среда для ауксотрофа-продуцента должна содержать требуемый для роста метаболит в ограниченном количестве, так как в большинстве случаев он подавляет синтез нужного продукта. Количество оцениваемых на продуктивность ауксотрофных мутантов с одинаковой питательной потребностью не должно быть сведено к одному-двум мутантам, хотя иногда и этого количества достаточно для достижения ожидаемого эффекта. Если потребность в метаболите может быть обусловлена блокированием разных этапов его синтеза, то не на каждом этапе мутация даст эффект. Кроме того, ауксотрофность не всегда вызывается блоком в пути синтеза; например, для аминокислот она может быть вызвана мутацией, нарушающей включение их в белки. Поэтому целесообразно получить и оценить продуктивность нескольких десятков мутантов с качественно одинаковой потребностью для того, чтобы выбрать наиболее продуктивный, если расчет на ауксотрофность оказался верным, и составить обоснованное представление о влиянии данной мутации на продукцию желаемого вещества.

Отбор среди *ревертантов ауксотрофных мутантов*, у которых ауксотрофность вызвана дефектом определенного фермента в пу-

ти синтеза метаболита, позволяет получить мутанты с восстановленной каталитической, но утраченной регуляторной функцией фермента, катализирующего синтез данного продукта, а также мутанты с неполным восстановлением каталитической функции, т. е. снижением активности фермента по отношению к активности фермента прототрофного штамма или, напротив, с усилением его активности. Перечисленные типы реверсий затрагивают один и тот же дефектный у ауксотрофа ген — они относятся к истинным реверсиям и имеют характер внутригенных супрессорных реверсий. Если же ауксотрофность вызвана нарушением включения аминокислоты в белки, то у супрессорных ревертантов такого ауксотрофа восстановление способности к прототрофному питанию может быть связано с мутацией другого гена, например кодирующего регуляторный фермент в биосинтезе данной аминокислоты. Такая мутация, нарушая регуляцию синтеза аминокислоты, вызывает ее сверхсинтез, чем и преодолевается (супрессируется) ауксотрофность мутанта. Супрессорная мутация в другом гене может включить в особых случаях дополнительный, обходной путь синтеза, продукты которого не препятствуют синтезу нужного метаболита. Межгенные супрессорные реверсии в некоторых случаях затрагивают и регуляторные гены синтеза метаболита, например у ауксотрофа по гистидину *Bacillus subtilis*, дефектный ген которого сцеплен с генами триптофанового оперона, реверсия к прототрофности может быть вызвана мутацией в регуляторном гене этого оперона, одновременно приводящей к сверхсинтезу триптофана.

Получить ревертанты к прототрофности несложно. После обработки мутагеном клетки ауксотрофа в большой концентрации (как правило, без дополнительного разведения суспензии) высевают на чашки с агаризованной минимальной средой или со средой, в которой отсутствует фактор, компенсирующий данную ауксотрофность. В течение инкубации целесообразно отмечать колонии, появляющиеся в ранние и поздние сроки. Это связано с тем, что искомые ревертанты чаще всего находятся среди позднее появляющихся и медленно растущих (мелких) колоний, так как нужная реверсия может не полностью восстановить прототрофный фенотип. Выросшие колонии отсеивают на минимальную среду желательно с рассевом до отдельных колоний, чтобы освободиться от ауксотрофных клеток, составлявших «фон» на чашках при появлении колоний ревертантов. Выросшие на минимальной среде колонии (обычно по одной от каждой первичной колонии ревертанта) пересеивают на полноценную среду, и полученные клоны затем оценивают на способность продуцировать желаемое вещество. Если исходный ауксотрофный штамм не продуцировал это вещество, удобно первичную оценку осуществить с помощью тест-культуры в тех случаях, где это возможно. Для продуцентов первичных метаболитов тест-культурой служат ауксотрофные мутанты с потребностью в данном метаболите, для продуцентов антибиотиков — штаммы, чувствительные к бактерицидному

действию последних. Высев с помощью репликатора проверяемых ревертантов на агаризованную среду, содержащую клетки тест-культуры, позволяет очень быстро среди большого числа клонов выявить те, вокруг которых образуются зоны роста или зоны подавления тест-культуры. Только у таких клонов затем количественно оценивают уровень продукции в соответствующих условиях культивирования. Обычно для выделения искомой мутации среди ревертантов ауксотрофного штамма требуется проверка нескольких сотен прототрофных клонов, тогда как поиск среди прямых мутаций может потребовать проверки многих тысяч клонов.

#### **4.4.5. Отбор среди мутантов, резистентных к структурным аналогам аминокислот или азотистых оснований**

Отбор среди таких мутантов — один из широко применяемых и эффективных методов получения и улучшения штаммов продуцентов первичных метаболитов. Из числа различных структурных аналогов этих веществ наиболее пригодны для селекционных целей те, которые действуют на регуляторные системы синтеза подобно природному метаболиту, но не могут выполнить основной функциональной роли этого метаболита в клетке. Так, аналог аминокислоты, добавленный к клеткам, находящимся в минимальной среде, имитирует избыток этой аминокислоты на уровне систем, контролирующей ее синтез (регуляторных ферментов и(или) регуляторных генов), но при этом не может заменить аминокислоту в белках: не способен включиться в белок или, включаясь, приводит к образованию дефектных белков, вызывая в обоих случаях голодание клетки по природной аминокислоте и останавливая рост. Добавление природной аминокислоты вместе с ее аналогом устраняет это голодание. В этих условиях клетка, прекратив синтез аминокислоты вследствие избытка последней и присутствия аналога, использует «внешнюю» аминокислоту для жизнедеятельности.

Способность аналога подавлять рост клеток и очевидное устранение этой способности в присутствии добавленного природного метаболита являются основными «приметами» пригодности аналога для селекционной работы. Эти свойства необходимо установить при его выборе среди других аналогов, так как многочисленные структурные аналоги природных метаболитов имеют и другие способы взаимодействия с микробной клеткой.

Для получения аналогорезистентных мутантов суспензию клеток исходной культуры после обработки мутагеном высевают в большой концентрации (газоном) на чашки Петри с агаризованной минимальной средой, содержащей аналог в заранее подобранной концентрации, ингибирующей рост исходной культуры. На таких чашках через несколько суток инкубации появляются колонии мутантов, преодолевающих действие аналога. Часть та-



ких мутантов имеет мутации, нарушающие регуляцию синтеза желаемого метаболита и вызывающие его сверхсинтез, другая часть — мутации, нарушающие транспорт аналога в клетку, могут быть и другие мутации. Для наглядности можно рассмотреть свойства нескольких классов мутантов *E. coli*, отбираемых по резистентности к аналогу триптофана.

#### Мутанты *Escherichia coli*, резистентные к 5-метилтриптофану

Мутантный ген	Эффект мутации
Регулятор trpR	Конститутивный синтез ферментов оперона
Оператор	Частично конститутивный синтез ферментов оперона
Структурный ген trpE	Десенсibilизация антранилатсинтетазы к триптофану
Структурный ген пермеазы	Нарушение транспорта триптофана в клетку
Структурный ген аминок-ацил-тРНК-синтетазы	Изменение аминок-ацил-тРНК-синтетазы

Способностью продуцировать триптофан характеризовались мутанты только трех первых классов.

После отсева колоний, выросших на среде с аналогом, и выделения у них отдельных клонов из каждой первичной колонии проверяют по 1—2 клон на способность продуцировать нужное вещество. Если исходный штамм не продуцировал этот метаболит, то первичную оценку мутантов проводят с помощью ауксотрофной по данному метаболиту тест-культуры, отбирая для дальнейшей оценки те клоны, которые обеспечивают зоны роста, или «кормление», ауксотрофных клеток. В тех случаях, когда исходная культура уже являлась продуцентом, необходима тотальная проверка всех выделенных клонов на способность продуцировать метаболит в соответствующих условиях культивирования. Из их числа отбирают те, у которых при последующих проверках средний уровень продукции достоверно превышает средний уровень продукции исходного (родительского) штамма. При правильно выбранном аналоге для получения продуктивного мутанта обычно требуется проверить несколько сотен аналогорезистентных клонов. У отобранного продуктивного штамма часто определяют чувствительность к более высоким, чем ранее использованная, концентрациям аналога. Если такая чувствительность имеется, проводят еще один, а иногда и несколько этапов отбора на постепенно повышающихся концентрациях аналога. Нередко используют другие аналоги того же метаболита на следующих этапах отбора.

У отобранных аналогорезистентных штаммов очень важно исследовать природу того регуляторного нарушения, которое привело к сверхсинтезу или повысило его уровень. Для этого у исходного штамма и мутанта определяют удельную активность регуляторного фермента (или ферментов) в пути синтеза данного метаболита, изучают *in vitro* действие этого метаболита и других ингибиторов на активность фермента. Характер действия аналога

метаболита на активность фермента полезно знать и до начала селекции. Для выяснения вопроса о регуляции синтеза метаболита по типу репрессии конечным продуктом удельную активность регуляторных ферментов исходного штамма и мутанта определяют после выращивания в средах, содержащих метаболит (конечный продукт), и без него.

Сведения о природе достигнутых на отдельных этапах селекции регуляторных и других изменений позволяют правильно выбрать метод селекции для следующего этапа. Следует отметить, что у одноступенчатых аналогорезистентных продуктивных мутантов может быть обнаружено одновременно несколько мутаций.

Типичным мутационным нарушением, приводящим к сверхсинтезу у отбираемых по продуктивности аналогорезистентных мутантов, признается утрата чувствительности регуляторного фермента (десенсбилизация) к ингибированию конечным продуктом, которым обычно и является желаемый метаболит, а также нарушение механизма репрессии синтеза ферментов, что обеспечивает их неконтролируемый (конститутивный) синтез. Имеются данные о том, что регуляторным мутациям у аналогорезистентных продуктивных мутантов сопутствуют и транспортные мутации, нарушающие поступление аналога и природного метаболита в клетку. Транспортные мутации без регуляторных вызывают продукцию метаболита очень редко и в незначительных количествах.

**Природа резистентности к аналогу лизина S-(2-аминоэтил)-цистеину у различных мутантов, выделяющих лизин**

<i>Микроорганизм</i>	<i>Эффект мутации</i>
<i>Brevibacterium flavum, Corynebacterium glutamicum</i>	Десенсбилизация аспартокиназы
<i>Pseudomonas acidovorum</i>	Десенсбилизация дегидродипиколонатсинтетазы и гомосериндегидрогеназы
<i>Escherichia coli</i>	Нарушение транспорта лизина в клетку

Приведенные выше данные можно рассматривать как примеры регуляторных мутаций у мутантов разных микроорганизмов, резистентных к аналогу одной из аминокислот.

**4.4.6. Отбор среди мутантов, резистентных к антибиотикам**

Чаще всего этот метод отбора применяют в селекции продуцентов антибиотиков. Различные антибиотики имеют разный механизм действия на микробную клетку: некоторые являются ингибиторами белкового синтеза, другие — мембранотропными

или ДНК-тропными агентами. Многие антибиотики токсичны только для молодых культур продуцентов.

Получают резистентные к антибиотикам мутанты обычно без предварительной мутагенной обработки исходной культуры, а просто высевом суспензии спор или клеток на чашки с агаризованной средой, содержащей различные концентрации антибиотиков. Показано, что антибиотики могут индуцировать у выживших колоний появление морфологических мутантов, а также большую изменчивость по признаку антибиотикообразования. Эффективность действия антибиотика в указанном отношении очень сильно зависит от особенностей штамма, подвергаемого такому действию. В ряде случаев значительный эффект в селекции на повышение продуктивности получают с помощью собственного (выделяемого исходной культурой) антибиотика, в других — эффективно применение другого антибиотика. Селекцию с применением антибиотиков проводят в несколько этапов, постепенно повышая концентрацию препарата.

#### **4.4.7. Отбор среди морфологических мутантов**

Подобный вид отбора основывается на довольно частых фактах обнаружения морфологических изменений у высокопродуктивных штаммов, отобранных только по количественному признаку. При таком отборе рассчитывают не столько на корреляцию между количественным и морфологическим признаками, сколько на плейотропный эффект мутаций, вызывающих резкое повышение уровня продукции, и как следствие нарушения метаболического баланса то или иное морфологическое изменение. Продуктивные штаммы часто оказываются малоспорулирующими или, наоборот, имеют повышенную споруляцию, они могут потерять пигмент или приобрести новый, могут изменить величину или форму колоний.

Среди колоний, выживших после мутагенного воздействия, отбирают подряд (несколько сотен) морфологически измененные и проверяют их на продуктивность.

Выше мы рассмотрели наиболее часто применяемые в практической селекции методы отбора штаммов с повышенной продуктивностью среди разных фенотипических классов мутантов. Основная цель использования этих методов — сузить диапазон поиска «нужной» мутации, сделать этот поиск менее трудоемким и более осознанным по сравнению со ступенчатым отбором случайных мутаций. Следует отметить, что метод отбора случайных мутаций с успехом заменяется на отдельных этапах селекции продуцентов антибиотиков, ферментов, витаминов другими приемами, которые обычно применяют в селекции продуцентов аминокислот и пуриновых производных. Это вызвано обнаружением прямых связей между синтезом определенных аминокислот

и антибиотиков, между синтезом пуринов и витамина В<sub>2</sub> и т. д. В селекции продуцентов некоторых антибиотиков положительный эффект дает введение продуценту определенных аукоотрофных мутаций, а затем отбор прототрофных ревертантов. Такой же прием оказался эффективным в селекции грибов рода *Aspergillus* — продуцентов глюкоамилазы. Известны попытки использовать аналоги аминокислот в селекции продуцентов антибиотиков. Наиболее показателен пример с продуцентом фунгицида пирролнитрина *Pseudomonas fluorescens*. Так как предшественником в синтезе этого антибиотика являлся D-триптофан и добавление его в срез повышало выход антибиотика, у продуцента последовательно получили мутанты, резистентные к двум аналогам триптофана. Среди этих мутантов был отобран штамм, уровень продукции антибиотика у которого был повышен почти в три раза по сравнению с родительским, чувствительным к аналогам штаммом. Уровень продукции витамина В<sub>2</sub>, синтез которого связан с метаболизмом пуринов, у продуцента гриба *Erethothecium ashbyii* удалось повысить в четыре раза с помощью мутации устойчивости к аналогам пуринов.

#### 4.5. МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕКОМБИНАНТОВ

В селекции продуцентов биологически активных веществ генетические рекомбинанты не нашли широкого применения, хотя попытки получить гибридные штаммы у продуцентов антибиотиков (грибов и актиномицетов) неоднократно предпринимались еще с 50-х годов XX в. и в ряде случаев были успешны. Развитие этого метода, очевидно, ограничивалось отсутствием у большинства микроорганизмов продуцентов биологически активных веществ систем генетического обмена. Появившаяся в последние годы возможность получения генетических рекомбинантов на основе слияния протопластов, доступная для очень многих микроорганизмов, вновь привлекает внимание селекционеров к методу гибридизации. Одно из важных достоинств этого метода состоит в возможности совмещения в одном геноме различных мутаций из разных родительских штаммов, не прибегая к дополнительной мутагенной обработке и поиску нужной мутации у исходного штамма. Уже имеются положительные примеры использования метода слияния протопластов в селекции продуцентов аминокислот и антибиотиков. Существенно, что метод слияния протопластов позволяет получать рекомбинанты между микроорганизмами разных видов и даже родов.

Попытки включить в последние годы в число промышленных микроорганизмов тех, у которых имеются системы генетического обмена, в ряде случаев оказались весьма успешными. Так, у бактерии, отнесенной японскими авторами к *Serratia marcescens*, на последних этапах селекции продуцентов гистидина, аргинина, треонина и изолейцина, проведенной с использованием аналогов

аминокислот, были применены трансдукционные скрещивания с помощью умеренного бактериофага. Донорами и реципиентами в скрещиваниях являлись мутанты, несущие от одной до четырех регуляторных мутаций (для разных аминокислот) и продуцирующие всего по несколько грамм на литр той или иной аминокислоты. Трансдуктанты, совместившие все требуемые для устранения регуляции синтеза аминокислоты мутации, оказались способными продуцировать указанные аминокислоты от 20 до 40 г/л.

\* \*  
\*

Все рассмотренные выше методы селекции продуцентов биологически активных веществ сегодня, в период интенсивного развития методов генной инженерии, называют традиционными методами. Эти методы в прошедшие 30 лет в огромной мере содействовали созданию микробиологической промышленности антибиотиков, аминокислот, ферментов, витаминов и других практически важных веществ. Исчерпали ли традиционные методы свои возможности? Нам кажется, думать так преждевременно, как и надеяться на то, что генная инженерия в ближайшее время сможет быть применена для создания и улучшения обширного круга принадлежащих к разным таксономическим группам продуцентов, которыми располагает сейчас микробиологическая промышленность. Даже более реальная возможность использовать на основе генноинженерных методов в качестве продуцентов микроорганизмы, для которых эти методы наиболее отработаны, например *Escherichia coli*, едва ли удовлетворит промышленность числом продуктов микробного синтеза. В связи с этим очень важно для «старых» перспективных в промышленном отношении микроорганизмов, помимо совершенствования методов обмена нужного типа мутантов, развивать методы генетического обмена на основе слияния протопластов, трансдукции, трансформации хромосомной и плазмидной ДНК, которые расширяют возможности традиционных методов селекции. Вместе с тем у промышленных микроорганизмов все шире проводится поиск плазмид и предпринимаются попытки их использования в качестве векторов при переносе генетического материала, его клонировании и амплификации. Эти исследования важны для понимания генетического контроля сложных процессов синтеза, таких, например, как синтез антибиотиков, для выявления «узких мест» в биосинтезе многих других продуктов. Одновременно они приближают промышленные микроорганизмы к объектам генной инженерии. Методология генной инженерии постоянно совершенствуется и расширяет свои возможности. В таком успешном встречном развитии разных методов и их «слиянии» на все большем числе продуцентов можно представить себе ближайшее будущее селекции микроорганизмов, призванной обеспечить промышленность высокопродуктивными штаммами.

## Глава 5 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРАКТИЧЕСКИ ПОЛЕЗНЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

В первой половине 70-х годов XX в. развитие молекулярной биологии привело к возникновению новой экспериментальной техники, которая получила в СССР название «генная инженерия», а в западной литературе именуется «работой с рекомбинантными молекулами ДНК». Суть этой технологии заключается в фрагментировании молекул ДНК в строго определенных участках, воссоединении таких фрагментов, т. е. в создании новых рекомбинантных молекул ДНК *in vitro*. Замечательным является то обстоятельство, что все матричные процессы основаны на узнавании ферментами клетки только участков начала и конца процесса. Для копирующих матрицу или работающих на матрице ферментов последовательность нуклеотидов между сигналами начала и конца процесса безразлична. Ситуация, при которой в структурный ген внедрена дополнительная чужеродная ДНК, способная реплицироваться, транскрибироваться и транслироваться в виде нового гибридного («химерного») белка, показана на рис. 5.1. Так как ДНК различных организмов однотипна, вышеописанная техника не имеет ограничений, связанных с видом и родом организма. Иными словами, сегодня возможен перенос генов любого организма в любой другой организм. Учитывая специфику данной книги, мы будем рассматривать только перенос генов в микроорганизмы и в основном те аспекты такого переноса, которые могут оказаться важными для создания промышленно полезных штаммов-продуцентов. Мы не будем рассматривать подробно технику генной инженерии, которая хорошо описана в литературе. Тем не менее следует сказать несколько слов о тех основных элементах, без которых генно-инженерные манипуляции невозможны.

В первую очередь необходимо иметь хорошо отработанную систему хозяин — вектор. Под вектором понимается, как правило, небольшая молекула ДНК, способная к автономной репликации в определенном микроорганизме. Это может быть бактериофаг или плаزمид. Естественно, необходимо иметь эффективный способ введения векторной и рекомбинантной молекулы в микроорганизм. Векторные молекулы должны обладать рядом свойств, позволяющих удобное введение чужеродной ДНК и ее последующую экспрессию. В настоящее время векторные системы очень хорошо разработаны для такой бактерии, как *Escherichia coli*. Задача прикладной микробиологии — освоение систем хозяин — вектор для промышленных микроорганизмов: бацилл, псевдомонад, актиномицетов, дрожжей и др. Успехи в этой области суммированы в обзоре «Успехи микробиологии» за 1983 г.

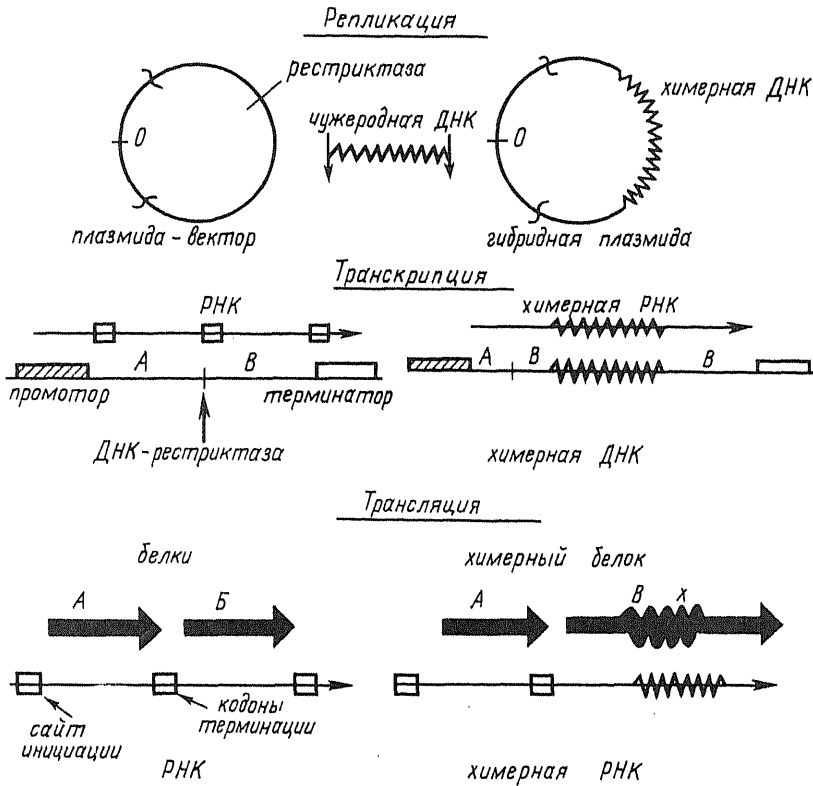


Рис. 5.1. Схема пути матричных процессов в прокариотной клетке в случае внедрения в геном чужеродной генетической информации.

На схеме иллюстрируется распознавание ферментными системами клетки сигналов начала и окончания процессов и безразличие к последовательности нуклеотидов между этими сигналами

Приемы конструирования штаммов методами генной инженерии во многом зависят от целей промышленности. Наиболее ясная и лучше всего разработанная задача — это производство методами микробиологического синтеза белков человека, важных для медицины, или белков сельскохозяйственных животных для целей ветеринарии. С точки зрения генной инженерии эта задача сводится к введению чужеродного гена в удобный для промышленного производства микроорганизм и оптимизации его экспрессии.

### 5.1. ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Многие белки человека и животных, такие как интерфероны, полипептидные гормоны, иммуномодуляторы, содержатся в органах и тканях в очень небольших количествах. Кроме того, например, интерфероны и ряд гормонов строго специфичны и, следовательно, могут быть получены только из донорской крови, плацен-

ты или из трупного материала. Таким образом, до возникновения генной инженерии сложилась ситуация, при которой медики, зная, что при определенных болезнях в организм больного следует ввести тот или иной белок, не имели этого белка в достаточных количествах, не имели возможности превратить его в общедоступный медицинский препарат.

Задача по созданию штамма — продуцента человеческого белка распадается на ряд этапов. Прежде всего необходимо иметь структурный ген необходимого белка. Если известна аминокислотная последовательность белка, то, зная генетический код, такой ген можно просто синтезировать химически. Ниже приведены примеры синтезированных в настоящее время генов.

#### Белки, кодируемые синтетическими генами

Название белка (пептида)	Количество аминокислот
Лейцин-энкефалин . . . . .	5
Брадикинин . . . . .	9
$\alpha$ -Неоэндорфин . . . . .	10
Ангиотензин I . . . . .	10
Соматостатин . . . . .	14
$\beta$ -Урогастрон . . . . .	53
Эглин С . . . . .	70
Пронинсулин человека . . . . .	86
Интерферон $\alpha_1$ . . . . .	166
Интерферон $\alpha_2$ . . . . .	165
Аспартам . . . . .	100
(asp-phe) <sub>50</sub>	

В последние годы достигнут значительный прогресс в автоматизации и ускорении синтеза олигонуклеотидов, тем не менее химический синтез гена — большой трудоемкий процесс. Другое ограничение этого метода связано с необходимостью точно знать первичную структуру белка, что не всегда доступно.

Второй путь получения необходимого структурного гена — это изоляция его из генома или синтез гена с использованием обратной транскрипции соответствующей мРНК. Прямая изоляция гена не всегда возможна, так как большинство генов высших организмов содержат интроны, а клетки микроорганизмов не могут правильно процессировать мРНК. Такой трудности не возникает, когда гены не содержат интронов, например в случае  $\alpha$ - и  $\beta$ -интерферонов человека. Таким образом, наиболее применимый способ получения структурных генов — синтез их путем обратной транскрипции. Очень трудоемкой частью этой работы являются изоляция и обогащение мРНК (клетки содержат сотни и тысячи различных мРНК). На первом этапе не удается обычно изолировать мРНК в чистом виде, а лишь существенно обогатить популяцию искомой формой. Наиболее трудоемкий этап —



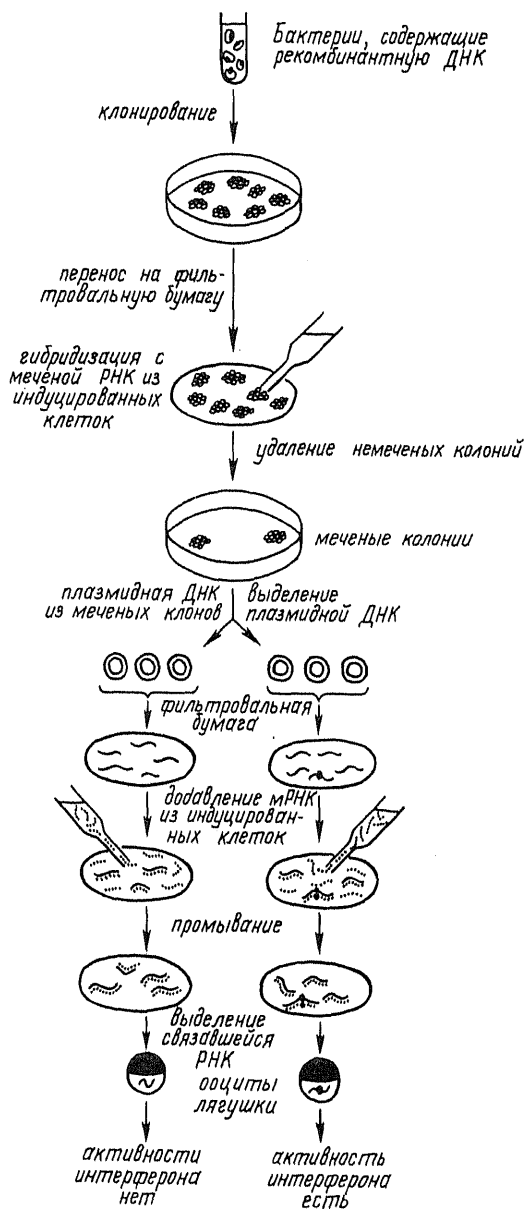


Рис. 5.2. Поиск клонов с нужным геном

поиски клонов с нужным структурным геном (рис. 5.2). Существенно, что для скрининга нужного клона не обязательно знать последовательность всего белка, достаточно знать последовательность небольших (5—6 аминокислот) отдельных фрагментов.

В этом случае скрининг может быть осуществлен методом гибридизации с синтетическими олигонуклеотидными зондами, являющимися матрицами для соответствующих фрагментов. Типичный пример такого подхода — получение генов ряда  $\alpha$ -интерферонов в институте биоорганической химии АН СССР. Вторым этапом конструирования является подстановка полученного структурного гена под контроль регуляторных элементов клетки-хозяина или того микроорганизма, в который этот ген будет перенесен. Известно, что структурная организация участков инициации транскрипции и трансляции отличается у про- и эукариот, а также у высших эукариот и дрожжей. Поэтому ферменты микроорганизмов не способны эффективно и правильно использовать регуляторные элементы высших организмов.

Для осуществления эффективной экспрессии чужеродных генов у микроорганизмов существуют три подхода. Наиболее простой вариант — внедрение (см. рис. 5.1) *чужеродного гена внутрь структурного гена*. В этом случае бактериальная или дрожжевая клетка использует регуляторные элементы собственного гена. Единственное условие такого способа конструирования — встройка чужеродного гена должна быть осуществлена в правильной рамке считывания. Недостатком этого метода является производство клеткой химерного белка, из которого нужный продукт получается путем химического расщепления. Метод применен для получения ряда продуктов, особенно небольших пептидов, таких, как соматостатин. Небольшие пептиды часто являются нестабильными продуктами из-за активного протеолиза. Важно, что в составе химерных белков стабильность пептидов повышается.

Второй метод называется *методом прямой экспрессии*. В этом случае стыковка структурного гена производится в области инициации трансляции с образованием гибридного сайта узнавания рибосомами (рис. 5.3). Такой способ позволяет получать почти естественный чужеродный белок обычно с лишним метиониновым остатком на  $\text{NH}_2$ -конце полипептидной цепи. Последнее обстоятельство связано с тем, что многие необходимые нам белки человека, такие, как инсулин или интерфероны, синтезируются

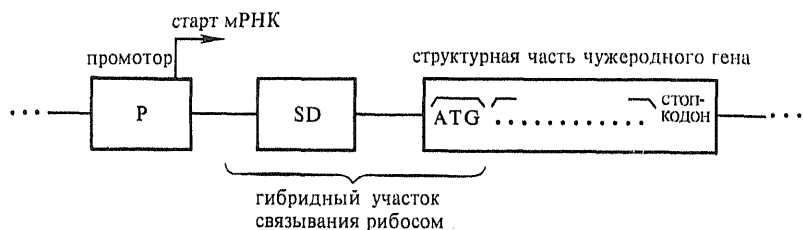
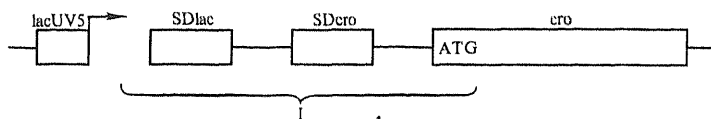


Рис. 5.3. Подстановка структурной части чужеродного гена под контроль регуляторной области бактериального гена с образованием гибридного участка связывания рибосом



Структура участка I	Синтез белка ero (мол/кл)
<pre> SD-lacZ ...AGGAAAACAG.GGC.GGTGAT.AATG.GTT.GCATGTA CT.AAGGAG.GTTGT.ATG... ...AGGAAAACAG—GGTGATAATGGTTGCATGTA CT.AAGGAGGTTGTATG... ...AGGAAAACAG—AAGGGTTGCATGTA CT.AAGGAGGTTGTATG... ...AGGAAAACAG—GTTGCATGTA CT.AAGGAGGTTGTATG... ...AGGAAAACAG—GCATGTA CT.AAGGAGGTTGTATG... ...AGGAAAACAG—AAGGAGGTTGTATG... ...AGGAAAACAG—GTTGTATG... ...AGGAAAACAG—ATG... </pre>	<p>190000</p> <p>10200</p> <p>120000</p> <p>78000</p> <p>61000</p> <p>102000</p> <p>140</p> <p>&lt;70</p>

Рис. 5.4. Зависимость уровня синтеза продукта гена ero фага  $\lambda$  под контролем промотора лактозного (*lacUV5*) оперона *Escherichia coli* от структуры гибридного участка связывания рибосом

в виде предшественников с сигнальной последовательностью на  $\text{NH}_2$ -конце полипептидной цепи, которая отщепляется в процессе их выхода из клетки. Правильный процесс отщепления сигнальных последовательностей в бактериальной клетке не всегда возможен. Поэтому мы вынуждены ввести в конструкцию перед структурным геном кодон инициации трансляции (метиониновый кодон).

Недостатком метода является необходимость оптимизации конструкции гибридного участка связывания рибосом в каждом конкретном случае. Оптимизация заключается в изменении числа и характера нуклеотидов между участком связывания рибосом (последовательность Шайн — Делгарно) и иницирующим кодом. Возможно, такая оптимизация связана с изменением вторичной структуры мРНК в области инициации трансляции. Некоторые примеры, показывающие важность оптимальной структуры сайта связывания с рибосомами для увеличения выхода чужеродного белка, приведены на рис. 5.4.

Недавно группа сотрудников «ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов» предложила новый принцип экспрессии чужеродных генов, использующий природный феномен перекрытия сайтов терминации и инициации трансляции в бактериальных оперонах. Согласно этой схеме (рис. 5.5) чужеродный ген встраивается за первым геном оперона таким образом, что сайт инициации трансляции чужеродного гена перекрывается на один нуклеотид с сайтом терминации трансляции первого гена оперона. В этом случае рибосомы, начавшие трансляцию первого белка, терминируют его синтез, но не покидают

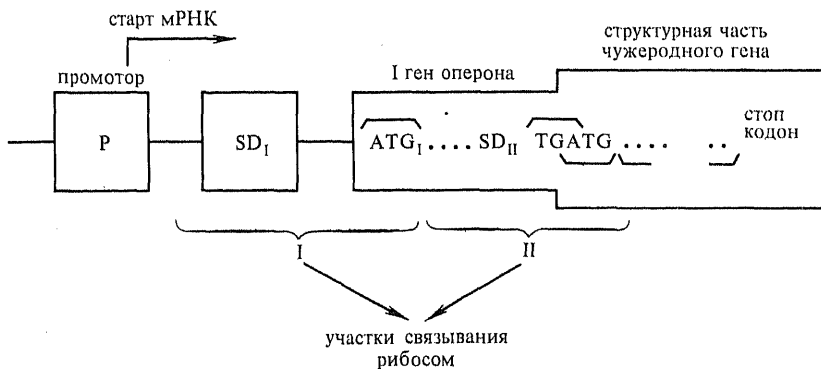


Рис. 5.5. Принцип организации «гибридного оперона» с частично перекрывающимися генами

матрицу, а приступают к трансляции чужеродного белка. Ген первого белка оперона не является необходимым, а следовательно, в его структурную часть можно ввести дополнительный сайт связывания с рибосомами, а это обеспечит трансляцию чужеродного белка даже с большей эффективностью, чем первого белка оперона. Еще более важную роль для максимальной экспрессии гена играет сайт инициации транскрипции — промотор. Примеры экспрессии одноименных генов под контролем различных промоторов приведены в табл. 5.1. Видно, что экспрессия изменяется на два-три порядка.

При создании промышленного штамма микроорганизма во многих случаях необходимо добиться не максимальной экспрессии гена, а ее оптимизации. Очень высокий синтез некоторых белков часто летален для клетки. Для промышленного производства важно получить максимальный выход продукта с единицы объема ферментера в единицу времени, а не максимальный синтез белка в пересчете на клетку. Так, высокий синтез некоторых белков может резко снизить скорость роста и жизнеспособность клеток и в конечном счете привести к снижению выхода продукта в промышленной ферментации. Получение белков, токсичных для микроорганизмов, часто выгодно проводить с регулируемым промотором в две стадии. В первой стадии при «молчащем» промоторе осуществляется рост биомассы, а затем путем изменения условий культивирования включается промотор. В этих условиях все клетки в аппарате одновременно начинают синтезировать продукт и их дальнейшая судьба нас не волнует. Типичными примерами регулируемых промоторов могут быть промоторы фага  $\lambda$  ( $P_L$  и  $P_R$ ) при наличии *ts*-мутации в гене-репрессоре. В этом случае включение осуществляется повышением температуры в ферментере. Другой пример — промотор кислой фосфатазы у дрожжей, который можно включить перенесением культуры на среду, дефицитную по неорганическому фосфату.

Т а б л и ц а 5.1. Промоторы, используемые для обеспечения транскрипции чужеродных генов в клетках *Escherichia coli*

Промотор	Транскрибируемый ген	Обеспеченный выход белка (мол/кл)
lac UV5	Интерферон лейкоцитов человека $\alpha F$	$(5-10) 10^3$
	CI-репрессор фага $\lambda$	$(30-90) 10^3$
	cro-репрессор фага $\lambda$	$200 10^3$
	Гормон роста человека	
lgrOP	Интерферон $\beta$ фибробластов человека	$20 10^3$
	Интерферон $\alpha A$ лейкоцитов человека	$100 10^3$
	Поверхностный антиген вируса гепатита В	$500 10^3$
	Е-цепь иммуноглобулина человека	$10^6$ (18% белка)
«lac OP»	CI-репрессор фага $\lambda$	$1 10^6$ (30% белка)
P <sub>L</sub>	Интерферон $\beta$ фибробластов человека	$200 10^3$
	Фрагмент Кленова с ДНК-полимеразы	$200 10^3$
	Поверхностный антиген вируса ящура	$1,5 10^6$
T5 P25	$\gamma$ -интерферон человека	$1 10^6$ (16% белка)

Третий этап конструирования — это *подбор клетки-реципиента, или клетки-хозяина*. Выход белка связан не только с интенсивностью матричных процессов, но и со стабильностью мРНК и самого конечного продукта — белка.

Так, было обнаружено, что у клеток *E. coli*, дефектных по генам РНК-азы I (gna<sup>-</sup>) и полинуклеотидфосфорилазе (rnp<sup>-</sup>), резко возрастает экспрессия некоторых эукариотических генов. Такой эффект первоначально был обнаружен для клонированных генов *Neurospora crassa*, а затем для дрожжевого гена имидозолилглицерофосфатдегидрогеназы (IGP). Активность IGP в мутантных клетках *E. coli* возрастала в три — пять раз, что было связано со стабилизацией мРНК, время полужизни которой возрастало от 1,5 до 18,7 мин. Интересно, что при этом стабильность мРНК *E. coli* в мутантных штаммах не изменялась.

Подавление протеолитической активности клетки может сильно повысить выход целевого белка. Так, введение гена pin (proteolysis inhibition) фага T4 на плазмиде pBR325 в клетки *E. coli* повысило выход  $\beta$ -интерферона под контролем lac-промотора в четыре — восемь раз и под контролем lac-промотора в пять раз. Мутации, подавляющие протеолиз в клетках *E. coli* (типа lon), также положительно сказываются на выходе чужеродных белков.

Один из приемов, позволяющих снизить протеолиз в клетке, — это получение крупных химерных белков или тандемносоединенных белков. Так, имеется сообщение о том, что тандемная дупликация, или тандемный тройной ген проинсулина в клетках *E. coli* обеспечивает защиту такого белка от протеолитической деградации. Итак, важным условием оптимальной экспрессии гена является правильный выбор реципиентной клетки, которая должна обеспечить стабильность чужеродной мРНК и минимальную протеолитическую деградацию белкового продукта.

Очень важное условие промышленной ферментации — *стабильность созданного штамма*. Обычно клетки микроорганизма теряют плазмиды с определенной частотой на генерацию. Кроме того, с определенной частотой происходит структурная реорганизация генетического материала рекомбинантных плазмид. Оба процесса могут привести к утере способности микроорганизма производить нужный белок. Структурные перестройки происходят в 100—1000 раз реже, чем утрата клетками плазмид. Плазмиды обычно, помимо чужеродного гена, несут также гены, ответственные за устойчивость к определенным антибиотикам. Поэтому простейшим способом сохранения штамма является ферментация в присутствии соответствующего антибиотика, что предотвращает накопление в популяции бесплазмидных штаммов. Число клеток, утративших плазмиды в неселективных условиях, составляет  $10^{-3}$ — $10^{-4}$  на генерацию. Если при культивировании продуцентов образуется небольшое количество белка (например, в случае получения интерферона или гормонов) и объем ферментера обычно не превышает 1 м<sup>3</sup>, селективное давление с помощью антибиотиков не является трудной технической проблемой. Приемы стабилизации, необходимые при крупномасштабных ферментациях, будут рассмотрены ниже.

Наконец, *штамм-продуцент и условия культивирования должны быть оптимальными* для последующих технологических операций по очистке белка. Например, использование в качестве хозяина дрожжей облегчает стадию сепарации биомассы; они имеют клетки крупных размеров (по сравнению с бактериями). В составе клеточных стенок *E. coli* содержится пирогенные и токсичные вещества. Для облегчения процедуры очистки белка желателен в качестве продуцентов использовать бактерии, не содержащие вредных веществ.

Очистка человеческого белка после биосинтеза в клетках микроорганизмов весьма сложная задача, так как требует получения гомогенного препарата из смеси, содержащей около 3 тыс. белков. Примеси бактериальных белков в готовом продукте недопустимы, особенно в препаратах, предназначенных для инъекции.

В этой связи заманчивой является перспектива организации биосинтеза и экскреции необходимого белка в среду культивирования. Известно, что клетки *Bacillus subtilis*, например, способны выделять в среду большое число экзоферментов — амилазы, протеазы, рибонуклеазы и т. д., причем количество некоторых из

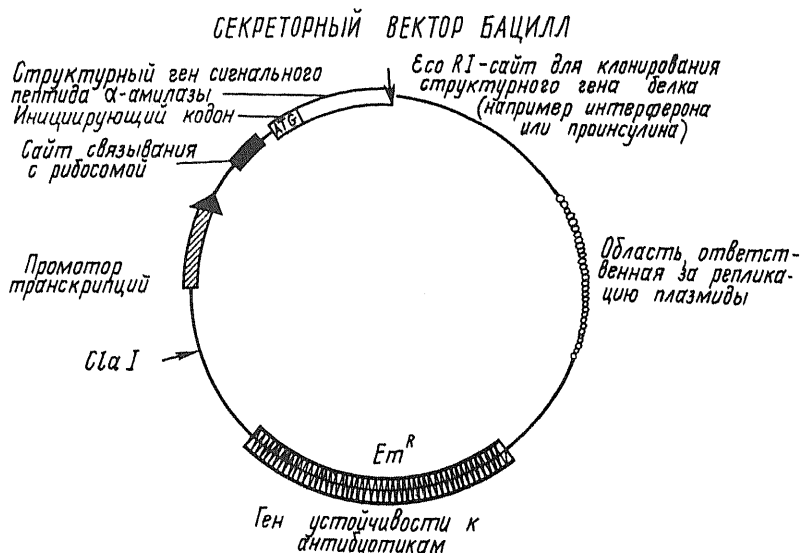


Рис. 5.6. Секреторный вектор бацилл. Между участками расщепления рестриктаз *Cla*I и *Eco*I находится фрагмент ДНК, кодирующий сигналы экспрессии секреторной  $\alpha$ -амилазы (промотор, сайт связывания с рибосомой, сигнальный пептид). При встраивании по сайту *Eco*RI структурного гена чужеродного белка (интерферона, проинсулина) создается конструкция, обеспечивающая секрецию белка в культуральную жидкость.

них может достигать сотен мг в одном литре. При этом, как правило, один или два белка являются доминирующими, а общее число экскретируемых данным штаммом белков, не превышает десятка. Естественно, очистка из такой смеси целевого продукта гораздо проще, чем из смеси эндогенных клеточных белков.

Принцип конструирования экскретирующих векторов изображен на рис. 5.6. Идея метода заключается в соединении регуля-

**Т а б л и ц а 5.2. Белки, за синтез которых ответственны гены, клонированные в микроорганизмах**

Белок	Источник	Штамм-реципиент
Интерфероны	Человек Свинья	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Гормоны роста	Человек Бык	<i>Escherichia coli</i>
Проинсулин	Человек Рыба (кета)	<i>Escherichia coli</i>
Кристаллин (белок хрусталика глаза)	Лягушка	<i>Escherichia coli</i>
Поверхностные антигены вируса гепатита	Вирус гепатита	<i>Escherichia coli</i>

торной части и сигнального пептида какого-либо экскретируемого в большом количестве белка со структурной частью человеческого белка. Типичный пример такого подхода — экскреция гена  $\alpha$ -интерферона под контролем регуляторных элементов и сигнальной последовательности  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis*. Следует отметить тем не менее, что, несмотря на правильный процессинг, выход чужеродного белка в среду обычно в 100—1000 раз ниже, чем природного экскретируемого белка бацилл. Причина такого несоответствия в настоящее время интенсивно исследуется. Перечень некоторых белков, уже клонированных и экспрессированных в микроорганизмах, приведен в табл. 5.2.

## **5.2. КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ — ПРОДУЦЕНТОВ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ**

В предыдущем разделе мы рассмотрели задачи, возникшие вместе с геной инженерией, и решение их возможно только методами геной инженерии. Нам необходимо также рассмотреть возможности геной инженерии в решении проблем классической селекции микроорганизмов и традиционной микробиологической промышленности.

Все до сих пор реализованные на практике микробиологические процессы можно разделить на две группы. К первой группе относятся процессы, при которых микроорганизмы выступают в роли биологических катализаторов, обеспечивая превращение одних веществ в другие. К этому направлению относятся синтез вторичных и первичных метаболитов и биотрансформация. Ко второй группе процессов относится получение биомассы как целевого продукта (белок одноклеточных).

В обоих случаях для улучшения штаммов классическая селекция применяла мутагенез с последующим отбором. В тех случаях, когда это было возможно, применялись методы скрещивания или другие способы передачи генетической информации. В последние годы эффективным методом передачи генетической информации признано слияние протопластов. Тем не менее применение этих методов ограничено, так как мутации способны лишь изменить (скорее нарушить) систему регуляции микроорганизма. Генетический обмен помогает собрать в одной клетке полезные мутации и избавиться от вредных. Все до сих пор существовавшие методы генетического обмена ограничены пределами одного вида (или близкородственными видами), так как основаны на классической рекомбинации. На молекулярном уровне это означает высокую гомологию в последовательностях ДНК. С помощью методов геной инженерии создавалась возможность для введения новой генетической информации в клетку или увеличения копияности уже существующих генов.

Интересным примером изменения общих путей метаболизма у промышленно-важного микроорганизма является работа группы исследователей одного из английских химических концернов.



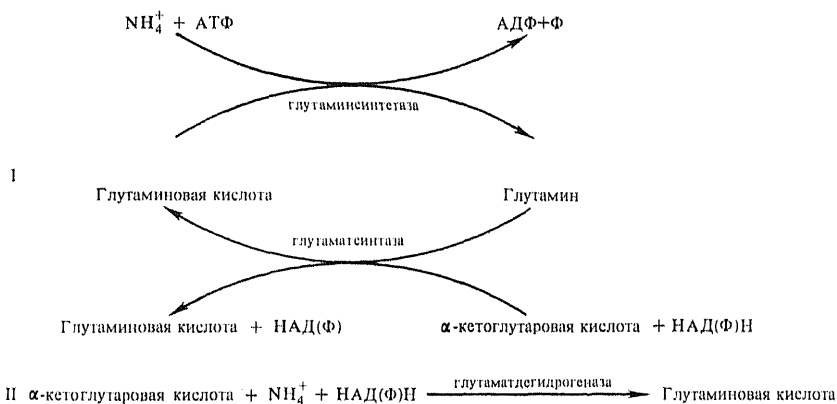


Рис. 5.7. Два пути ассимиляции аммония у бактерий:

*I* — при участии глутаминсинтетазы и глутаматсинтазы; *II* — при участии глутаматдегидрогеназы. Первый путь требует дополнительного расхода 1 мол. АТФ на каждую молекулу глутаминовой кислоты. Второй путь энергетически более экономичен, но часто реализуется только в присутствии относительно высоких концентраций  $\text{NH}_4^+$ -ионов

Фирма разработала способ получения богатого белком корма, заключающийся в выращивании бактерии *Methylophilus methylotrophus* на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода метанол. Процесс тем более экономичен, чем выше конверсия метанола в бактериальный белок. Исследователи обратили внимание на то, что *M. methylotrophus* обладают системой усвоения аммонийного азота ( $\text{NH}_4^+$ ), включающей два фермента: глутаминсинтетазу и глутаматсинтазу — и не обладают способностью ассимиляции  $\text{NH}_4^+$  при участии глутаматдегидрогеназы, в то время как *E. coli* имеет две системы. Путь усвоения  $\text{NH}_4^+$  через исходный синтез глутамата экономит одну молекулу АТФ на каждую молекулу глутаминовой кислоты, что энергетически является более выгодным (рис. 5.7). Однако традиционная селекция, включающая мутагенез и отбор, не может придать *M. methylotrophus* свойство, которое определяется наличием нового гена. Авторы использовали методологию генной инженерии и перенесли ген глутаматдегидрогеназы *E. coli* в клетки *M. methylotrophus* в составе многокопийной гибридной плазмиды и одновременно выключили обычный путь усвоения азота введением соответствующих мутаций в ген глутаминсинтетазы.

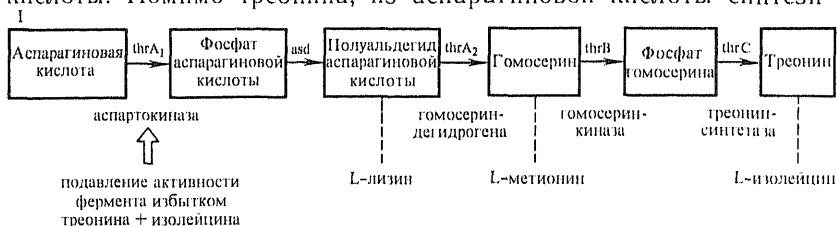
В результате изменения пути усвоения азота клетки *M. methylotrophus* стали способны к более высокой конверсии метанола в белок (возросла на 4—7%). Данная работа является примером нового направления генно-инженерных подходов к изменению микроорганизмов, а именно изменению путей основного метаболизма клетки.

Целевым продуктом микробиологического синтеза являются чаще всего (за исключением производства белка одноклеточных), первичные или вторичные метаболиты клетки или один из ее ферментов. Задачи и подходы, используемые для получения

штамма-продуцента какого-либо фермента, не отличаются от рассмотренных в предыдущем разделе. Обычно при создании такого штамма на практике преследуются две цели — увеличение выхода фермента или изменение его качества. Увеличение выхода может быть достигнуто либо амплификацией гена на многокопийных плазидах, либо подстановкой нужного фермента под новую систему регуляции. Для изменения качества обычно переносят ген из другого организма в штамм-продуцент и вводят его под контроль одноименного ферментного белка.

Примером изменения качества фермента является клонирование термостабильной  $\alpha$ -амилазы *Bacillus licheniformis* в *B. subtilis*. Для крупномасштабной индустрии чрезвычайно важно не изменять технологических схем ферментации, так как это связано с большими капитальными вложениями. Кроме того, переход к термофильным штаммам связан, как правило, с увеличением расхода сырья вследствие более активного метаболизма таких микроорганизмов. Поэтому наиболее экономичным способом получения термостабильных ферментов признан перенос генов их кодирующих в обычные продуценты, особенно в случае, если культивирование последних уже освоено промышленностью.

В течение 1977—1980 гг. во ВНИИгенетики на базе лабораторного штамма *E. coli* K12 сконструирован штамм-продуцент L-треонина — важной незаменимой аминокислоты, используемой в медицине и сельском хозяйстве. На рис. 5.8 изображен путь биосинтеза L-треонина, который образуется из аспарагиновой кислоты. Помимо треонина, из аспарагиновой кислоты синтези-



## II ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА ОБЛАСТИ ТРЕОНИНОВОГО ОПЕРОНА

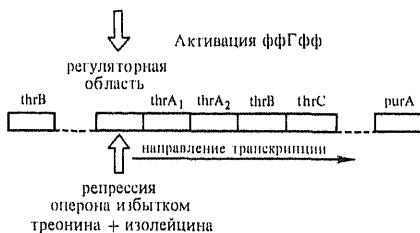


Рис. 5.8. Биосинтез L-треонина у *Escherichia coli*.

Существуют два уровня, на которых осуществляется контроль синтеза: I — подавление активности аспартокиназы (продукт гена *thrA*) избытком *thrG* + *thrE*; II — репрессия оперона теми же аминокислотами

Фиг. 1. Гомосериндегидрогена следует читать гомосериндегидрогеназа

руются лизин, метионин, изолейцин — так называемое аспарагиновое семейство аминокислот. В биосинтезе треонина принимают участие четыре фермента, три из которых контролируются генами треонинового оперона. Реакция превращения аспартилфосфата в полуальдегид аспарагиновой кислоты катализируется продуктом гена *asd*, не входящим в оперон. Эта стадия не лимитирует процесс. Поэтому в дальнейшем эта стадия нас интересовать не будет. Ген *thrA* ответствен за синтез полипептида, обладающего двумя ферментативными активностями: аспартокиназой и гомосериндегидрогеназой. Ген *thrB* кодирует гомосеринкиназу, а ген *thrC* — треонинсинтетазу.

Регуляция активности оперона осуществляется посредством мультивалентной репрессии (треонин + изолейцин). Кроме того, первый фермент цепи аспартокиназа — гомосериндегидрогеназа ингибируется треонином.

Из приведенной схемы (рис. 5.8) ясно, что для сверхпродукции треонина следует прежде всего преодолеть барьеры негативной регуляции избытком этой аминокислоты. Обычный путь селекции заключается в мутагенезе и отборе штаммов, устойчивых к структурному аналогу основного продукта. В данном случае использовалась селекция по устойчивости к  $\beta$ -оксинорваллину. Это вещество заменяет треонин при взаимодействии с аллостерическим центром ферментного комплекса аспартокиназы — гомосериндегидрогеназы. Естественно, что клетки становятся в таких условиях ауксотрофными по треонину и изолейцину и гибнут при росте на минимальной среде. Выживают лишь те клетки, у которых сняты барьеры негативной регуляции. Среди таких мутантов были отобраны две ценные мутации: 1) мутация в гене *thrA*, делающая продукт этого гена нечувствительным к избытку треонина; 2) мутация с частичным блоком на пути от треонина к изолейцину. Вследствие мультивалентного характера репрессии недостаток изолейцина в клетке может привести к дерепрессии оперона.

Таким образом, оба барьера негативной регуляции были преодолены. Тем не менее клетки *E. coli*, несущие такие мутации, не обладали способностью к сверхсинтезу треонина. Исследование причин этого явления привело к обнаружению того факта, что помимо негативной регуляции существует и позитивная регуляция аминокислотных оперонов, связанная с системой «строгого контроля», осуществляемой в клетках *E. coli* *gel*-белком. Белок, кодируемый геном *gel*, принимает участие в синтезе гуанозинтетрафосфата (ффГфф), который синтезируется на рибосомах при аминокислотном голодании клеток. Гуанозинтетрафосфат является своеобразным «гормоном» бактериальной клетки, влияет на многие пути биосинтеза. Этот тетра nucleотид ограничивает синтез рибосомной РНК и рибосомных белков, активирует многие аминокислотные опероны, усиливает протеолиз белков, т. е. осуществляет ряд функций, направленных на сокращение аминокислотного дефицита бактериальной клетки.

Установлено, что треониновый оперон находится под контролем *gel*-системы и функция гена *gel* необходима для сверхпродукции треонина. Исходный штамм, как и многие лабораторные штаммы *E. coli* K12, был дефектен по *gel*-гену. Введение нормального аллеля гена *gel* в такой штамм, несущий две вышеуказанные мутации, сразу привело к получению штамма-продуцента L-треонина, способного синтезировать 2—3 г/л этой аминокислоты.

Далее была предпринята попытка усилить сверхпродукцию треонина, увеличив число копий мутантного треонинового оперона в клетке *E. coli* путем клонирования этого оперона в составе многокопийной гибридной плазмиды. Полный треониновый оперон клонировали на плазмиде-векторе pBP322. Гибридная плазида, трансформированная в *E. coli* K12, существовала в микроорганизме стабильно (20 копий в клетку). Приблизительно во столько же раз в клетке увеличилось и количество ферментов, кодируемых треониновым опероном. Количество треонина, синтезируемого такими клетками *E. coli*, достигало 20—30 г/л. Это в два-три раза превышало лучшие мировые достижения того времени.

Но на этом работа по совершенствованию штамма не прекратилась, поскольку он обладал двумя существенными недостатками. Полученный продуцент, как и родительский штамм *E. coli* K12, рос на средах с глюкозой или фруктозой. Клеткам не хватало фермента, расщепляющего сахарозу, и, следовательно, штамм не мог расти на таком дешевом и доступном субстрате, как сахароза. Методом конъюгации недостающий ген (гены), ответственный за утилизацию сахарозы, был внесен в штамм-продуцент из родственного вида энтеробактерий.

Вопрос о стабилизации полученного штамма был решен следующим способом: в хромосоме штамма-продуцента локализована мутация, которую мы рассматривали выше, — это лики-мутация (частичный блок) по треониндезаминазе — первому ферменту на пути от треонина к изолейцину. Среди многих мутаций такого типа была выбрана одна, способная обеспечивать бактерию необходимым для роста количеством изолейцина при условии, что клетка производит треонин в очень больших количествах. Если по каким-либо причинам клетка перестает производить избыток треонина (потеря плазмиды, структурная перестройка плазмиды), то она уже не может обеспечить биосинтез нужного количества изолейцина и погибает. Как уже упоминалось, потеря плазмиды происходит с частотой около  $10^{-4}$  на одну генерацию. Гибель клеток в таком количестве не препятствует нормальному росту популяции. С другой стороны, клетки *E. coli*, потерявшие плазмиду, обычно обгоняют в скорости роста плазмидные варианты и довольно быстро вытесняют последние из популяции. Поэтому необходимо тем или иным методом устранять возникшие бесплазмидные клетки. Дальнейшая селекция, оптимизация условий ферментации привели к созданию рекорд-

ного процесса биосинтеза L-треонина, при котором за 30—40 ч ферментации накапливается до 55 г/л аминокислоты с конверсией по сахару, превышающей 40 %.

Другой пример успешного использования метода генной инженерии для создания промышленного штамма — это работа по конструированию продуцента витамина В<sub>2</sub> (рибофлавина) на базе *B. subtilis*.

Сложность данной работы заключалась прежде всего в том, что методы генной инженерии и генетики для бацилл не так хорошо развиты, как для *E. coli*. Поэтому были разработаны теоретические основы клонирования и трансформации плазмид в бациллы. В частности, выяснено, что для успешной трансформации бацилл мономерной формой плазмидной ДНК необходимо, чтобы в состав плазмид входили инвертированные или прямые повторы. В результате был сконструирован удачный вектор с инвертированными повторами — плазида рМХ30 (рис. 5.9). Эта плазида способна трансформировать клетки *B. subtilis* в мономерной форме, включать в свой состав крупные фрагменты ДНК и, что самое главное, стабильно поддерживается в бактерии без специальных селективных приемов. Семь генов, ответственных за биосинтез рибофлавина, сгруппированы у *B. subtilis* в один оперон (размер оперона 6,3 kd). Мутации, дерепрессирующие активность рибофлавинового оперона, были получены путем селекции штаммов, устойчивых к аналогам рибофлавина: 8-амино(нор)рибофлавиину, 8-рибатиламино (нор) рибофлавиину, розеофлавиину. Клонирование мутагенного рибофлавинового оперона на плазмиде рМХ30 с последующей селекцией позволило создать штамм *B. subtilis*, способный за 25—35 ч роста при 37 °С в условиях аэрации выделять в культуральную среду 3,5—4,5 г/л витамина В<sub>2</sub> при наличии в среде в качестве источника углерода мелассы (или сахарозы).

В Советском Союзе существует микробиологическое производство витамина В<sub>2</sub>, используемого в качестве добавки в корма сельскохозяйственных животных. Это производство основано на культивировании гриба *Erimotecium ashbyii*. Однако время ферментации при этом составляет более 70 ч, а концентрация продукта не превышает 2,0 г/л. Создание нового штамма-продуцента позволяет поднять продуктивность заводского производства минимум в четыре раза без больших капитальных затрат.

Перспективы применения генной инженерии для совершенствования штаммов микроорганизмов сегодня кажутся почти неограниченными. Безусловно, будет развиваться такое направление, как создание штаммов-продуцентов белков человека, сельскохозяйственных животных и растений. Это направление связано не только с медициной и ветеринарией, но и с пищевой промышленностью. Близки к завершению работы по созданию микробиологической технологии производства ренина (фермента сычуга телят), используемого в сыроделии, сладкого белка — тауматина (~ в 3000 раз слаще сахара) и других продуктов.

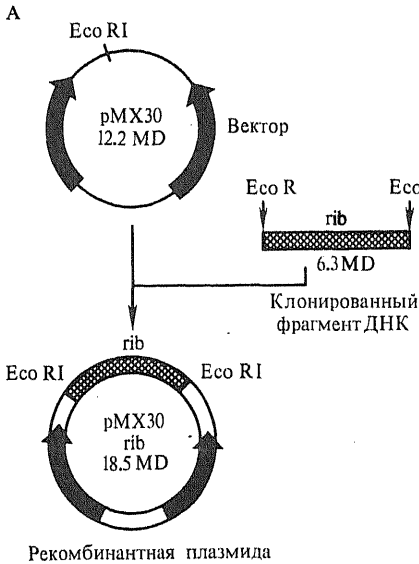
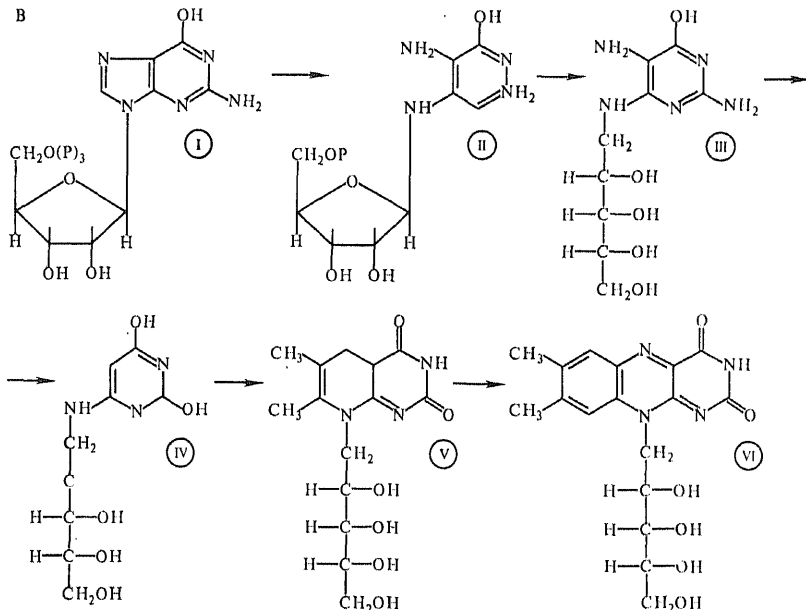
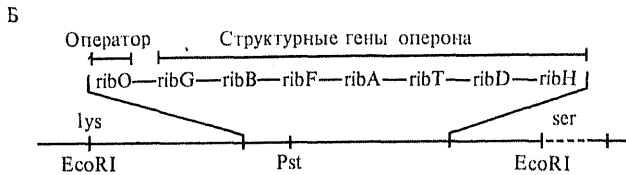


Рис. 5.9. Клонирование рибофлавинового оперона *Bacillus subtilis*. **A** — схема клонирования. Стрелками обозначены инвертированные повторы ДНК; **B** — структура рибофлавинового оперона; **B** — путь биосинтеза рибофлавина:

*I* — гуанозинтрифосфат, *II* — 2,5-диамино-6-гидрокси-4-(рибозиламино) пиримидин-5-фосфат, *III* — 2,5-диамино-6-гидрокси-4-(рибтиламино) пиримидин, *IV* — 5-амино-2,6-дигидрокси-4-(рибтиламино) пиримидин, *V* — 6,7-диметил-8-(риботил)-люмазин, *VI* — рибофлавин



Ведутся работы по совершенствованию штаммов дрожжей, используемых в пивоварении и виноделии. Этим организмам передаются гены, которые могут обеспечить усвоение пентоз, разрушение фенольных соединений, конкурентоспособность при росте в нестерильных условиях.

Начаты работы по созданию процесса переработки крахмала в этиловый спирт с помощью бактерий, что значительно ускоряет и удешевляет его производство.

Камнем преткновения часто является не методология генной инженерии, а неполное знание биохимических путей синтеза того или иного соединения и недостаточная разработанность генетики многих промышленных штаммов. Именно по этим причинам до сих пор не создан этим методом ни один штамм-продуцент антибиотиков, очень ограничено число штаммов-продуцентов первичных и вторичных метаболитов.

В заключение следует сказать, что техника генной инженерии — это не только инструмент для практического «улучшения» штаммов, но и мощный способ познания механизмов биосинтеза и регуляции метаболизма микроорганизмов. Дальнейшие успехи в конструировании высокопродуктивных штаммов микроорганизмов зависят от совместной работы микробиологов, генетиков, биохимиков и генных инженеров.

## **Глава 6 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Организация любого микробиологического процесса синтеза практически важных веществ начинается с изучения физиологии продуцента.

Необходимо изучить характер питания продуцента, а также влияние внешних факторов на состояние клеток и популяций. Вопросы эти выясняются путем оптимизации исследуемого процесса. Основой для этого является культивирование микроорганизмов в контролируемых и управляемых условиях.

Оптимизация давно существующих промышленных процессов начиналась с эмпирического подбора условий методом «проб и ошибок». При большой затрате времени и труда в конечном итоге устанавливали состав сред и режим культивирования, наиболее приемлемые экономически и, которые в дальнейшем также эмпирически возможно совершенствовать при ведении процесса в промышленном масштабе.

Долгое время не существовало иного способа культивирования микроорганизмов в лаборатории, кроме периодического: засев — размножение продуцента — сьем выросшей культуры и выделение нужного продукта из клеток или из среды.

В промышленности с давних пор существовали и другие способы культивирования микроорганизмов: непрерывно-проточный метод получения этилового спирта из мелассы и проточный метод

получения уксуса из спирта при помощи бактерий, иммобилизованных на твердой фазе — древесных стружках. Эти методы пришли в лабораторную практику на десятилетия позже, когда появились новые технические возможности и новые взгляды на проблемы культивирования микроорганизмов.

По мере развития технологии производства, изучения физиологии и биохимии микроорганизмов методы их культивирования в лаборатории и в промышленности совершенствовались и видоизменялись. Многие технологические приемы проведения химических реакций оказались пригодными для микробиологических процессов, прежде всего проведения их в реакторах — ферментерах со всем необходимым для этого оснащением. Существует ряд методов культивирования микроорганизмов, применяемых на лабораторном этапе разработки промышленного процесса, а затем ведутся в укрупненном масштабе в емкостях среднего размера (десятки литров) и, наконец, — в крупномасштабном варианте, в емкостях в сотни кубометров. Все методы культивирования микроорганизмов делятся на периодические и непрерывные.

#### **6.1. ПЕРИОДИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ — НАЧАЛО ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА**

Изучение процесса микробного биосинтеза обычно начинается с исследования динамики роста периодической культуры. Цикл развития периодической культуры (не имеющей аналогии с циклом развития многоклеточного организма) начинается с засева среды. Засев осуществляется в таком количестве, которое обеспечивает начало роста микроорганизмов с минимальной задержкой или даже без лаг-фазы. Лаг-фаза мало дает для понимания хода биосинтеза, ее наличие свидетельствует только о недостаточном хорошем качестве и количестве посевного материала или о неоптимальности условий для роста. Для многих микробиологических процессов активный «омоложенный» посевной материал применяют в количестве около 2 % от объема среды.

Прослеживают ход накопления биомассы и интересующего продукта, а также потребление исходного основного сырья, обычно углеродного. Для этого отбирают пробы развивающейся культуры с частотой, позволяющей уловить фазы экспоненциального роста, и заканчивают наблюдения после остановки роста (рис. 6.1) и накопления максимума целевого продукта. Полученные кривые роста и накопления продукта показывают, является ли его образование связанным с ростом биомассы, т. е. первичным, или это процесс второй фазы, когда рост заторможен, но выросшая биомасса может перерабатывать оставшийся недоиспользованным субстрат. Бывают, однако, случаи, когда интересующий продукт второй фазы начинает синтезироваться еще в фазу роста, так что подразделение процессов на одно- и двухфазные не носит абсолютного характера.



Наличие вторичных продуктов (метаболитов) в отличие от первичных в большинстве своем для жизни продуцента необязательно. Они образуются в том случае, когда состав среды таков, что для дальнейшего роста биомассы каких-либо компонентов начинает не хватать, но живые клетки способны синтезировать некоторые вещества и в среде имеются материалы для этого. Иногда вторичный биосинтез связан с видоизменением нормального роста клеток из-за лимитирования или ингибирования. Среди вторичных продуктов встречаются искаженные вещества клеточной оболочки, предшественники веществ, входящих в состав спор, производные аминокислот, пептидов, углеводов, нуклеотидов, а иногда их сложные комплексы. Типичными продуктами конструктивного метаболизма второй фазы роста культур являются антибиотики. Вторичными могут быть и продукты энергетического метаболизма. Например, у некоторых бродильных микроорганизмов продуктами первичного метаболизма углеводов часто являются органические кислоты, но при ингибировании роста создающимися экстремально кислыми условиями среды вместо них образуются нейтральные вещества — спирты, кетоны, которые часто и являются целевыми продуктами. Такая двухфазность брожений была открыта В. Н. Шапошниковым и распространена затем на другие процессы биосинтеза (см. гл. 1).

Во вторую фазу могут осуществляться и сверхсинтезы продуктов первой фазы роста культур, часто бесполезные в это время для самого продуцента. Состав среды может быть таким, что вещества, необходимые для нормального роста микроорганизмов, исчерпываются, но имеются субстраты и активные ферменты, участвующие в синтезе тех или иных продуктов нормального метаболизма первой фазы. Такими являются, например, витамины.

Способность к сверхсинтезам продуктов второй фазы особенно сильно выражена у специально полученных мутантов; последние имеют изменения в генетическом аппарате, препятствующие нормальному метаболизму. В результате реакции отклоняются в сторону обильного накопления веществ, необходимых клетке лишь в небольшом количестве. Среди них встречаются практически ценные продукты. Кроме генетического контроля вторичного синтеза и сверхсинтеза огромное значение имеет физиологический контроль, или управление метаболизмом популяций.

Биохимические механизмы изменения метаболизма обусловле-

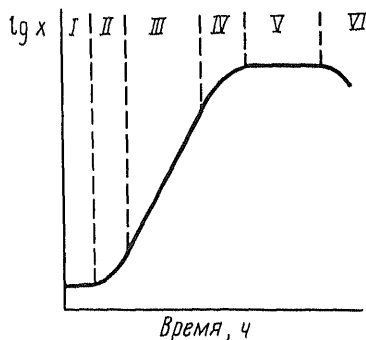


Рис. 6.1. Кривая роста микроорганизмов в полулогарифмическом масштабе:

$x$  — концентрация биомассы, I — лаг-фаза, II — фаза ускорения роста, III — экспоненциальная фаза, IV — фаза замедления роста, V — стационарная фаза, VI — фаза отмирания

ны репрессией и депрессией синтеза определенных ферментов или изменением их активности. Эти изменения часто в наибольшей степени выражены в среде, не оптимальной для роста, но оптимальной для биосинтеза определенного продукта. Для этого некоторые компоненты среды должны быть в недостатке, чтобы основное исходное сырье перерабатывалось биомассой в целевой продукт.

До недавнего времени лимитирующие рост факторы выявлялись только путем эмпирического поиска и обнаруживались случайно. Так установлено, что многие антибиотики, образуемые актиномицетами, синтезируются при лимитации роста продуцентов недостатком фосфата, для биосинтеза пенициллина требуется лимитация роста культур глюкозой, а для грамицидина С — молекулярным кислородом. Целенаправленные поиски факторов, необходимых для каждого процесса, лимитирующего или ингибирующего рост продуцентов, значительно сокращают подбор оптимальных условий для их биосинтеза. После получения заданного количества биомассы в условиях, оптимальных для роста культур, добавки элементов питания (кроме лимитирующего), обеспечивающие синтез продукта, могут продлить его образование.

Большинство промышленных микробиологических процессов ведут на сложных средах, часто используя отходы других производств или сельского хозяйства из-за их дешевизны. Естественно, что и в лабораторных условиях процесс отрабатывается на тех же средах. На сложных средах можно определить фазу наиболее активного биосинтеза целевого продукта, его скорость, продуктивность процесса, выявить оптимальную температуру, рН, степень аэрации. Для оптимизации роста микроорганизмов и получения продуктов первой фазы этого достаточно. Но на сложных средах невозможно выявить лимитирующие рост культур компоненты питания: источники углерода, азота, фосфора, витамины и др., недостаток которых приводит к синтезу вторичных метаболитов. Этот вопрос можно решить только на синтетических или полусинтетических средах. Если микроорганизмам необходимы витамины или аминокислоты, то их вносят в среду в небольших количествах, например, в виде автолизата или экстракта дрожжей, содержащих почти все необходимые витамины и аминокислоты. Если продуцент растет при небольших добавках дрожжевого автолизата, например, в пределах 0,2 г/л и рост возможен за счет потребления минеральных соединений азота (аммония или нитрата), то автолизат можно рассматривать как источник витаминов. Если же автолизат дрожжей требуется в больших количествах, а минеральные соединения азота не используются, то организм, следовательно, нуждается в готовых аминокислотах и (или) других органических веществах.

Применяя набор синтетических сред с заранее предусмотренным ограничением роста культур микроорганизмов известным компонентом, выявляют нужный для данного биосинтеза лимити-

рующий или ингибирующий фактор и нужные концентрации других компонентов, чтобы они не были в недостатке.

Если потребности микроорганизма неизвестны, то оптимизация условий питания и понимание физиологии продуцента затруднено. Полезно применение методов математического планирования экспериментов. Они ускоряют поиск оптимальных условий, но не заменяют собой изучение физиологии питания продуцента для понимания его потребностей в условиях роста и биосинтеза целевых продуктов.

## 6.2. НЕПРЕРЫВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Метод проточного непрерывного культивирования пришел в микробиологию из химической технологии. Принцип проточного культивирования состоит в том, что в сосуд, где размножаются микроорганизмы, непрерывно подается свежая питательная среда и одновременно вытекает такой же объем культуры. По такому принципу организуются две разновидности процессов непрерывного культивирования: процесс полного вытеснения и процесс полного смешения.

Непрерывные процессы имеют значительные преимущества перед периодическими: возможность специализации аппаратуры для каждой операции (стадии) непрерывного процесса, стабилизации его во времени, улучшение качества продукта, легкость регулировки и, главное, возможность автоматизации. Этими преимуществами объясняется тенденция микробиологов к переходу от периодических процессов к непрерывным.

### 6.2.1. Процесс полного вытеснения

Сосуд для выращивания микроорганизмов (трубчатый ферментер) представляет собой трубку, расположенную горизонтально или вертикально, в которую втекают среда и посевной материал и вытекает культура (рис. 6.2). Перемешивания не производится. Так можно культивировать микроорганизмы, не требующие аэрации. С одного конца ферментера подаются среда и посевной материал, популяция находится в начале своего развития. По ходу трубки культура «стареет», субстрат исчерпывается, накапливаются продукты метаболизма и вытекающая культура находится в состоянии, аналогичном стационарной фазе роста периодической культуры. Таким образом, в ферментере воспроизводится полная кривая роста, но не во времени, а в пространстве.

В настоящее время появились ферментационные аппараты, обеспечивающие процессы с режимом, при-

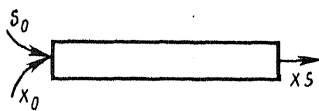


Рис. 6.2. Трубчатый ферментер полного вытеснения:

$s_0$  — концентрация субстрата в поступающей среде,  $s$  — концентрация субстрата в вытекающей среде,  $x_0$  — начальная концентрация биомассы,  $x$  — концентрация вытекающей биомассы

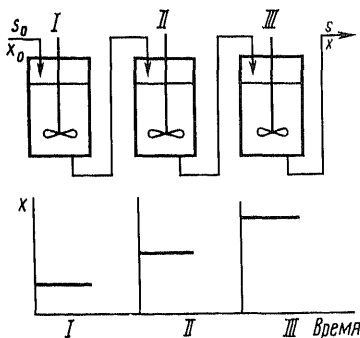


Рис. 6.3. Рост микроорганизмов в батарее аэрируемых ферментеров (I—III). Обозначения см. на рис. 6.2

вести процесс, аналогичный тому, который ведется в периодическом режиме.

Пример практического применения трубчатого ферментера — анаэробная стадия при производстве пива в башенных проточных емкостях. В этом случае не требуется аэрирования и процесс идет без перемешивания. Если этот процесс аэробный, то его ведут в батарее аэрируемых ферментеров (рис. 6.3). При этом кривая роста периодической культуры распределяется по ходу батареи.

## 6.2.2. Процесс полного смешения

В процессе полного смешения рост культур происходит в емкости — ферментере при интенсивном перемешивании. Перемешивание достигается продуванием воздуха или работой мешалки (или тем и другим одновременно). Во всей массе культуры условия должны быть совершенно одинаковыми. Этот метод культивирования получил название гомогенно-непрерывного. В ферментере создаются условия, соответствующие одной точке кривой роста культуры. При больших потоках среды эти условия близки к быстрому экспоненциальному росту, при малых — приближаются к условиям стационарной фазы роста культур. При таком методе может быть воспроизведена любая точка роста периодической культуры — от начала замедления роста после экспоненциальной фазы и до конца стадии замедления роста. В установившемся режиме скорость потока среды, отнесенная к единице объема культуры в ферментере, называется коэффициентом разбавления  $D$ . Она равняется удельной скорости роста  $\mu$ . При этом культура находится в устойчивом стационарном состоянии (динамическое равновесие,  $D = \mu$ ) и обладает способностью самопроизвольно автоматически подстраиваться к изменениям условий.

ближающим к полному вытеснению и при аэробном культивировании. Это вращающиеся трубчатые реакторы с насадкой или внутренними аэрирующими элементами, а также многосекционные колонные аппараты.

Процесс полного вытеснения применяется в промышленности в тех случаях, когда желательно избежать потери времени на опорожнение, стерилизацию и заполнение емкости. Его применяют в пищевой промышленности, когда используются сложные среды и стоит задача наиболее экономично про-

Если условия изменятся таким образом, что рост ускорится, то в ферментере повысится концентрация биомассы ( $x$ ) и понизится концентрация субстрата ( $s$ ). Если рост замедлится, концентрация биомассы понизится, а остаточное содержание лимитирующего рост субстрата повысится.

Если изменения условий временные, то при возвращении к исходным установится исходное стационарное состояние. На изменение скорости потока культура реагирует соответствующим изменением концентрации биомассы и остаточной концентрации субстрата, ограничивающей рост, не выходя из стационарного состояния. При неизменности условий проточные культуры способны к полной воспроизводимости концентрации биомассы. Но при таком способе культивирования нельзя получить устойчивого состояния только при максимальной скорости роста. Повышение скорости потока или взаимодействие, замедляющее рост, приводит к тому, что скорость роста ( $\mu$ ) окажется меньше коэффициента разбавления ( $D$ ) и культура вымывается из ферментера. Воспроизведение в потоке определенной точки кривой роста культур широко применяется в промышленности при наращивании биомассы микроорганизмов. Хорошо отработанный периодический процесс выращивания экономически выгодно воспроизводить в проточном варианте, так как культура непрерывно находится в состоянии максимальной активности нужного процесса, не тратится время на освобождение, заполнение емкостей и на лаг-фазу.

При наращивании биомассы в проточных условиях процесс стремится вести при возможно большей скорости потока, но не настолько большой, чтобы в среде оставался недоиспользованный субстрат. Ограничивающим фактором часто является интенсивность аэрации. Из-за слабой растворимости молекулярного кислорода следует применять только такую концентрацию субстрата, которая может быть использована при доступной для данной аппаратуры степени аэрирования. При необходимости переработать высокие концентрации субстрата применяется батарея ферментеров, в каждом из которых успевает использоваться только его часть. Чем выше концентрация субстрата, тем больше ферментеров необходимо иметь в батарее. При всех процессах, связанных с фазой роста культур, считается целесообразным применение проточного культивирования, как более экономичного с технологической точки зрения.

Если периодический процесс идет без учета действия лимитирующих и ингибирующих факторов, то эта неопределенность останется и при переводе его на непрерывный режим. При разных скоростях потока рост культур может быть ограничен разными факторами. Недостаток одного компонента питания при одной скорости роста может смениться недостатком другого компонента при другой скорости и притом без ведома экспериментатора. При наращивании биомассы на сложных средах иногда нет необходимости выявлять смену лимитирующих факторов при

разных скоростях потока. Это возможно в тех случаях, когда хотя бы воспроизвести в проточных условиях хорошо отработанный периодический процесс.

### 6.2.3. Хемостатное культивирование

Хемостатное культивирование — это вариант гомогенного проточного культивирования с заданным желаемым коэффициентом разбавления ( $D$ ), к которому подстраивается скорость роста культур ( $\mu$ ). Последняя может быть минимальной или близкой к максимальной. При этом задается также фактор, который обуславливает ограничение концентрации вырастающей биомассы. Концентрация биомассы определяется одним определенным компонентом питания. При низком коэффициенте разбавления лимитация, т. е. голодание, будет сильной, при высоком — слабой. То же наблюдается и в отношении отравления микроорганизмов ингибиторами: при низком коэффициенте разбавления клетки долго соприкасаются с ингибитором и бывают сильно отравлены, при высоком они недолго пребывают в ферментере и отравлены в слабой степени. Однако при высокой скорости роста клетки могут быть более чувствительны к ингибитору.

Хемостатный метод культивирования незаменим в лабораторных исследованиях физиологии микроорганизмов и клеток тканей. В промышленности он применяется при наращивании микробной биомассы, если известно, какой именно фактор ограничивает рост.

### 6.2.4. Теория хемостатного культивирования

Для хемостатной культуры существуют определенные количественные зависимости между концентрацией биомассы  $x$ , концентрацией субстрата  $s$  и скоростью роста  $\mu$ . Рост культуры характеризуется хемостатной кривой, изображающей зависимость концентрации клеток  $x$  и концентрации субстрата  $s$  от скорости разбавления  $D$  (рис. 6.4).

Скорость разбавления при установившемся стационарном состоянии, когда культура развивается с постоянной скоростью и все условия неизменны, равна удельной скорости роста:

$$D = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \mu. \quad (1)$$

Удельная скорость роста — это прирост биомассы в единицу времени.

Скорость разбавления среды в ферментере в расчете на единицу объема —  $D$  — равняется отношению  $F$  — скорости потока к  $V$  — объему культуры. Обратная величина  $V/F = t_r$  — время замещения имеющейся среды новой, или время пребывания в ферментере каждого элемента среды.

Баланс биомассы  $x$ , имеющейся в ферментере при стационарном состоянии, определяется уравнением

нарном состоянии, составляется следующим образом: изменение количества биомассы = рост — вытекшая биомасса.

$$\text{Скорость роста} = \frac{dx}{dt} = (\mu - D)x. \quad (2)$$

Баланс лимитирующего рост субстрата: изменение количества субстрата = приток — унос — потребление субстрата микроорганизмами.

$$\text{Скорость потребления субстрата} = \frac{ds}{dt} = D(s_r - s) - \mu x / Y, \quad (3)$$

где  $Y$  — экономический коэффициент, или доля потребленного субстрата, пошедшая на синтез биомассы;  $s_r$  — концентрация субстрата в поступающей среде,  $s$  — концентрация субстрата в ферментере.

Скорость роста в стационарном состоянии в ферментере:

$$\mu = \mu_m s / (s + K_s), \quad (4)$$

где  $\mu_m$  — максимально возможная скорость роста,  $K_s$  — константа Моно, или константа насыщения. Она численно равна той остаточной концентрации лимитирующего субстрата, которая, ограничивая рост, замедляет его вдвое.

Концентрация субстрата в ферментере в стационарном состоянии культуры:

$$s = K_s D / (\mu_m - D). \quad (5)$$

Концентрация биомассы в ферментере в стационарном состоянии:

$$x = Y(s_r - s) = Y[s_r - K_s D / (\mu_m - D)]. \quad (6)$$

В хемостате практически можно только приблизиться к  $\mu_m$ , но не достичь его. Скорость разбавления, при которой биомасса вымывается из ферментера, называется  $D$  критической ( $D_{кр}$ ). Теоретически  $D_{кр} = \mu_m$ , но поскольку концентрация лимитирующего субстрата в аппарате не может быть больше  $s_r$ , то

$$D_{кр} = \mu_m \frac{s_r}{s_r + K_s}. \quad (7)$$

Производительность ферментера по выходу биомассы:

$$R = Dx. \quad (8)$$

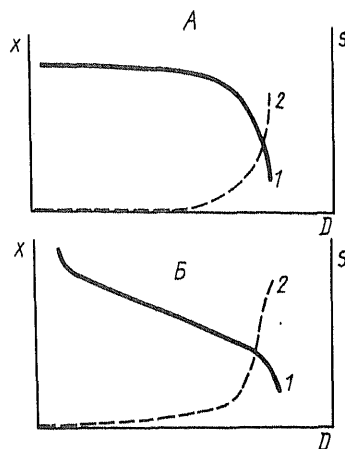


Рис. 6.4. Классическая хемостатная кривая у аэробов (А) и хемостатная кривая у факультативных аэробов (Б). По мере возрастания скорости разбавления ( $D$ ) усиливаются менее экономичные анаэробные процессы и концентрация биомассы ( $x$ ) снижается:

1 — концентрация биомассы  $x$ , 2 — концентрация остаточного субстрата  $s$

Зная основные константы  $K_s$ ,  $\mu_m$  и  $Y$ , можно рассчитать параметры культуры  $x$  и  $s$  для любого значения  $\mu = D$ .

### 6.2.5. Варианты хемостатного культивирования

Хемостатный метод имеет большое количество вариантов. Одностадийное культивирование применяется при необходимости воспроизвести любую скорость роста культур, кроме максимальной. Двухстадийное культивирование в двух последовательных ферментерах позволяет наблюдать культуры при максимальной скорости роста и создать условия для ее превышения. Для этого в первом ферментере ведется культивирование при  $D < \mu_m$ , а во второй подается культура из первого и добавляется свежая среда (рис. 6.5). Во втором ферментере происходит повышение скорости потока вплоть до превышения  $\mu_m$ , а вымывания не происходит, так как из первого ферментера непрерывно поступает культура.

Максимальная скорость роста может быть достигнута при турбидостаточном методе регулирования, который является вариантом хемостатного, в этом случае скорость потока среды устанавливается не экспериментатором, а автоматически, по сигналу датчика, регистрирующего концентрацию клеток. Для этого ферментер должен иметь устройство для нефелометрического измерения мутности, зависящей от концентрации клеток ( $x$ ) и для регулирования скорости потока среды так, чтобы  $x$  оставалось постоянным. Этот метод культивирования позволяет поддерживать культуру в устойчивом состоянии на границе вымывания из ферментера, так как при снижении концентрации клеток перестает подаваться среда. Турбидостат дает возможность изучать влияние внешних факторов на максимальную скорость роста культур и на состояние клеток при этом (рис. 6.6).

Сигналом для подачи среды может быть не только плотность

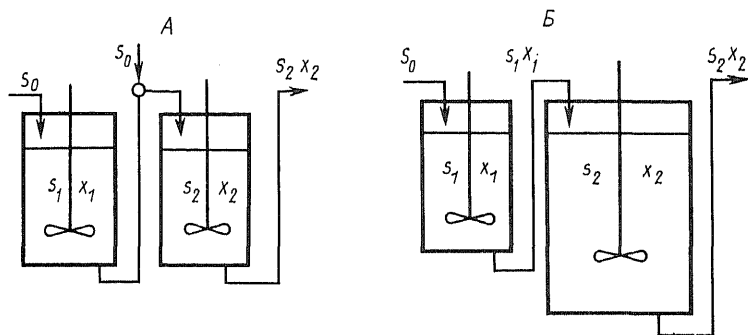


Рис. 6.5. Двухстадийный хемостат с дополнительной подачей во вторую стадию (А); двухстадийный хемостат (Б):

$s_0$  — концентрация субстрата в подаваемой среде,  $s_1$  — в первом ферментере,  $s_2$  — во втором ферментере,  $x_1$  — концентрация клеток в первом ферментере,  $x_2$  — во втором ферментере



(мутность), но и любой параметр среды, измеряемый электродом или другим устройством, переводящим величину измеряемого параметра в величину электрического потенциала. Последний усиливается и приводит в действие работу насоса, подающего раствор или питательную среду. Для процессов культивирования, имеющих прямую связь между приростом биомассы и изменением значения рН среды (например, при потреблении физиологически кислого соединения азота), используется рН-статный способ управления скоростью потока среды. Скорость потока с помощью автоматических устройств уравнивается со скоростью изменения рН растущей популяцией, а следовательно, и со скоростью роста культур. Это обеспечивает поддержание рН на заданном уровне, а скорость роста является максимальной в данных условиях. Изменяя условия, можно проследить за соответствующими изменениями максимальной скорости роста культур.

В двухстадийной системе можно воспроизвести во втором ферментере вторую фазу роста периодической культуры, связанную с синтезом вторичного продукта метаболизма. В первом ферментере ведется выращивание культуры при большой скорости роста, что соответствует первой фазе периодической культуры. Второй ферментер берется большего размера или содержит больше среды. Поэтому поступающая из первого ферментера культура оказывается в условиях замедленного роста в такой степени, в какой во втором ферментере содержится больше среды, чем в первом. Скорость роста во втором ферментере должна соответствовать скорости роста во второй фазе, оптимальной для синтеза вторичного продукта.

При низких концентрациях субстрата и при низкой концентрации клеток можно возвратить в ферментер часть вытекающей из него биомассы; возврат повышает ее концентрацию и ускоряет процесс. Вариантов возврата биомассы может быть несколько. Сепарируют вытекающую культуру и сгущенную часть возвращают в ферментер. Устанавливают различные фильтрующие устройства, позволяющие вытекать культуральной жидкости, но задерживающие клетки. Известны и другие методы культивирования.

1. *Отъемно-доливной метод.* Среда подается в проточный ферментер порциями. Отъем культуры также производится порциями или происходит постоянный слив. Кривая концентрации клеток приобретает вид гребенки.

2. В практике стерильного наращивания патогенных бактерий

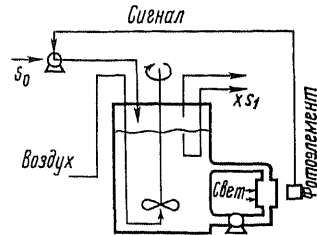


Рис. 6.6. Схема турбидостата. Подача среды осуществляется по «команде» нефелометра, измеряющего концентрацию клеток в контуре, по которому насосом прокачивается культура из ферментера:

$s_0$  — концентрация субстрата в подаваемой среде,  $s_1$  — концентрация субстрата в вытекающей культуре,  $x$  — концентрация клеток

для получения вакцин применяют *многократное выращивание без стерилизации* перед каждым циклом. Из ферментера после окончания цикла роста сливается не вся культура (небольшая часть остается). К ней добавляется стерильная среда и цикл наращивания повторяется. Так ведут несколько циклов.

3. *Продленная периодическая культура, или метод подпитки.* К периодической культуре добавляются компоненты питания — обычно соединение углерода по мере его исчерпания. Культура не страдает от избытка соединения углерода в начале роста, что неизбежно в обычной периодической культуре, и сразу начинает быстрый рост, который идет с постоянной скоростью до полного исчерпания всех компонентов питания.



Другой способ продления роста — это диализ. Культивирование ведут в гильзе, не проницаемой для клеток, но пропускающей растворенные вещества. Гильза с культурой погружена в питательную среду, которая может быть проточной. Из среды поступают компоненты питания и в нее же выносятся продукты метаболизма. Таким путем получают сильно концентрированную биомассу.

Основные методы культивирования микроорганизмов представлены на схеме.

## 6.2.6. Аппаратура

Хемостатный метод культивирования требует довольно сложного оборудования. Современные лабораторные установки состоят из следующих частей: ферментер емкостью 0,5—2,0 л или больше с термостатированием; аэрация (если необходима) осу-

ществляется мешалкой с регулируемым числом оборотов и подачей воздуха с регулируемой скоростью; электроды для измерения pH с устройством для автоматического поддержания заданного уровня; электрод для измерения насыщения среды кислородом. Показания датчиков температуры, pH и кислорода могут регистрироваться автоматически самописцами. Имеется дозирующий насос для подачи среды, иногда дополнительные насосы для подачи некоторых ингредиентов среды отдельно. Вся аппаратура размещается на стенде.

На сегодняшний день этот перечень является достаточно полным, обеспечивающим решения разных задач физиологии и биохимии микроорганизмов. В зависимости от стоящих вопросов возможно упрощение установки вплоть до использования небольшого стеклянного сосудика с магнитной мешалкой и склянкой Мариотта, обеспечивающей постоянство потока среды.

### **6.2.7. Техника хемостатного культивирования на лабораторной стендовой установке**

Ферментер, подготовленный для работы, стерилизуется в автоклаве. Электроды, выходящие из строя под действием высокой температуры, стерилизуют химическими реагентами, отмывают стерильной водой и вставляют в стерильный ферментер. Лучшим стерилизующим средством является 2%-ный  $\beta$ -пропионилактон (выдержка — 40 мин). Возможна стерилизация выдерживанием в подкисленном 70%-ном этиловом спирте (2%  $H_2SO_4$ ) и в 33%-ном перексиде водорода по 40 мин. После стерилизации производится засев ферментера. При достижении экспоненциальной фазы роста культуры включается поток среды. Отток культуры идет через сливную трубку, которая должна обеспечить вывод среды из нижнего слоя. Слив сверху также возможен, но иногда осложняется вспениванием культуры и концентрированием клеток в пене. Стационарное состояние при данной скорости потока считается установившимся, если плотность популяции не изменяется в течение не менее 5—7 поколений (*g*). Культура сливается в охлаждаемые емкости, например сосуды Дьюара, чтобы приостановить всякие изменения в клетках, предназначенных для анализа. Если нет нужды получать большие количества клеток и культуральной жидкости для анализа, то пробы лучше отбирать непосредственно из ферментера. Обрастание стенок ферментера и мешалки микроорганизмами является большой помехой для длительных исследований. Поэтому до сих пор имеется мало работ по выращиванию в хемостате грибов и актиномицетов, особенно склонных к обрастаниям. Во избежание возникновения и отбора спонтанных мутантов не рекомендуется вести хемостатную культуру более четырех недель. Засев всегда необходимо делать из специально выращенной культуры (не из ферментера). Для получения хемостатной кривой обычно начина-

ют с малых скоростей потока, добиваются устойчивого стационарного состояния при каждом значении  $D$  и достигают  $D_{кр}$ , близкого  $\mu_m$ , когда концентрация биомассы снижена, а концентрация остаточного лимитирующего субстрата повышена. При культивировании анаэробов через культуру продувают азот или аргон.

### **6.2.8. Преимущества и особенности хемостатного культивирования при изучении физиологии микроорганизмов**

Хемостатный метод культивирования позволяет установить особенности физиологического состояния клеток, тщательно изучить действие недостатка компонентов питания или ингибитора. Клетки могут быть подвергнуты действию разных факторов в любой степени — от едва заметного замедления роста до глубокого голодания или отравления, когда поток среды и, следовательно, рост сильно замедлены. При непрерывном хемостатном культивировании любая, большая или малая, скорость потока среды и, соответственно, скорость роста может быть установлена на любое время и связанное с этим длительное или короткое время пребывания клеток в ферментере обеспечивает длительное или кратковременное влияние на них изучаемого фактора. При культивировании аэробов аэрация должна быть определенной, охарактеризованной сульфитным числом и контролируемой кислородным электродом. Количество доставляемого кислорода должно быть избыточным, чтобы не стать неожиданным лимитирующим фактором при изменении условий в ферментере. Ингибирования избытком кислорода в обычных условиях не наблюдается (5—10% от насыщения обычно достаточно для аэробных микроорганизмов).

Хемостатное культивирование позволяет применить разные методы для изучения физиологического состояния как микробных, так и растительных и животных клеток, исследовать их реакции на любые факторы среды. Изучение поведения клеток в зависимости от окружающих условий имеет огромное значение для управляемого культивирования и направления физиологических процессов в желаемую сторону.

При изучении тех или иных микробиологических процессов как в условиях потока, так и в периодических или острых опытах особое внимание необходимо обращать на установление связи между остаточными концентрациями субстратов, продуктов метаболизма в среде и скоростями протекания процесса (рост биомассы, биосинтез продуктов обмена веществ). В конечном счете именно эти зависимости являются фундаментальной основой для понимания процесса в различных вариантах аппаратного воплощения.

### 6.3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Штаммы производственных микроорганизмов могут быть охарактеризованы количественно. Это позволяет проводить их сравнительный анализ. Количественные характеристики штаммов позволяют рассчитать экономические показатели процессов биосинтеза. Они также служат для направления усилий по улучшению качества продуцентов. Количественные показатели можно улучшить путем подбора мутантов и путем оптимизации условий среды.

#### 6.3.1. Скорость роста

Скорость роста характеризуется чаще всего удельной скоростью роста  $\mu$ :

$$\mu = \frac{dx}{dt} \frac{1}{x}, \quad (9)$$

где  $dx$  — превращение микробной биомассы за бесконечно малый промежуток времени  $dt$ . Эта величина показывает, каков прирост биомассы за малый промежуток времени, пересчитанный на единицу растущей биомассы. Ее размерность обычно выражается в доле прироста за час. Штаммы микроорганизмов характеризуются максимально возможной скоростью роста в данных условиях  $\mu_m$ . Эта величина определяется по кривой роста гомогенно растущей периодической культуры. Изучается кривая роста с отбором проб для определения концентрации биомассы с достаточной частотой, что позволяет проследить все фазы роста культур. Кривая строится в полулогарифмическом масштабе (рис. 6.7).

Лag-фаза определяется графически, как показано на рис. 7. Экспоненциальная фаза представлена отрезком кривой, имеющим линейный характер. В этот промежуток времени делаются измерения концентрации клеток и вычисляется по формуле  $\mu$ :

$$\mu = \frac{2,3 (\lg x_2 - \lg x_1)}{t_2 - t_1}, \quad (10)$$

где  $x_2$  и  $x_1$  — концентрации клеток во время  $t_2$  и  $t_1$ , 2,3 — коэффициент перехода от натуральных логарифмов к десятичным. Рассчитанная максимальная удельная скорость роста культуры является средней за период времени  $t_2 - t_1$ , относящейся к экспоненциальной фазе. Удельная скорость

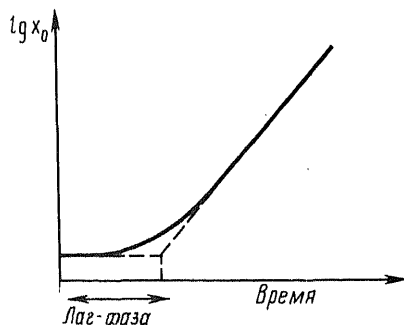


Рис. 6.7. Определение длительности лag-фазы

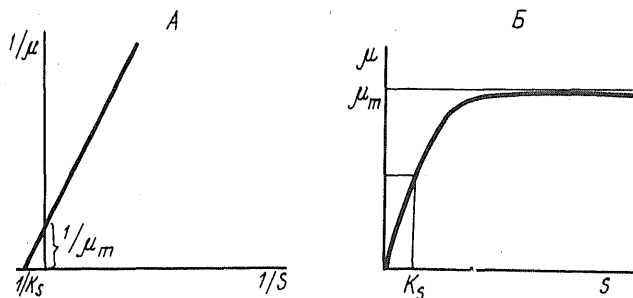


Рис. 6.8. Схема определения  $K_s$  и  $\mu_m$  методом обратных величин по Лайнуверу и Бэрку.

На рис. А прямая отсекает на осях координат  $1/\mu_m$  и  $1/K_s$ , откуда находят  $\mu_m$  и  $K_s$ ; Б — зависимость  $\mu$  и  $S$  и графоаналитическое определение  $K_s$ .

роста микроорганизмов, когда это необходимо, рассчитывается и для других этапов развития периодической культуры.

Значение  $\mu$ , установленное в экспоненциальной фазе роста периодической культуры, близко к своему теоретическому значению. Последнее является пределом, к которому стремится  $\mu$  в отсутствие ингибиторов и при достаточной концентрации субстрата. Оно находится графо-аналитическим методом (рис. 6.8). Для упрощения  $\mu$  в экспоненциальной фазе называют  $\mu_m$ , что не вполне точно.

Иногда бывает необходимым определять валовую (общую) скорость роста  $v$ , характеризующуюся абсолютным приростом биомассы за единицу времени:

$$v = \frac{dx}{dt}. \quad (11)$$

Среднюю скорость роста за определенный промежуток времени вычисляют по формуле

$$v_{\text{ср}} = \frac{x_2 - x_1}{t_2 - t_1}. \quad (12)$$

Как  $\mu$ , так и  $v_{\text{ср}}$  характеризуют данную культуру в данных условиях и не являются количественной характеристикой штамма.

Скорость роста может характеризоваться также временем удвоения количества биомассы или числа клеток —  $g$  (или временем генерации):

$$g = t_{\text{удв}} = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu}. \quad (13)$$

Концентрацию биомассы выражают массой высушенных клеток или их числом в мл. Последний способ менее распространен, так как размер клеток может сильно изменяться по ходу кривой роста периодической культуры и в зависимости от условий культивирования.

### 6.3.2. Экономический коэффициент, или выход биомассы ( $Y$ )

Экономический коэффициент определяется отношением

$$\Delta x / \Delta s = Y, \quad (14)$$

где  $\Delta x$  — увеличение количества биомассы, соответствующее потреблению субстрата в количестве  $\Delta s$ .

У периодических культур определяется средняя величина за весь период роста. Вычтя из количества выросшей биомассы  $x$  массу посевного материала  $x_0$  и поделив на количество потребленного питательного вещества, получим:

$$Y_{\text{ср}} = \frac{x - x_0}{s_0 - s} = Y_{x/s}, \quad (15)$$

где  $s_0$  — концентрация питательного вещества в исходной среде,  $s$  — остаточная концентрация.

Естественно, что  $x_0$  часто бывает пренебрегаемо мало.

В непрерывной культуре

$$Y_{x/s} = \frac{x}{s_0 - s}, \quad (16)$$

где  $s_0$  — концентрация питательного вещества в поступающей среде;  $s$  — концентрация в культуре, вытекающей из ферментера;  $x$  — содержание биомассы в 1 мл вытекающей культуры.

Экономический коэффициент может определяться за разные сроки культивирования. Данный штамм характеризуется  $Y_{x/s}$  в период экспоненциального роста. При его замедлении вследствие лимитирования или ингибирования  $Y_{x/s}$  снижается. Экономический коэффициент может рассчитываться в отношении потребления любого субстрата, прежде всего углеродного, а также и в отношении кислорода и вообще любого компонента питания.

### 6.3.3. Метаболический коэффициент ( $q$ )

Метаболический коэффициент — это удельная скорость метаболизма  $q$ , или физиологическая активность. Метаболический коэффициент характеризуется уравнением

$$q_s = \frac{ds}{dt} \frac{1}{x}. \quad (17)$$

$$q_p = \frac{dp}{dt} \frac{1}{x}, \quad (18)$$

где  $x$  — концентрация биомассы,  $t$  — время,  $s$  — концентрация потребляемого субстрата,  $p$  — концентрация образованного продукта.

$ds/dt$  и  $dp/dt$  выражают скорость потребления питательных веществ и, соответственно, скорость образования продукта, а  $q$  является удельной скоростью потребления субстрата или образования продукта.

Далее вычисляется средняя физиологическая активность за время  $t_2 - t_1$ :

$$q_s = \frac{s}{(t_2 - t_1) \cdot x_{cp}}, \quad (19)$$

$$q_p = \frac{p}{(t_2 - t_1) \cdot x_{cp}}, \quad (20)$$

где  $x_{cp}$  — средняя концентрация биомассы за данный период времени.

Если за время опыта количество микробной массы увеличится сравнительно немного (не более чем в 2—3 раза), то можно пользоваться средним арифметическим из начальной и конечной концентрации биомассы:

$$x_{cp} = \frac{x_2 + x_1}{2}. \quad (21)$$

Если же на протяжении опыта культура росла экспоненциально и ее биомасса увеличилась значительно, то среднюю ее концентрацию вычисляют по следующей формуле:

$$x_{cp} = \frac{x_2 - x_1}{2,3(\lg x_2 - \lg x_1)}. \quad (22)$$

Величина  $q$  непостоянная, она определяется скоростью роста микроорганизма и условиями культивирования. При непрерывном культивировании

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} = \frac{s_0 - s}{x \cdot \mu}, \quad (23)$$

$$q_p = Y_{p/x} \mu = \frac{p}{x} \mu, \quad (24)$$

где  $\mu = D$ ,  $Y_{p/x}$  — выход продукта, отнесенный к образовавшейся биомассе.

Важная характеристика процесса биосинтеза также  $Y_{p/s}$  — выход продукта, отнесенный к использованному субстрату.

Если продукт связан с ростом культуры, то его количество прямо пропорционально образованной биомассе. Значение  $Y_{p/x}$  для продукта, не связанного с ростом, — сложная функция удельной скорости роста, а также условий культивирования и зависит от того, происходит ли синтез продукта совершенно независимо от роста или связан с ним частично.

### 6.3.4. Затраты на поддержание жизни без размножения ( $m$ )

Неразмножающиеся клетки, не имеющие какого-либо компонента питания или ингибированные — отравленные, постепенно отмирают. Однако при наличии некоторого минимального количества энергетического субстрата (окисляемого вещества), а для аэробов и молекулярного кислорода клетки могут существовать





субстрата. В микробиологии константа насыщения заменена на аналогичную зависимость скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата:

$$\mu = \mu_m \frac{s}{s + K_s}. \quad (26)$$

Это уравнение называют уравнением Моно, поскольку он впервые привлек к характеристике роста микроорганизмов определение активности ферментов.

Субстратная константа характеризует сродство субстрата к ферментам клетки, ответственным за транспорт субстрата через клеточную мембрану, и показывает, насколько полно субстрат может быть извлечен из среды. Она численно равна концентрации субстрата, при которой коэффициент скорости роста равен половине  $K_s$ . Это важная характеристика промышленных штаммов, так как она позволяет определить количество оставшегося неиспользованным субстрата, зависящее от природы микроорганизма: зависимость ее от условий культивирования мало изучена.

Величина  $K_s$  определяется в коротких острых опытах, аналогичных применяемым в энзимологии: определяется начальная скорость роста культуры в среде с различными концентрациями субстрата. Одновременно определяется и  $\mu_m$  (рис. 6.10). Отмытые от субстрата клетки из культуры в экспоненциальной фазе роста помещаются в среды с различными (очень низкими) концентрациями исследуемого субстрата. Через короткий промежуток времени  $t_2 - t_1$  измеряется концентрация биомассы и вычисляется величина удельной скорости роста:

$$\mu = \frac{2,3 (\lg x_2 - \lg x_1)}{t_2 - t_1}. \quad (27)$$

Промежуток времени должен быть минимальным, так как необходимо измерить скорость роста при данной концентрации субстрата и избежать периода ее замедления в результате его использования. После отбора проб культура продолжает расти с максимальной скоростью, а в отобранных пробах для острых опытов скорость роста лимитирована количеством заданного субстрата. По результатам этих опытов зависимость  $\mu$  от  $s$  устанавливается графически. Полученные результаты обрабатываются по методу обратных величин по Лайнуиверу и Бэрку, строится график зависимости  $1/\mu$  от  $1/s$  и графически устанавливаются величины  $\mu_m$  и  $K_s$ , как показано на рис. 6.12, Б.

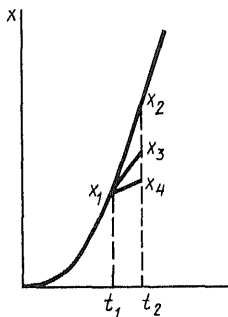


Рис. 6.10. Схема постановки острых опытов для определения  $K_s$ .

В экспоненциальной фазе роста в момент  $t$  отбирается пробы с концентрацией биомассы  $x_1$ . Клетки отмывают и помещают в среды с различными концентрациями исследуемого субстрата. Через промежуток времени  $t_2 - t_1$  определяют концентрации биомассы  $x_2, x_3, x_4$  и вычисляют удельные скорости роста

$K_s$  и  $\mu_m$  могут быть определены и при хемостатном культивировании. Для этого надо определить остаточное содержание лимитирующего рост субстрата при двух стационарных состояниях  $D_1$  и  $D_2$ . Поскольку  $K_s$  в обоих случаях одно и то же:

$$s_1 = \frac{\mu_m - D_1}{D_1} = s_2 \frac{\mu_m - D_2}{D_2}, \quad (28)$$

где  $s_1$  и  $s_2$  — остаточные концентрации субстрата при скоростях разбавления соответственно  $D_1$  и  $D_2$ . Отсюда находят  $\mu_m$ , а затем вычисляют  $K_s$ :

$$K_s = s_1 \frac{\mu_m - D_1}{D_1}. \quad (29)$$

Но такое определение  $K_s$  не всегда возможно, так как микроорганизмы имеют способность полностью использовать лимитирующие субстраты и их концентрация в ферментере часто может оказаться вне пределов чувствительности методов анализа. Величина  $K_s$  не является абсолютной, а зависит от условий роста культур. Однако этот вопрос пока недостаточно изучен.

### 6.3.6. Константа ингибирования ( $K_i$ )

Эта константа аналогична константам ингибирования в энзимологии. Она характеризует чувствительность штаммов к ингибиторам роста и численно равна концентрации ингибитора, замедляющей скорость роста вдвое.

Ингибиторы роста могут быть конкурентными и неконкурентными. Неконкурентными являются ингибирующие рост вещества, которые взаимодействуют с клетками в каком-то участке, отличном от участка связывания лимитирующего рост субстрата. Устанавливается зависимость  $\mu$  от концентрации ингибитора  $I$  в острых опытах. Она обычно имеет параболический характер (рис. 6.11). Каждой концентрации ингибитора соответствует одна

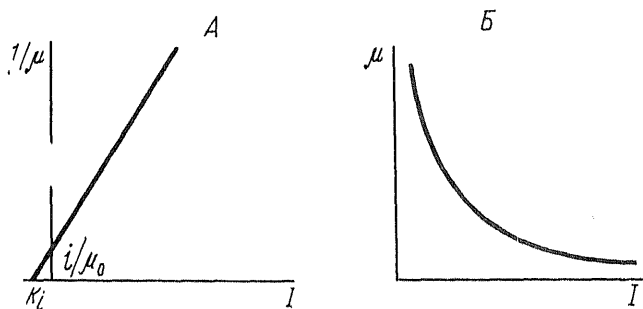


Рис. 6.11. А — схема определения константы ингибирования ( $K_i$ ) для неконкурентного ингибитора методом обратных величин ( $\mu_0$  — удельная скорость роста без ингибитора); Б — зависимость  $\mu$  от концентрации ингибитора  $I$

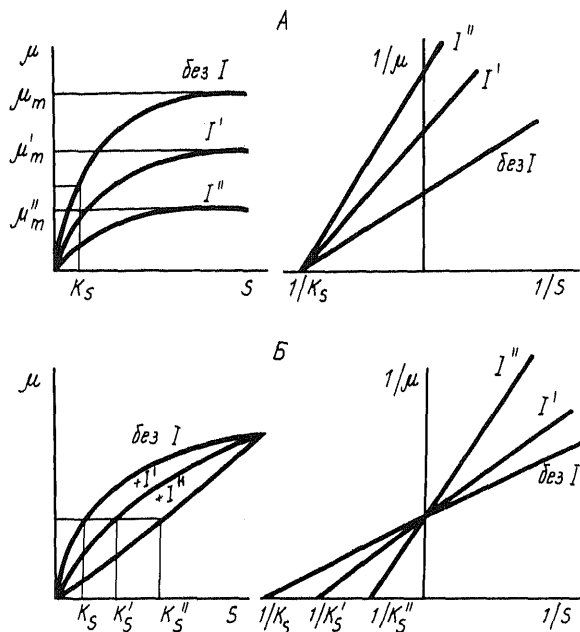


Рис. 6.12. Действие неконкурентного (А) и конкурентного (Б) ингибитора на скорость роста в острых опытах. Зависимость  $\mu$  от  $s$  и графики обратных величин

определенная скорость роста, которая является максимальной, в присутствии данного количества ингибитора. Неконкурентные ингибиторы не влияют на величину  $K_s$ , но уменьшают максимальную скорость роста  $\mu_m$  (рис. 6.12, А). Конкурентные ингибиторы влияют на величину  $K_s$ , но не изменяют  $\mu_m$  (рис. 6.12, Б).

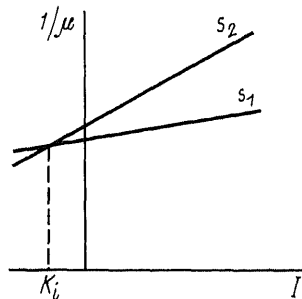


Рис. 6.13. Схема определения константы ингибирования ( $K_i$ ) методом обратных величин для конкурентного ингибитора:

$s_1$  и  $s_2$  — концентрации субстрата,  
 $I$  — концентрация ингибитора

Для определения  $K_i$  неконкурентного ингибитора к пробам культуры, взятым в экспоненциальной фазе роста, добавляют различные дозы ингибитора и определяют скорость роста. Зависимость  $\mu$  от  $I$  изображена на рис. 6.11, Б. При обработке результатов по Лайнуверу и Бэрку строится график зависимости  $1/\mu$  от  $I$  (см. рис. 6.11, А) и графически определяется  $\mu_0$  без ингибитора- $\mu_m$  и  $K_s$ . Н. Д. Иерусалимский предложил применить к росту микроорганизмов при ингибировании неконкурентными ингибиторами уравнение, известное в энзимологии. Оно описывает зависимость скорости роста культу-

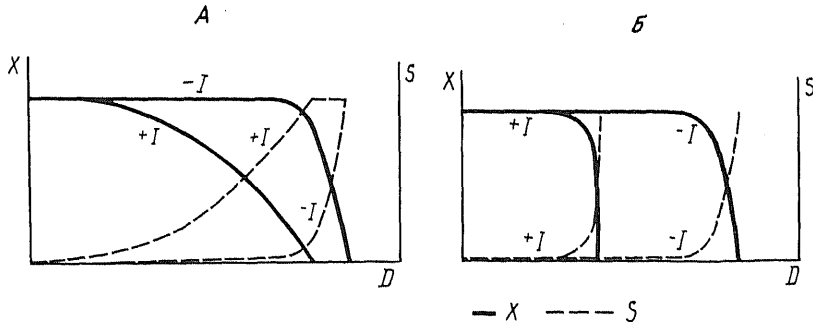


Рис. 6.14. Теоретически рассчитанные хемостатные кривые для конкурентного (А) и неконкурентного ингибиторов (Б):  
 $x$  — концентрация биомассы,  $s$  — концентрация субстрата

ры от концентрации ингибирующего рост продукта метаболизма:

$$\mu = \mu_m \frac{K_p}{K_p + p} \quad (30)$$

Аналогичным образом действуют и другие неконкурентные ингибиторы:

$$\mu = \mu_m \frac{K_i}{K_i + I} \quad (31)$$

Конкурентными ингибиторами являются такие, которые конкурируют с субстратом за место на ферменте. Поэтому при определении  $K_i$  необходимо учитывать влияние концентрации субстрата на скорость роста культур. В острых опытах определяют влияние ингибитора на скорость роста при двух различных концентрациях субстрата. Конкурентные ингибиторы не влияют на  $\mu_m$ , но изменяют величину  $K_s$  (рис. 6.13).

Дж. Пертом предложен следующий вид уравнения, связывающего зависимость удельной скорости роста микроорганизмов от концентрации конкурентного ингибитора:

$$\mu = \mu_m \frac{s}{s + (1 + I)/K_i \cdot K_s} \quad (32)$$

В хемостате конкурентные и неконкурентные ингибиторы по-разному влияют на характер хемостатной кривой (рис. 6.14). В присутствии неконкурентных ингибиторов заметно изменение  $\mu_m$  и постоянство  $K_s$ . В случае конкурентных ингибиторов видно возрастание  $K_s$  при отсутствии влияния или слабом влиянии на  $\mu_m$ . Часто ингибиторы обладают смешанным действием, изменяя одновременно и  $K_s$ , и  $\mu_m$ .

#### 6.4. УПРАВЛЯЕМОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Чем глубже познается физиологическая и биохимическая изменчивость микробной клетки, тем больше возможностей открывается для управления микробными биосинтезами, изменения мета-

болизма в желаемую сторону. Изменяя условия культивирования, можно изменить состав биомассы и продуктов метаболизма. Лимитирование и ингибирование роста приводят к замедлению одних процессов биосинтеза, но могут вызывать даже ускорение других. На этом основан сверхсинтез тех или иных продуктов, что можно проиллюстрировать рядом примеров.

В случае необходимости обогащения клеток липидами проводят определенные мероприятия. Для этого используют богатые липидами штаммы и обеспечивают микроорганизмам условия роста, оптимальные для образования липидов: некоторое замедление роста является недостатком источника азота при избытке соединений углерода. В таких условиях при ограничении синтеза белков происходит обогащение клеток безазотистыми и резервными веществами. У одних форм это липиды, у других — углеводы. Для промышленного производства эти условия давно подобраны методом «проб и ошибок».

Нехватка биотина при выращивании некоторых бактерий — продуцентов отдельных аминокислот приводит к увеличению проницаемости клетки и утечке аминокислот в среду. На это клетка реагирует усиленным синтезом уходящей аминокислоты. Такая же цель достигается путем повышения проницаемости клеточной стенки: добавлением антибиотика — пенициллина. Этот метод применяется, например, в Японии, где развито промышленное производство аминокислот. Кроме того, используют специальные мутанты — сверхсинтетики отдельных аминокислот.

Если при проведении процессов, связанных с первой фазой роста культуры, обнаружены вещества, ухудшающие рост или изменяющие состав биомассы, то дело микробиолога выявить эти узкие места и найти технологические пути для их ликвидации.

При получении продуктов второй фазы роста в периодическом режиме культивирования управление процессом биосинтеза сводится к созданию оптимальных условий для роста микроорганизма. Затем нужно поддерживать необходимую для данного биосинтеза лимитацию роста культуры. Для этого микробиологами разрабатываются программы добавок к культуре необходимых компонентов. Например, при лимитации фосфором добавляются источники азота и углерода (содержание фосфора при этом не должно превышать определенной низкой величины). Так в промышленности получают некоторые антибиотики, образуемые актиномицетами.

При непрерывном культивировании ведут наращивание биомассы в первом хемостате при возможно большей скорости роста. Во втором хемостате создаются условия нужной лимитации добавлением во второй ферментер среды, обедненной лимитирующим субстратом, или добиваются замедления роста культур путем увеличения емкости второго ферментера. Состав исходной среды при этом должен обеспечить отсутствие лимитации в первом ферментере и нужную степень лимитации во втором. Управляемое

культивирование при получении продуктов второй фазы при непрерывном культивировании пока не вышло из стадии лабораторных разработок.

Размножение микроорганизмов в оптимальных для роста условиях, т. е. при больших скоростях потока, возможно весьма долгое время — месяцами. Поэтому наращивание биомассы всегда целесообразно вести в проточных условиях. Это значительно удешевляет процесс, так как исключается время на опорожнение емкостей и процесс все время идет при максимально возможной скорости. Так работает многотоннажная промышленность производства белка (микробной биомассы белка одноклеточных).

При лимитировании или ингибировании необходимых для получения продуктов второй фазы роста культур могут спонтанно возникнуть мутанты, более приспособленные к данным условиям. Они могут не обладать способностью к желаемому биосинтезу в данных условиях, но в условиях потока среды могут вытеснить сильных продуцентов, так как у последних рост замедлен. Поэтому процесс необходимо время от времени возобновлять с новым штаммом, хранящимся в коллекции.

Управляемое культивирование требует постоянного контроля концентрации основных для данного процесса компонентов питания и других условий среды. Ручной отбор и анализ проб не удовлетворяет промышленность, как медленный и трудоемкий. В промышленность внедряется автоматизация культивирования — автоматическое поддержание заданных уровней концентраций компонентов среды и других условий. Для этого разработаны датчики на концентрацию отдельных компонентов среды. Типичным и давно используемым датчиком является электрод, реагирующий на значение рН.

Сигналы от датчиков усиливаются и поступают на специальную регистрирующую аппаратуру, которой они дают «команду» усилить или ослабить приток титрантов, с тем чтобы удерживать рН среды на заданном уровне.

По такому же принципу работают электроды, измеряющие величины  $E_h$ ,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ . Они позволяют поддерживать эти параметры на заданном уровне.

Не только электроды дают возможность поддерживать заданные концентрации веществ в среде. Известны анализаторы, в которые насосом подают культуру по замкнутому контуру с возвратом в ферментер. Анализирующее устройство производит анализ и выдает электрический сигнал, соответствующий концентрации исследуемого вещества. Такой давно известный анализатор — нефелометр, определяет плотность культуры при помощи фотоэлемента и дает сигналы для подачи в ферментер среды. Нефелометр определяет и количественный показатель среды, необходимый для поддержания ее на заданном уровне. Так ведется турбидостатное культивирование, позволяющее поддерживать культуру на уровне максимальной скорости роста, что невозможно в хемостате. Такой же в принципе прием возможен для анализа многих

летучих окисляемых веществ — спиртов, углеводов, в специальных анализаторах (обычно хроматографического типа), в которые насосом подается культура из ферментера.

Определены и способы управления подачей компонентов среды по такому параметру, как интенсивность дыхания микроорганизмов. С помощью газоанализатора определяется содержание  $O_2$  в газе, выходящем из ферментера, и вычисляется показатель поглощения его из подаваемого в ферментер воздуха, а также определяется выделение  $CO_2$  клетками. Дыхание зависит от условий питания — характер зависимости выясняется микробиологом. Все измеряемые концентрации следует записывать на ленте самописца, в результате процесс может быть точно документирован.

В химической промышленности уже применяют электронно-вычислительные машины (ЭВМ), связанные с измеряющими приборами и управляющими органами. Это новое направление разрабатывается и для микробиологических процессов. Речь идет о соединении управляющей ЭВМ с ферментером (с его оборудованием). Задачей является нахождение оптимальных условий для данного процесса и их автоматическое поддержание на оптимальном уровне. С помощью ЭВМ возможны поиски оптимальных условий непосредственно в ходе процесса. Это возможно как для непрерывных, так и для периодических культур.

ЭВМ выдает оптимальный режим и автоматически корректирует его по мере изменения свойств культуры.

В микробиологических процессах имеется много показателей, которые могут быть использованы для их контроля и оптимизации. Показателями, поддающимися измерению, являются, как уже упоминалось, температура, рН, Eh,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ , также концентрации некоторых субстратов, тепловыделение, морфометрические характеристики состояния культуры, которые получают в результате оптико-структурного морфологического анализа (ОСМА). На основе этих первичных параметров машиной вычисляются более сложные, обобщающие характеристики, имеющие ясный биологический смысл. Это скорости метаболизма  $Q_{O_2}$ ,  $Q_{CO_2}$ ,  $O_n$ ,  $Q_{тепловыд}$ ; удельные скорости:  $\mu$ ,  $q_s$ ,  $q_{O_2}$ ,  $q_{CO_2}$ , коэффициент трат на поддержание  $m$  и т. д. Еще более информативны относительные показатели: дыхательный коэффициент, экономические коэффициенты. Концентрация биомассы не может быть измерена непосредственно при использовании датчика в ферментере, но определяется на основе пропорциональности или более сложной связи с легко измеряемыми параметрами: рН,  $Q_{CO_2}$ ,  $Q_{O_2}$ , концентрация продуктов. Эти величины входят в математические уравнения процессов биосинтеза. ЭВМ, соединенная с ферментером, следит за процессами и управляет их ходом. Естественно, что для этого необходимо предварительно знать физиологию продуцента и требуемые для оптимального биосинтеза уровни тех или иных контролируемых процессов.



## Глава 7 АЭРАЦИЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Многие микроорганизмы, используемые в промышленности, нуждаются для роста в наличии молекулярного кислорода, окисляя в процессе аэробного дыхания субстраты до двуокиси углерода и воды. Кроме того,  $O_2$  может включаться в процессы конструктивного метаболизма клеток, обеспечивая синтез ими некоторых соединений.

Растворимость кислорода в культуральной среде незначительна и составляет всего несколько граммов  $O_2$  на  $m^3$  при давлении воздуха, равном  $1 \cdot 10^5$  Па. Потребность же аэробных микроорганизмов в кислороде может составлять десятки килограммов  $O_2$  на кубический метр культуральной среды в час. Поэтому при культивировании таких микроорганизмов, необходимо непрерывно растворять в среде кислород, что достигается аэрацией ее в ферментере. Необходимость постоянного поддержания в среде концентрации  $O_2$ , при которой не лимитируется аэробный процесс, определяет выбор конструкции и характеристики (главным образом, массообменные) ферментера для каждого конкретного процесса.

### 7.1. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРЕННОГО В СРЕДЕ КИСЛОРОДА НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

Между удельной скоростью роста микроорганизмов и концентрацией растворенного в культуральной среде кислорода существует зависимость, которую можно выразить уравнением Михаэлиса—Ментен:

$$\mu = \mu_{mc} \frac{C}{K_{mc} + C}, \quad (1)$$

где  $\mu$  — удельная скорость роста микроорганизмов при концентрации растворенного в культуральной среде кислорода ( $C$ ), —  $ч^{-1}$ ;  $\mu_{mc}$  — предел, к которому стремится  $\mu$  при увеличении концентрации растворенного в культуральной среде кислорода,  $ч^{-1}$ ;  $K_{mc}$  — константа, численно равная той концентрации растворенного в культуральной среде кислорода, при которой  $\mu = 0,5\mu_{mc}$ ,  $кг\ O_2\ м^{-3}$ ;  $C$  — текущая (рабочая) концентрация кислорода, растворенного в культуральной среде,  $кг\ O_2\ м^{-3}$ .

Значение константы  $K_{mc}$  в уравнении (1) для подавляющего большинства микроорганизмов очень мало. Например, для дрожжевых культур при выращивании их на средах с углеводами  $K_{mc} \approx 5 \cdot 10^{-5}$   $кг\ O_2\ м^{-3}$ .

На рис. 7.1 приведена построенная по уравнению (1) кривая, выражающая изменение величины удельной скорости роста культуры дрожжей в зависимости от концентрации растворенного в культуральной среде кислорода при значении  $K_{mc} = 5 \cdot 10^{-5}$   $кг\ O_2\ м^{-3}$ .

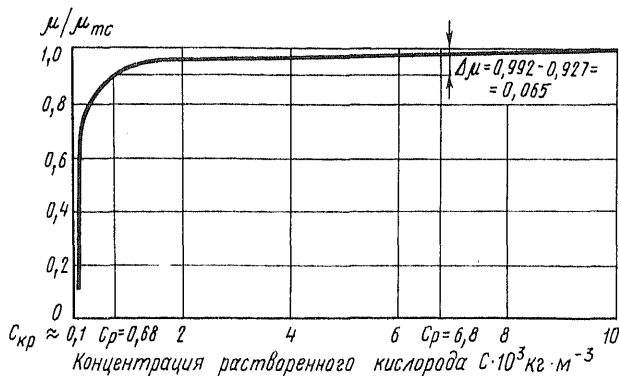


Рис. 7.1. Зависимость удельной скорости роста дрожжевой культуры от концентрации растворенного в среде кислорода

Значение удельной скорости роста выражено в долях  $\mu_{мс}$ ; отмечено значение  $C_p = 6,8 \cdot 10^{-3} \text{ кг O}_2 \text{ м}^{-3}$  — равновесной концентрации растворенного в культуральной среде кислорода при температуре  $30^\circ\text{C}$  с кислородом воздуха при атмосферном давлении и значение  $0,1C_p = 0,68 \cdot 10^{-3} \text{ кг O}_2 \text{ м}^{-3}$ .

В этом случае значения удельной скорости роста незначительно изменяются при концентрациях растворенного кислорода, больших  $0,1C_p$ . Изменениям концентраций кислорода от  $0,68 \cdot 10^{-3}$  до  $6,8 \cdot 10^{-3}$  соответствуют изменения относительных значений удельных скоростей роста  $\mu/\mu_{мс}$  от 0,927 до 0,992, т. е. менее чем на 7%.

Концентрацию растворенного в среде кислорода, меньше которой быстро снижается удельная скорость роста микроорганизмов, принято называть критической ( $C_{кр}$ ). Значение критической концентрации находят опытным путем и это значение не является строго определенной величиной. Обычно  $C_{кр}$  меньше  $0,1C_p$ , поэтому заведомо с запасом можно принимать  $C_{кр} \approx 0,1C_p$ .

Следует отметить, что на некоторые микроорганизмы кислород, растворенный в среде в концентрациях выше определенных, оказывает ингибирующее действие. Поэтому при изучении физиологии каждого микроорганизма необходимо определить значение  $C_{инг}$ , выше которого их рост подавляется.

Вышеизложенное позволяет сделать вывод, что при значениях концентраций растворенного в среде кислорода больших  $C_{кр}$  ( $\approx 0,1C_p$ ) и меньших тех, которые оказывают на изучаемый микроорганизм ингибирующее действие, удельная скорость роста  $\mu/\mu_{мс}$  мало отличается от единицы. При организации процесса культивирования микроорганизмов необходимо обеспечить аэрацию среды так, чтобы концентрация растворенного в среде кислорода находилась в указанных пределах:  $C_{кр} < C < C_{инг}$ .

## 7.2. ТРАНСПОРТ КИСЛОРОДА ИЗ ВОЗДУХА В КУЛЬТУРАЛЬНУЮ СРЕДУ И К МИКРООРГАНИЗМАМ

Для поддержания необходимой концентрации растворенного кислорода в культуральной среде с микроорганизмами необходимо обеспечить постоянное растворение строго определенного количества кислорода воздуха, подаваемого на аэрацию. Содержащийся в пузырьках воздуха кислород диффундирует к поверхности раздела фаз газ—жидкость, проходит через эту поверхность, диффундирует от поверхности раздела фаз в жидкость и к клеточной стенке микроорганизма. На указанном пути кислород преодолевает диффузионные сопротивления, значительно отличающиеся по величине.

Из теории абсорбции известно, что для трудно растворимых газов, каким является кислород, диффузионным сопротивлением в газовой фазе можно пренебречь по сравнению с диффузионным сопротивлением в жидкой фазе. Пренебречь также можно диффузионным сопротивлением транспорта кислорода в жидкости к клеточной стенке. С учетом этого уравнение массопередачи для абсорбции кислорода культуральной средой можно записать в виде

$$dM = K_L(C_p - C)dFdt, \quad (2)$$

где  $M$  — количество кислорода, переходящего из воздушного потока в культуральную среду, кг;  $K_L$  — коэффициент массопередачи при абсорбции кислорода, кг  $O_2/m^2 \cdot ч$  (кг  $O_2 m^{-3}$ );  $C$ ,  $C_p$  — соответственно рабочая в культуральной среде и равновесная концентрация кислорода, кг  $O_2 m^{-3}$ ;  $F$  — поверхность контакта фаз,  $m^2$ ;  $t$  — время абсорбции, ч.

Равновесную концентрацию  $C_p$  находят по соотношению

$$C_p = \psi p, \quad (3)$$

где  $p$  — парциальное давление кислорода в газовой фазе, Па;  $\psi$  — константа фазового равновесия, кг  $O_2 m^{-3} Pa^{-1}$ .

При барботаже бывает весьма затруднительно определить поверхность фазового контакта, поэтому коэффициент массопередачи относят к 1  $m^3$  культуральной среды. Обозначив поверхность фазового контакта в 1  $m^3$  среды через  $a$  ( $m^2/m^3$ ), можно рассмотреть произведение  $K_L a$ , которое представляет собой коэффициент массопередачи, отнесенной к 1  $m^3$  культуральной среды, кг  $O_2/m^3 \cdot ч$  (кг  $O_2 m^{-3}$ ).

Уравнение массопередачи с объемным коэффициентом массопередачи можно представить в виде

$$\frac{dM}{dV_p dt} = K_L a (C_p - C), \quad (4)$$

где  $dV_p$  — элементарный объем культуральной среды,  $m^3$ .

Уравнение (4) дает представление о количестве кислорода, абсорбируемого в единице объема за единицу времени.

Обозначив

$$Q_{O_2} = \frac{dM}{dV_p d\tau}, \quad (5)$$

получаем

$$Q_{O_2} = K_L a (C_p - C). \quad (6)$$

Величина  $Q_{O_2}$  (кг  $O_2$ /м<sup>3</sup> ч), как следует из уравнения (6), может быть увеличена соответствующим увеличением любого из множителей  $K_L a$  или  $(C_p - C)$ .

Увеличения движущей силы абсорбции  $C_p - C$  можно достигнуть повышением давления воздуха в аппарате (увеличивается значение  $C_p$ ) или подачей в аппарат вместо воздуха чистого кислорода или обогащенного кислородом воздуха (также увеличивается  $C_p$ ). Однако повышение скорости абсорбции кислорода любым из двух указанных способов в настоящее время не получило широкого распространения.

Движущая сила процесса абсорбции, определяемая разностью равновесной и рабочей концентраций растворенного кислорода, возрастает с уменьшением рабочей концентрации.

Для того чтобы обеспечить большую движущую силу процесса абсорбции и большой поток растворенного кислорода из воздуха в культуральную жидкость, целесообразно вести процесс с наименьшей рабочей концентрацией кислорода при соблюдении условия

$$C > C_{кр}. \quad (7)$$

Для области, ограниченной условием  $C > C_{кр}$  (7), уравнение (6) можно преобразовать:

$$Q_{O_2} = K_L a (C_p - C_{кр}). \quad (8)$$

При осуществлении транспорта кислорода соответственно уравнению (8) абсорбция кислорода культуральной средой не будет лимитировать процесс выращивания микроорганизмов.

В соответствие уравнению (8) скорость абсорбции кислорода воздуха культуральной средой рационально регулировать в аппарате изменением величины коэффициента массопередачи в зависимости от потребностей микроорганизмов. Значение  $K_L a$  можно повысить турбулизацией культуральной среды, что достигается введением в нее энергии при перемешивании.

Процесс культивирования микроорганизмов может успешно осуществляться только при условии достаточно интенсивного массообмена во всех точках рабочего объема аппарата, т. е. в аппарате полного смешения по жидкой фазе, когда во всем рабочем объеме аппарата для каждого произвольно выбранного момента времени любой из параметров процесса, включая коэффициент массопередачи, принимает одно и то же значение.

### 7.3. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ АБСОРБЦИИ КИСЛОРОДА В ПЕРИОДИЧЕСКИ ДЕЙСТВУЮЩЕМ АППАРАТЕ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для случая постоянства коэффициента массопередачи по всему рабочему объему аппарата представляется возможным составлять математическое описание процесса абсорбции кислорода воздуха средой в периодически действующем аппарате при культивировании микроорганизмов.

Примем концентрацию биомассы микроорганизмов в аппарате в начальный момент времени ( $\tau = 0$ ) равной  $x_0$ .

Рассмотрим наиболее важный для практики случай, когда абсорбция кислорода культуральной средой не лимитирует процесс роста микроорганизмов (концентрация растворенного кислорода составляет величину не ниже  $C_{кр}$ ). Для этого случая значение удельной скорости роста микроорганизмов можно принять как постоянное и равное  $\mu$ . Тогда концентрация биомассы микроорганизмов для любого момента времени может быть найдена по экспоненциальной зависимости

$$x = x_0 e^{\mu\tau}. \quad (9)$$

Потребление микроорганизмами растворенного в культуральной среде кислорода принимается постоянным для всего процесса культивирования и равным общему метаболическому коэффициенту для кислорода  $q_{O_2}$  (кг  $O_2$ /кг СБ ч).

Изменение концентрации растворенного в культуральной среде кислорода за интервал времени  $d\tau$  происходит в результате двух процессов: абсорбции кислорода из воздуха и потребления кислорода растущими по экспоненциальной зависимости микроорганизмами (рис. 7.2). Соответствующее уравнение материального баланса может быть записано в виде

$$V_p dC = K_L a (C_{рн} - C) V_p d\tau - q_{O_2} x_0 e^{\mu\tau} V_p d\tau \quad (10)$$

или

$$\frac{dC}{d\tau} = K_L a C_{рн} - K_L a C - q_{O_2} x_0 e^{\mu\tau}, \quad (11)$$

где, кроме ранее принятых обозначений,  $C_{рн}$  — начальная равновесная концентрация растворенного в культуральной среде кислорода, кг  $O_2$ /м<sup>3</sup>.

Уравнения (10) и (11) составлены для случая, когда через аппарат проходит достаточно большое количество воздуха, при этом парциаль-

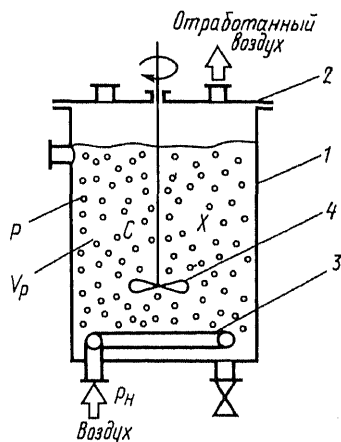


Рис. 7.2. К материальному балансу по кислороду при периодическом культивировании микроорганизмов в аппарате:

1 — корпус аппарата; 2 — крышка аппарата; 3 — барботер; 4 — мешалка

ное давление кислорода воздуха  $p$  и соответствующая ему равновесная концентрация  $C_p$  в течение всего процесса могут быть приняты равными:  $p = p_{\text{н}} = \text{const}$ ,  $C_p = C_{p\text{н}} = \text{const}$ .

Решение уравнения (11) дает

$$C = \left( C_{p\text{н}} - \frac{q_{\text{O}_2} x_{\text{н}} e^{\mu t}}{K_L a} \right) \cdot (1 - e^{-K_L a t}). \quad (12)$$

При решении уравнения (11) принималось: при  $t = 0$  (начало процесса)  $C = C_{\text{н}} = 0$ , а также  $K_L a \gg \mu$ .

Уравнение (12) позволяет определить концентрацию растворенного в культуральной среде кислорода в периодически действующем аппарате при выращивании микроорганизмов для любого момента времени.

#### 7.4. АБСОРБЦИЯ КИСЛОРОДА В ПЕРИОДИЧЕСКИ ДЕЙСТВУЮЩЕМ АППАРАТЕ БЕЗ МИКРООРГАНИЗМОВ

Второй сомножитель правой части уравнения (12) характеризует изменение концентрации растворенного в среде кислорода при его абсорбции, когда в аппарате не происходит культивирования микроорганизмов, т. е. когда  $x_{\text{н}} = 0$ . Для этого случая имеем

$$C = C_{p\text{н}} (1 - e^{-K_L a t}). \quad (13)$$

Как следует из уравнения (13), при определенных значениях  $K_L a$  достижение равновесных концентраций теоретически наступит при  $t \rightarrow \infty$ , так как при этом  $\exp(-K_L a t) \rightarrow 0$ . Однако будем считать, что равновесие практически достигнуто, если рабочая концентрация  $C$  отличается от равновесной  $C_{p\text{н}}$  не более чем на 3%, т. е. когда значение  $\exp(-K_L a t)$  становится менее 0,03.

На рис. 7.3 показаны построенные по уравнению (13) кривые изменения рабочих концентраций растворенного в среде кислорода с течением времени в аппаратах, работающих с различными коэффициентами массопередачи  $K_L a$ : 50, 100, 200, 1000 и 2000  $\text{ч}^{-1}$ . Рабочая концентрация  $C$  выражена в долях равновесной концентрации  $C_{p\text{н}}$ . Заштрихованная площадка — область значений рабочих концентраций, отличающихся от равновесных не более чем на 3%, т. е. область практически равновесных концентраций. Как показано на рисунке, аппараты обеспечивают достижение практически равновесных концентраций за интервалы времени от 5 с до 5 мин в зависимости от значений коэффициентов массопередачи  $K_L a$  в пределах от 50 до 2000  $\text{м}^{-1}$ . Кривые 1 ( $K_L a = 50 \text{ ч}^{-1}$ ) и 2 ( $K_L a = 100 \text{ ч}^{-1}$ ) соответствуют абсорбции кислорода в барботажных аппаратах с различными расходами воздуха (кривая 1 для незначительного расхода воздуха). Кривая 3 ( $K_L a = 200 \text{ ч}^{-1}$ ) характеризует изменение концентрации растворенного кислорода при его абсорбции в ферментере с механическим перемешиванием среды и с принудительной подачей воздуха. Кривые 4 ( $K_L a = 1000 \text{ ч}^{-1}$ ) и 5 ( $K_L a = 2000 \text{ ч}^{-1}$ )

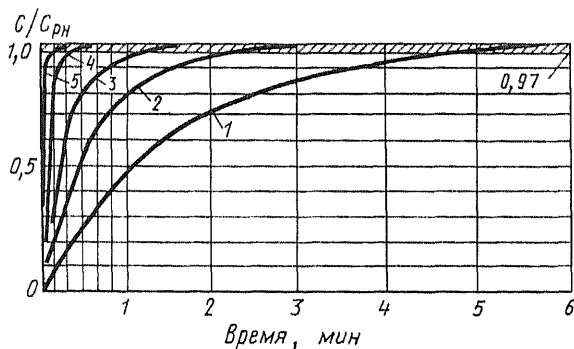


Рис. 7.3. Изменение рабочих концентраций растворенного в среде кислорода с течением времени для аппаратов, работающих с различными коэффициентами массопередачи  $K_{L,a}$ . Построено по уравнению (13).

Значения  $K_{L,a}$  для кривых: 1—50; 2—100; 3—200; 4—1000; 5—2000 ч<sup>-1</sup>.

построены для абсорбции кислорода воздуха в ферментерах с интенсивным перемешиванием сред при удельной мощности перемешивания, превышающей 3 кВт м<sup>-3</sup>.

Закономерности абсорбции кислорода без микроорганизмов используются во время анализа работы аппаратов при испытаниях их для определения массообменных характеристик.

### 7.5. АБСОРБЦИЯ КИСЛОРОДА В ПЕРИОДИЧЕСКИ ДЕЙСТВУЮЩЕМ АППАРАТЕ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Сравнение уравнений (12) и (13) показывает, что при наличии микроорганизмов в культуральной жидкости не может быть достигнута концентрация растворенного кислорода, равная  $C_{рн}$ .

Рассмотрим процесс абсорбции кислорода с момента включения аэрации ( $\tau = 0$ ,  $C_{п} = 0$  и  $x = x_{п}$ ). Время достижения установившегося по абсорбции кислорода режима, при котором кислород расходуется только на потребление микроорганизмами, для рассматриваемого случая составляет от 5 с до 5 мин. В течение этого времени значение  $\exp(-\mu\tau)$  практически остается равным единице и для режима, не установившегося по абсорбции кислорода, будет справедливо уравнение

$$C = \left( C_{рн} - \frac{q_{O_2} x_{п}}{K_{L,a}} \right) \left( 1 - e^{-K_{L,a} \tau} \right). \quad (14)$$

По уравнению (14) на рис. 7.4 построены кривые изменения с течением времени концентраций кислорода, растворенного в культуральной жидкости без микроорганизмов (для кривой 1  $x_{п} = 0$ ) и с микроорганизмами (для кривой 2  $x_{п} = 1$  кг СБ/м<sup>3</sup>). Расчеты приведены применительно к выращиванию *Candida sp.* на средах с жидкими парафинами.

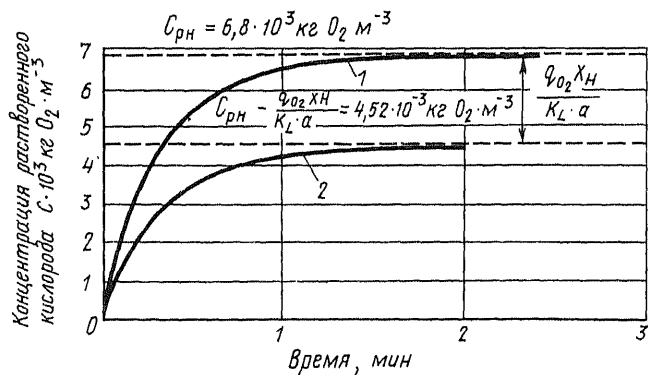


Рис. 7.4. Изменение с течением времени рабочих концентраций кислорода, растворенного в культуральной жидкости без микроорганизмов (кривая 1) и с микроорганизмами (кривая 2).

Построено по уравнению (14) для культуры *Candida sp.*

Значения констант:  $q_0 = 0,228$  кг  $O_2$ /кг. СВ ч;  $C_{рн} = 6,8 \cdot 10^{-3}$  кг  $O_2$  м $^{-3}$ ;  $X_H = 1$  кг СВ м $^{-3}$ ;  $K_L a = 100$  ч $^{-1}$

Как показано, интервал времени достижения установившегося по абсорбции режима незначителен по сравнению с продолжительностью всего микробиологического периодического процесса, протекающего сутками или в лучшем случае часами. Поэтому в уравнении (12) может быть исключен член, учитывающий режим, переходный по абсорбции кислорода. Соответственно уравнение (12) для установившегося по абсорбции кислорода режима может быть представлено иначе:

$$C = C_{рн} - \frac{q_{O_2} X_H}{K_L a} e^{-\mu t}. \quad (15)$$

На рис. 7.5 показаны построенные по уравнению (15) кривые изменения рабочих концентраций растворенного в культуральной жидкости кислорода с течением времени для выращивания дрожжей в периодически действующих аппаратах, работающих с различными коэффициентами массоотдачи  $K_L a$ : 50, 100, 200, 1000 и 2000 ч $^{-1}$ . Расчеты проведены применительно к выращиванию *Candida sp.* на средах с жидкими парафинами. Заштрихованная площадь — область значений концентраций, меньших чем  $C_{кр} \approx 0,1 C_{рн}$ . В этой области концентраций начинает значительно снижаться активность дрожжевой культуры, так как интенсивность процесса абсорбции кислорода начинает лимитировать процесс роста клеток. В аппаратах (рис. 7.5) с высокими значениями коэффициентов массоотдачи  $K_L a$  процесс выращивания дрожжей без существенного снижения их физиологической активности протекает в течение значительно большего периода времени, чем в аппаратах с меньшими значениями  $K_L a$ . Большему периоду времени проведения процесса соответствуют более высокие конечные концентрации биомассы дрожжевых клеток.



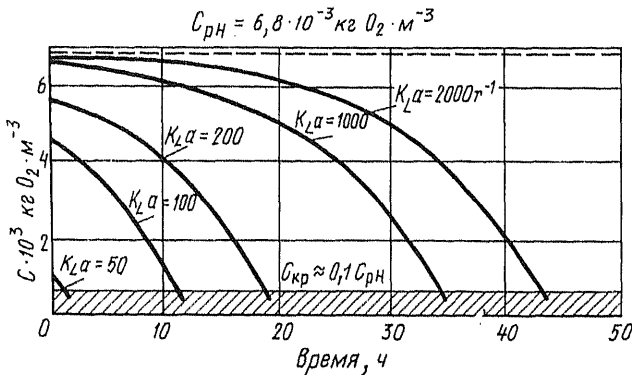


Рис. 7.5. Изменение рабочих концентраций растворенного в культуральной жидкости кислорода с течением времени в процессе выращивания дрожжевой культуры *Candida sp.*  
Построено по уравнению (15)

Значения констант:  $q_{O_2} = 0,228$  кг  $O_2$  / кг СБ ч;  $\mu = 0,09$  ч $^{-1}$ ;  
 $x_n = 1$  кг СБ м $^{-3}$ ;  $C_{рн} = 6,8 \cdot 10^{-3}$  кг  $O_2$  м $^{-3}$ ;

На рисунке  $K_L a = 2000$  ч $^{-1}$  следует читать как  $K_L a = 2000$  ч $^{-1}$

Уравнение (15) позволяет определить то минимальное значение коэффициента массоотдачи  $(K_L a)_{\min}$ , которое должно быть обеспечено конструкцией и режимом работы вновь создаваемого аппарата, чтобы при заданной конечной концентрации биомассы дрожжевых клеток абсорбция кислорода не лимитировала бы процесс.

Конечная заданная концентрация биомассы дрожжевых клеток определяется соотношением

$$x_k = x_n e^{\mu \tau_k}, \quad (16)$$

где  $\tau_k$  — время достижения заданной конечной концентрации биомассы.

При выборе заданной конечной концентрации биомассы микроорганизмов необходимо учитывать условие

$$C_k \geq C_{кр}, \quad (17)$$

где  $C_k$  — конечная рабочая концентрация растворенного в культуральной жидкости кислорода, соответствующая концентрации  $x_k$ , кг  $O_2$  / м $^3$ .

Уравнения (15) и (16) и условия (17) позволяют получить

$$(K_L a)_{\min} = \frac{q_{O_2}}{C_{рн} - C_k} x_k. \quad (18)$$

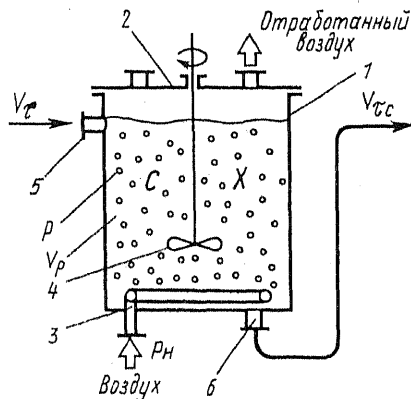


Рис. 7.6. К материалному балансу по кислороду при непрерывном культивировании микроорганизмов в аппарате:  
1 — корпус аппарата; 2 — крышка аппарата; 3 — барботер; 4 — мешалка; 5, 6 — соответственно штуцера для ввода питательной среды и вывода микробной суспензии

Если процесс проводится в имеющемся аппарате с массообменной характеристикой  $(K_L a)_{\text{ап}}$ , то максимальное значение конечной концентрации биомассы, которое можно получить в этом аппарате при условии отсутствия лимитирования по кислороду роста микроорганизмов, составит:

$$(x_k)_{\text{max}} = (K_L a)_{\text{ап}} \frac{C_{\text{рп}} - C_k}{q_{\text{O}_2}}. \quad (19)$$

## 7.6. АБСОРБЦИЯ КИСЛОРОДА В НЕПРЕРЫВНО ДЕЙСТВУЮЩЕМ АППАРАТЕ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

На основании материального баланса процесса культивирования микроорганизмов представляется возможным определить минимальное значение коэффициента массопередачи по кислороду, обеспечивающее достижение конструкцией и режимом работы вновь создаваемого непрерывно действующего аппарата заданной стационарной концентрации биомассы в условиях абсорбции, не лимитирующей процесс.

Изменение концентрации растворенного в культуральной среде кислорода за интервал времени  $dt$  в непрерывно действующем аппарате происходит в результате трех процессов: абсорбции кислорода из барботирующего через среду воздуха, потребление кислорода микроорганизмами и вывода из аппарата растворенного кислорода с потоком микробной суспензии  $V_t$ . Принимаем содержание растворенного кислорода в поступающей в аппарат исходной среде  $C = 0$ .

Соответственно этим данным составим уравнение материального баланса:

$$V_p dC = K_L a (C_{\text{рп}} - C) V_p dt - q_{\text{O}_2} x V_p dt - V_t C dt, \quad (20)$$

где, кроме ранее принятых обозначений:  $V_p$  — рабочий объем аппарата (объем микробной суспензии в аппарате),  $\text{м}^3$ ;  $V_t$  — поток исходной питательной среды,  $\text{м}^3 \text{ч}^{-1}$ ;  $C$  — стационарная концентрация растворенного в культуральной среде кислорода,  $\text{кг O}_2 \text{м}^{-3}$ ;  $x$  — стационарная концентрация биомассы микроорганизмов в культуральной среде,  $\text{кг СБ м}^{-3}$ .

Принято, что поток выводимой из аппарата микробной суспензии равен потоку исходной питательной среды  $V_t$ .

Уравнение (20) можно преобразовать:

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C_{\text{рп}} - C) - q_{\text{O}_2} x - DC, \quad (21)$$

где  $D = V_t/V_p$  — коэффициент разбавления,  $\text{ч}^{-1}$ .

При установившемся режиме  $dC/dt = 0$  уравнение (21) для этого случая принимает вид

$$K_L a (C_{\text{рп}} - C) - q_{\text{O}_2} x - DC = 0. \quad (22)$$

Для реальных процессов  $K_L a$  на несколько порядков превышает  $D$ , т. е.  $K_L a \gg D$ , а  $(C_{\text{рп}} - C)$  одного порядка с  $C$ . При ука-

занных условиях членом  $DC$  в уравнении (22) можно пренебречь:

$$K_L a (C_{\text{рн}} - C) - q_{O_2} x = 0. \quad (23)$$

Уравнение (23) позволяет записать зависимость для определения минимального значения коэффициента массопередачи  $(K_L a)_{\text{мин}}$ , обеспечивающего достижение конструкцией и режимом работы вновь создаваемого непрерывно действующего аппарата заданной стационарной концентрации биомассы микроорганизмов в условиях абсорбции кислорода, не лимитирующей процесс:

$$K_L a = \frac{q_{O_2} x}{C_{\text{рн}} - C}. \quad (24)$$

При организации непрерывного процесса культивирования в имеющемся аппарате с массообменной характеристикой  $(K_L a)_{\text{ап}}$  максимальное значение стационарной концентрации биомассы, которое можно получить в этом аппарате при условии отсутствия лимитирования по кислороду роста микроорганизмов, составит:

$$x = (K_L a)_{\text{ап}} \frac{C_{\text{рн}} - C}{q_{O_2}}. \quad (25)$$

В настоящее время выполнено довольно много работ по масштабированию массообменных процессов, включая процесс абсорбции. Удовлетворительные расчетные данные дают формулы, полученные на основе экспериментальных данных для аналогичных по конструкции аппаратов.

Для расчета коэффициента массопередачи в аппаратах с аэрацией при механическом перемешивании среды можно рекомендовать расчетную формулу

$$K_L a = 10^{-6} (2,40 + 3,35 N_{\text{я}}) N_{\text{у}}^{0,56} W_{\text{г}}^{0,7} n^{0,9} \left( \frac{\text{моль}}{\text{л} \cdot \text{мин} \cdot \text{ат}} \right), \quad (26)$$

где  $N_{\text{я}}$  — число ярусов мешалки;  $N_{\text{у}}$  — удельная мощность мешалки, кВт м<sup>-3</sup>;  $W_{\text{г}}$  — фиктивная линейная скорость газа, м/мин;  $n$  — число оборотов мешалки в минуту.

## Глава 8. ХРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Основные задачи хранения микроорганизмов — поддержание их жизнеспособности, сохранение стабильности таксономически важных признаков, а также определенных свойств, представляющих интерес для науки и практики. Проблема длительного хранения микроорганизмов сводится к созданию условий анабиоза, т. е. к торможению процессов обмена веществ.

Хранение микроорганизмов осуществляется в специальных коллекциях типовых культур. В крупных коллекциях имеются

банки бактерий, мицелиальных грибов, дрожжей, водорослей, простейших, вирусов, культур тканей растений и животных. В общей сложности в разных странах насчитывается свыше 500 коллекций. В коллекциях жизнеспособность микроорганизмов поддерживается преимущественно следующими методами: 1) периодическими пересевами, 2) в условиях низких и ультранизких температур, 3) лиофилизацией, 4) высушиванием, 5) под минеральным маслом.

### **8.1. ПЕРИОДИЧЕСКИЕ ПЕРЕСЕВЫ (ИЛИ «СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЕ»)**

Периодические пересевы — наиболее традиционный, исторически сложившийся метод поддержания культур микроорганизмов. Со времен Пастера и Коха и до настоящего времени этот метод широко используется в различных лабораториях и является необходимым для микроорганизмов, которые не выдерживают замораживания или высушивания.

Пересевы культур микроорганизмов (главным образом аспорогенных) проводятся на свежие питательные среды один-два раза в месяц (иногда еженедельно); спорогенные бактерии, актиномицеты, дрожжи и мицелиальные грибы пересевают через два-три месяца. Время инкубации до начала хранения не должно превышать периода экспоненциального роста культуры. Как правило, культуры, находящиеся в начале стационарной фазы роста, лучше переносят условия хранения. Частые пересевы, особенно на жидкие среды, вызывают изменение свойств, способствуют возникновению спонтанных мутантов, которые могут снижать активность продуцентов биологически важных веществ. Для хранения следует использовать генетически однородную популяцию на плотной среде (если они на ней растут). Для предотвращения возможных изменений в популяции лучше приготовить серию субкультур, полученных из одной родительской культуры. Микроорганизмы между пересевами хранят в темноте при температуре от 5 до 20 °С.

Преимуществом метода периодических пересевов являются простота и удобный визуальный контроль частоты культуры, а также возможной морфологической изменчивостью колоний (образование R- и S-вариантов, пигментных, секторных и других колоний). Недостатками метода считаются: возможность заражения, краткосрочность хранения, а также трудоемкость работы и расход в больших количествах реактивов, входящих в состав питательных сред.

В качестве примера можно привести молочнокислые бактерии, характеризующиеся высокими требованиями к условиям культивирования. Во время периодических пересевов они часто утрачивают свои ценные производственные свойства. Известно, что актиномицеты и мицелиальные грибы при частых пересевах на богатые питательные среды также могут изменять диагности-

ческие признаки, снижать или полностью утрачивать способность к образованию антибиотических веществ. У грибов родов *Mucor*, *Rhizopus* после 18 лет поддержания периодическими пересевами ухудшился процесс спороношения.

Методом периодических пересевов (субкультур) в коллекциях обычно поддерживают ряд бактерий, включая чувствительные к хранению спирохеты, микоплазмы, а также дрожжи, мицелиальные грибы, водоросли, простейшие.

## **8.2. ХРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ НИЗКИХ И УЛЬТРАНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ**

Начиная с 60-х годов для длительного хранения бактерий, бактериофагов, мицелиальных грибов, дрожжей, микроформ водорослей, простейших используют низкие и ультранизкие температуры. Вопросами действия низких температур на биологические системы занимается недавно возникшая наука «криобиология».

Общепринято для хранения при низких температурах густые суспензии микроорганизмов в криозащитной среде, предохраняющей их от возможных повреждений, разливать (0,5—1,0 мл) в стеклянные или пластиковые ампулы или пробирки (флаконы) с завинчивающимися пробками. В небольших лабораториях в качестве криоагентов наиболее часто используют смесь льда или снега (3 г) с NaCl (1 г), имеющую температуру  $-21^{\circ}\text{C}$ ; смесь льда (2 г) с  $\text{CaCl}_2$  (1 г) с температурой  $-56^{\circ}\text{C}$ ; твердую углекислоту ( $-78^{\circ}\text{C}$ ). Замораживание клеток ведется в сосудах Дюара.

Микроорганизмы замораживают в рефрижераторах при температуре от  $-12$  до  $-80^{\circ}\text{C}$ . В последние годы для хранения микроорганизмов в крупных коллекциях используют рефрижераторы с азотом: газовой фазой ( $-130$ ,  $-170^{\circ}\text{C}$ ) и жидкофазовой ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), рефрижераторы емкости от 10 до 35 л. В жидком азоте хранятся микроорганизмы, не выдерживающие лиофилизации, например некоторые автотрофные бактерии, спирохеты, микоплазмы, водные фикомицеты, различные вирусы. В жидком азоте лучше всего сохраняют стабильность признаков закваски (стартовые культуры) молочнокислых бактерий, а также тест-культуры бактерий и дрожжей, используемые для определения витаминов и антибиотической активности.

Сохранение жизнеспособности микроорганизмов при замораживании и оттаивании зависит от природы организмов, возраста и плотности популяции, условий культивирования, криопротекторов, скорости замораживания — оттаивания и других факторов.

**Особенности микроорганизмов.** Даже штаммы одного вида могут отличаться чувствительностью к низким температурам. Грамположительные бактерии обычно более устойчивы к замораживанию, чем грамотрицательные.

**Возраст и плотность популяции.** Для любого вида хранения микроорганизмы выращивают при оптимальных условиях до начала стационарной фазы. Микроорганизмы при периодическом культивировании в экспоненциальной фазе роста обычно более чувствительны к холодовому шоку, чем в стационарной фазе. Споры более устойчивы к замораживанию, чем вегетативные клетки.

Для хранения, как правило, готовят густую суспензию ( $10^8$ — $10^{12}$  клеток/мл) микроорганизмов. Известно, что при различных стрессах густая суспензия повреждается в меньшей степени, чем популяция низкой плотности. В этих условиях действует так называемый популяционный эффект.

### 8.2.1. Условия культивирования

Микроорганизмы, выращенные на синтетической среде, обычно более чувствительны к действию различных стрессов, чем клетки, полученные на богатой питательной среде, содержащей сложные компоненты. Изменяя состав среды, можно подобрать условия, способствующие синтезу в клетках таких соединений, как гликогенподобные резервные вещества, липиды, пептиды, которые защищают их от повреждений при замораживании — оттаивании.

Например, у *Lactobacillus bulgaricus* после внесения в питательную среду 0,1% олеата натрия (или Твин 20) увеличилось содержание  $C_{19}$ -циклопропановой кислоты в составе фосфолипидной фракции клеточных жирных кислот и гибель клеток снизилась (до 48%) при замораживании в жидком азоте.

### 8.2.2. Криопротекторы

Давно замечено, что микроорганизмы, замороженные в солевом растворе или в бульоне, быстро погибают; вода — умеренно летальна, а глицерин и молоко обладают защитным действием. После установления протективных свойств глицерина многие соединения испытывали для защиты микроорганизмов от повреждающего действия низких температур. В качестве криопротекторов применяются как низкомолекулярные вещества (10—20%-ный глицерин, 7—10%-ный диметилсульфоксид, 10—20%-ная сахароза), так и высокомолекулярные (белки, 10%-ный поливинилпирролидон). Условно их подразделяют на две группы: 1) вещества, проникающие в клетки (глицерин, диметилсульфоксид); 2) вещества, не проникающие в клетки (например, поливинилпирролидон).

Механизм криозащитного действия этих веществ окончательно не выяснен. Предполагается, что криопротекторы уменьшают концентрацию электролитов, противодействуют осмотическому давлению, изменяют структуру воды вне клеток, действуют на поверхность и проницаемость клеток.

### 8.2.3. Механизм повреждения клеток при замораживании — оттаивании

Для объяснения повреждений клеток при замораживании предложено много теорий. Согласно самой ранней теории образование кристаллов льда внутри клеток вызывает механическое повреждение клеточных мембран и последующую гибель клеток.

Другая популярная теория объясняет повреждение клеток как следствие увеличивающейся концентрации в них солей при быстром удалении воды при образовании льда вне- и внутриклеточно. Концентрация внутриклеточных растворов вызывает изменение pH и увеличение скорости реакций между компонентами даже при очень низкой температуре, что приводит к денатурации таких макромолекул, как белки, ДНК и РНК, и к нарушению клеточных мембран.

В настоящее время признается, что повреждения клеток могут возникать в зависимости от скорости охлаждения. При медленной скорости охлаждения, когда внутриклеточная вода не замерзает, происходит дегидратация клеток и увеличивается концентрация солевых растворов, которые ответственны за их повреждения. При средней скорости охлаждения (до  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже) около 90% внутриклеточной воды замерзает, остальные 10% составляет «связанная» вода. При высоких скоростях охлаждения образуются внутриклеточные кристаллы льда, вызывающие повреждения и гибель клеток. Высказывается предположение, что при быстрой скорости охлаждения замерзание воды внутри клетки происходит благодаря проникновению льда через клеточную мембрану. Видимо, существует связь между величиной кристаллов льда и выживаемостью микроорганизмов. Полагают, что при быстром охлаждении в мембранах образуются гидрофильные каналы, через которые происходит утечка из клеток веществ. При медленном охлаждении липидные цепочки перестраиваются и препятствуют образованию таких каналов. Оптимальной скоростью охлаждения считается та, при которой клетки подвергаются наименьшим повреждениям.

### 8.2.4. Скорость замораживания и оттаивания

В последние годы большое внимание уделяется влиянию скорости замораживания и оттаивания на жизнеспособность клеток. Различают скорость охлаждения до точки замерзания суспензии и скорость охлаждения от точки замерзания суспензии.

Для различных микроорганизмов существует оптимальная скорость охлаждения. Например, у ряда бактерий (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter chroococcum* и некоторых других) оптимум выживаемости наблюдали при скорости охлаждения  $5-40^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , у дрожжей —  $7^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Грамположительные (*Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*) и грамотрицательные бактерии (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*,

*Serratia marcescens*) не повреждались при очень быстром замораживании ( $10^5$  градус/мин) в атмосфере жидкого и твердого азота на мембранных фильтрах. Не было отмечено различий и в скорости их роста, и в морфологии колоний после быстрого оттаивания.

Лучшие результаты выживаемости получены при двухэтапном режиме охлаждения: сначала с медленной скоростью охлаждения ( $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ ) до  $-30^\circ\text{C}$  и затем быстрым охлаждением со скоростью от  $15-30^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-150^\circ\text{C}$ . Ампулы хранят в жидком азоте при  $-196^\circ\text{C}$ .

Следует подчеркнуть, что необходимо измерять скорость охлаждения образца, а не охлаждающей бани. Скорость оттаивания образца должна быть быстрой. Особенно это имеет значение в случае быстрого и ультрабыстрого охлаждения для предупреждения повреждений, вызываемых рекристаллизацией льда. Обычно образец оттаивают в водяной бане при  $+30$ ,  $+45^\circ\text{C}$ .

Преимущества метода криогенного хранения состоят в следующем: малой вероятности заражения культуры, сохранении стабильными свойств микроорганизмов, затрате небольшого времени и небольшого количества материалов при подготовке культуры к хранению. Клетки можно легко извлечь из рефрижератора и использовать без пересевов в качестве прямого инокулята.

Трудности метода: требует специально оборудованного рефрижератора и регулярного контроля его работы. Необходимы меры предосторожности при проверке герметичности стеклянных ампул для предупреждения взрыва.

### 8.3. ЛИОФИЛИЗАЦИЯ

Особое значение в последние десятилетия приобрел метод лиофилизации (freeze-drying), заключающийся в высушивании клеток из мороженого состояния под вакуумом, минуя жидкую фазу (по типу сублимации).

Впервые этот метод был применен для гистологических исследований Альтманом (Altman, 1890). Первые опыты по лиофилизации бактерий провел Хаммер (Hammer, 1909—1914). В настоящее время лиофилизация широко используется в крупных коллекциях для длительного (более 30 лет) хранения разных бактерий, включая актиномицеты, микоплазмы, а также мицелиальных грибов, дрожжей, водорослей, простейших, вирусов, вакцин и плазмы крови. Например, представители сапрофитных микроорганизмов в коллекции кафедры микробиологии МГУ хранятся в лиофилизированном состоянии свыше 25 лет; микобактерии в коллекции в ЧССР — 25 лет.

В процессе лиофилизации микроорганизмы подвергаются действию различных стрессов: замораживания, высушивания, регидратации и др. Важным достижением является установление причин, вызывающих повреждение клеток при лиофилизации,



и подбор условий, обеспечивающих сохранение жизнеспособности и стабильности признаков.

На основании результатов многочисленных исследований, проведенных сначала на патогенных и условно патогенных, а затем сапрофитных формах, выяснено, что выживаемость лиофилизированных микроорганизмов зависит от специфической чувствительности вида и штамма, стадии роста культур, концентрации клеток, состава защитных сред, режима лиофилизации, условий хранения (температура, газовая атмосфера, свет), условий реактивации (состав и показатель активности воды —  $a_w$  среды, продолжительность хранения).

### 8.3.1. Защитные среды

Особенно важное значение имеет состав защитных или суспензионных сред, в которых лиофилизируют клетки. В первых работах бактерии лиофилизировали в бульоне или молоке, фактически используя их в качестве защитных сред. Микроорганизмы, лиофилизированные в дистиллированной воде или физиологическом растворе, имели низкую выживаемость и плохо сохранялись. Защитные среды для различных видов микроорганизмов подбирали эмпирически.

Установлено, что протекторными свойствами обладают сложные вещества: сыворотка крови, белки сыворотки, желатина, молоко, бульон, декстрин, крахмал, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, пептон.

Защитный эффект на микроорганизмы оказывают и простые вещества: глюкоза, сахароза, галактоза, глутамат натрия, аспарат натрия и некоторые другие. Наиболее часто применяются сложные среды: 1% желатины + 10% сахарозы; обезжиренное молоко + 7% глюкозы; 75% лошадиной сыворотки + 25% бульона + 7,5% глюкозы; 2% декстрина + 0,5% хлористого аммония + 0,5% тиомочевины + 0,5% аскорбиновой кислоты; телячья сыворотка + 5% мезо-инозита; 10% сухого молочного порошка + 1% глутамата натрия. Лучше одновременно использовать две-три защитные среды (табл. 8.1).

Существуют различные гипотезы о механизме действия защитных сред. 1. Защитная среда должна содержать вещество, способное сохранять остаточную влажность до определенного уровня; минимальное количество электролитов; вещество, формирующее механический каркас (матрицу), на котором высушиваются организмы. 2. Механизм защиты клеток часто связывают с физико-химическими факторами. Низкомолекулярные соединения (сахара), проникая в клетку, создают большое осмотическое давление, растворяют метаболиты и препятствуют разрыву клеточной оболочки во время высушивания. Высокомолекулярные белки и другие полимеры не проникают внутрь клетки, но создают некоторое осмотическое давление вне клетки и заставляют клеточную оболочку плотнее прилегать к плазме при

**Таблица 8.1. Выживаемость лиофилизированных микроорганизмов после 12 лет хранения в зависимости от состава защитной среды\***

Микроорганизмы	Число жизнеспособных клеток в 1 мл	
	1% желатина + + 10% сахара- розы	молоко + 7,5% глюкозы
<i>Azotobacter chroococcum</i>	$5 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$
<i>Acetobacter xylinum</i>	$2 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^5$
<i>Chromatium minutissimum</i>	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$
<i>Lactobacillus penioaceticus</i>	$7 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^8$
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$4 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$
<i>Rhizobium pisum</i>	$3 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^7$
<i>Torula utilis</i>	$3 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^4$

\* Коллекция кафедры микробиологии МГУ.

регидратации клеток. З. По другой гипотезе протекторные свойства отдельных соединений тесно связаны с их химической структурой: с наличием трех или более водородных связей и ионизирующих групп в подходящей конформации, у глутаминовой кислоты и аргинина — с  $\text{NH}_2$ -группой, а у сахаров и полиспиртов — присутствием более пяти ОН-групп. Предполагается, что протекторные растворы стабилизируют клеточные структуры вблизи клеточной мембраны.

### 8.3.2. Режим лиофилизации

Для лиофилизации используют различные аппараты и режимы. Например, во Всесоюзной коллекции микроорганизмов АН СССР лиофилизацию проводят в центробежно-сублимационном аппарате, а досушивание — в сублимационном аппарате.

Концентрированную суспензию микроорганизмов ( $10^9$ — $10^{10}$  клеток/мл) в защитной среде (снятое молоко + 5% лактозы + 5% сахарозы) разливают по 0,2 мл в ампулы из нейтрального стекла. Ампулы охлаждают до  $-20$ ,  $-24$  °С с одновременным досушиванием при температуре сублиматора 20, 26 °С, рефрижератора — 45,  $-60$  °С, при вакууме порядка  $1 \cdot 10^{-3}$  (0,11—0,07 мм рт. ст.). Длительность замораживания — досушивания 5—6 ч, досушивания — 2 ч. Ампулы запаивают под вакуумом и хранят при 4 °С в темноте.

### 8.3.3. Условия хранения

Лиофилизированные клетки лучше сохраняются под вакуумом или в атмосфере инертного газа (аргон, неон, гелий, криптон), чем на воздухе. Кислород оказывает токсичное дей-

ствие; его эффект коррелирует с образованием свободных радикалов и (или) с повреждением клеточной мембраны. Лиофилизированные культуры желательно хранить при температуре 4—6 °С. Многими работами показано, что с увеличением температуры хранения от 18 до 37 °С число жизнеспособных клеток уменьшается.

Количество воды, оставшейся после высушивания, влияет не только на жизнеспособность клеток непосредственно после лиофилизации, а также на скорость их отмирания во время хранения. Оптимум остаточной влажности (2—6%) варьирует в зависимости от состава среды, в которой микроорганизмы высушивали, атмосферы хранения, а также от вида и физиологического состояния микроорганизмов. Сверхвысушивание (ниже 0,5—1,5% влажности) является губительным.

Лиофилизированные клетки, как правило, необходимо хранить в темноте; при хранении на свету выживаемость их резко падает.

### 8.3.4. Условия реактивации

Большое значение придается процессу реактивации, т. е. выведению лиофилизированных клеток из состояния анабиоза. Условия, снижающие осмотический шок и стресс, возникающий при вскрытии ампул, увеличивают процент выживаемых клеток. Хорошие результаты получены при медленном добавлении дистиллированной или водопроводной воды (0,2—1,0 мл) к сухим клеткам. В качестве регидратантов применяют также мясной бульон, пептон, растворы органических кислот и различные питательные среды. В некоторых коллекциях лиофилизированные бактерии регидратируют в питательном бульоне в течение 10 мин, а грибы — в водопроводной воде в течение 15—20 мин.

Микроорганизмы, поврежденные в процессе замораживания — высушивания, хранения и регидратации, отличаются повышенной чувствительностью к среде реактивации и лучше всего восстанавливают свои свойства при культивировании на богатых естественных средах после нескольких пассажей.

Наиболее часто при лиофилизации повреждаются клеточные стенки, клеточные мембраны и РНК. После регидратации поврежденные клетки *Escherichia coli* сначала восстанавливают свою измененную проницаемость, а затем начинают синтезировать РНК и белки. Эти репарационные процессы заканчиваются в период начала репликации ДНК. Лиофилизированные клетки имеют удлинненную лаг-фазу роста, но она сокращается после внесения в среду культивирования растворов пептида и аминокислот.

### 8.3.5. Влияние лиофилизации на выживаемость и свойства микроорганизмов

Результаты многочисленных исследований доказывают, что лиофилизация является надежным способом сохранения жизнеспособности большого числа видов микроорганизмов и стабильности важных признаков у тех видов, которые выдерживают этот процесс на протяжении многих лет хранения.

Например, на кафедре микробиологии МГУ после 20—25 лет хранения сохранили жизнеспособность и стабильность свойств представители многих родов бактерий: грамположительных — *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*; грамотрицательных — *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Chromatium*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, а также дрожжей рода *Torula*.

Однако известны факты изменения структуры и физико-биохимических свойств микроорганизмов в результате замораживания — высушивания. Данные электронно-микроскопических исследований показывают уменьшение размеров лиофилизированных клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *E. coli* после реактивации. Отмечается изменение морфологии лиофилизированных клеток клубеньковых бактерий, *Azotobacter* и  *Beijerinckia*, цианобактерии рода *Spirulina*. У отдельных штаммов микроорганизмов происходят задержка скорости роста и пигментообразования, снижение антибиотической и бродильной активностей или даже потеря отдельных признаков. Но некоторые микроорганизмы после регидратации отличаются повышением биохимической активности. Например, отмечали увеличение активности фиксации  $N_2$  у азотобактера и у клубеньковых бактерий, повышение скорости поглощения кислорода у *E. coli*.

В лиофилизированном состоянии часто хранят продуцентов биологически активных веществ. Например, лиофилизированные актиномицеты — продуценты стрептомицина, хлортетрациклина и окситетрациклина, не снижают уровня антибиотической активности в течение трех-четырёх лет. Грибы родов *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* — продуценты органических кислот, антибиотиков и ферментов, сохраняют активность в течение двух лет хранения. Лيوфилизированные молочнокислые бактерии сохраняют без изменений морфологические и биохимические свойства до 10 лет хранения.

В коллекции промышленных бактерий (Шотландия) и в других крупных коллекциях в лиофилизированном состоянии обычно хранят тест-культуры бактерий, используемые для определения витаминов и аминокислот. Ауксотрофные и прототрофные мутанты *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* (продуценты L-лизина, DL-аланина и L-глутаминовой кислоты) успешно хранили в течение трех лет. Для хранения мутантов отбирают генетически однородную популяцию. В лиофилизированном состоянии хорошо сохраняются бактериальные препара-

ты (энтомопатогенные, нитрагин), вакцины, сыворотки. Лиофилизированный материал в ампулах удобен для транспортировки.

#### 8.4. ХРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВЫСУШЕННОМ СОСТОЯНИИ

Высушивание — простейший метод хранения микроорганизмов. Многие микроорганизмы хорошо переносят длительное воздушное высушивание в природе (в почве, песке, глине) и в различных пищевых продуктах. В процессе высушивания происходит обезвоживание микробных клеток. В живых клетках вода составляет 80—90% массы. Во время высушивания клетки теряют свободную воду и рост микроорганизмов прекращается при остаточной влажности, равной 10—12%. При снижении остаточной влажности до 2—5% сохраняется прочно связанная с клеточными структурами вода, которая строго локализована. В высушенных таким образом клетках биохимические реакции приостанавливаются или отдельные реакции протекают очень медленно. В настоящее время ведутся интенсивные исследования механизмов устойчивости к высушиванию у разных организмов.

Резистентность микроорганизмов к высушиванию зависит от многих факторов: свойств микроорганизмов, среды и условий культивирования, методов высушивания, остаточной влажности, условий хранения и реактивации.

##### 8.4.1. Свойства микроорганизмов

Процесс высушивания лучше всего переносят спорообразующие виды. Эндоспоры, цисты, конидии, артроспоры, вероятно, возникли у микроорганизмов в процессе эволюции для перенесения неблагоприятных условий окружающей среды. Споры бактерий отличаются наибольшей устойчивостью к высушиванию. Еще Пастер (1861) отмечал, что высушивание увеличивает резистентность бактериальных спор. Споры *Bacillus anthrax*, приготовленные Пастером в 1888 г., остались жизнеспособными через 68 лет хранения. В течение 200—300 лет сохранили жизнеспособность споры бактерий в сухой почве на корнях растений (главным образом трав) в гербариях. Выделены жизнеспособные эндоспоры термоактиномицетов из естественных образцов, датированных I—II вв. н. э. Но и это, вероятно, не предел.

Споры *Clostridium acetobutylicum* через 38 лет хранения в песке сохранили способность к размножению и брожению. Цисты *Azotobacter vinelandii*, высушенные на кремнегелевых пластинках при 40—45 °С, хранились в стерильных пробирках в течение двух лет. Этот принцип используется в настоящее время для получения сухого препарата азотобактерина. Споры многих видов мицелиальных грибов и актиномицетов в коллекциях хорошо сохраняются в стерильной почве или на естественно высохших

агаризованных средах. Но остается необъясненным механизм резистентности спор. Большинство теорий предполагает, что резистентность спор является результатом низкого содержания воды в их протопласте.

Как правило, аспорогенные микроорганизмы, особенно морские и пресноводные, быстро погибают при высушивании. Но патогенные стрептококки и стафилококки отличаются высокой устойчивостью к высушиванию. Это имеет большое значение в связи с переносом инфекционных заболеваний. Существуют, однако, внутриштаммовые различия *Streptococcus aureus* по чувствительности к высушиванию. Хорошо переносят длительное (30—45 лет) пребывание в сухой почве клубеньковые бактерии. Коллекция бактерий рода *Rhizobium* Ротамстедской станции (Англия) с 1964 г. поддерживается в высушенном состоянии.

#### 8.4.2. Среда и условия культивирования

Состав среды, соотношение углерода и азота, условия аэрации, рН среды влияют на резистентность микроорганизмов. Обычно дрожжи, богатые углеводами и липидами, лучше переносят высушивание. Голодающие по азоту дрожжи, с нарушенным пулом аминокислот, отличаются повышенной чувствительностью к высушиванию.

#### 8.4.3. Методы высушивания

В небольших лабораториях широко применяется воздушное высушивание спорообразующих микроорганизмов на различных адсорбентах: в стерильной почве, песке, глине, силикагеле, на пшене, фильтровальной бумаге, вате, стеклянных и фарфоровых бусах, тканях, пластмассах, нерастворимом фосфате, углекислом кальции, крахмале, кристаллах сахарозы и др. Причины лучшего сохранения микроорганизмов на адсорбентах пока не ясны. По-видимому, адсорбенты защищают микроорганизмы от сильного высухания, связывают свободную воду и поддерживают определенный уровень влажности.

Ряд микроорганизмов, не выдерживающих лиофилизации, переносит высушивание под вакуумом на сухих таблетках пептона, крахмала, декстрана, а также на бумажных, целлофановых или желатиновых дисках. Густую суспензию бактерий смешивают с 10% расплавленной желатины и полученную смесь, содержащую около  $10^{10}$  клеток/мл, высушивают на стерильных дисках в вакуумной сушилке над  $P_2O_5$ . Диски с клетками микроорганизмов хранят в закрытых флаконах в рефрижераторе. Разновидностью этого метода является L-высушивание, или высушивание из жидкого состояния: микроорганизмы в суспензионной среде высушивают под вакуумом в стеклянных ампулах, погруженных в водяную баню с контролируемой температурой.

В производственной практике широко применяют методы кон-

тактной (с адсорбентом) и конвективной (в сухом воздухе) сушилки для хранения хлебопекарных и кормовых дрожжей, заквасок молочнокислых бактерий, бактериальных удобрений (нитрагин), энтомопатогенных препаратов и др.

#### 8.4.4. Условия реактивации

Процесс реактивации микроорганизмов из высушенного состояния включает: увлажнение клеток (регидратация), ликвидацию повреждений клеточных структур (репарация) и восстановление численности популяции путем размножения жизнеспособных клеток. Кинетика процессов реактивации клеток остается мало изученной. Известно, что высушивание приводит к удлинению лаг-фазы роста и для восстановления скорости размножения требуется определенное время. Процесс реактивации обычно лучше происходит в полноценной питательной среде.

Терморезистентность микроорганизмов связана с активностью воды ( $a_w$ ) окружающей среды. Значение  $a_w$  для дистиллированной воды равно 1,00. Эта величина уменьшается при растворении в воде некоторых веществ (NaCl, сахароза, глюкоза, глицерин и др.). Микроорганизмы могут расти на средах со значениями  $a_w$  от 0,98 до 0,62. Большинство бактерий растет на средах с  $a_w$ , равном 0,98—0,93, но некоторые, например галофильные бактерии, растут на средах с  $a_w$  0,75—0,88. Для различных видов дрожжей —  $a_w$  0,95—0,86, для мицелиальных грибов  $a_w$  0,97—0,60.

Существует зависимость между температурой хранения, pH и  $a_w$  среды. Величина  $a_w$  имеет большое значение в связи с вопросами выживаемости и размножения микроорганизмов при термической обработке пищевых продуктов. Снижение  $a_w$  среды предотвращает развитие микроорганизмов в пищевых продуктах, следовательно, защищает продукты от гниения.

Методы высушивания благодаря своей простоте нашли широкое применение в лабораториях и в практике. Высушенные культуры микроорганизмов легко хранить и транспортировать.

#### 8.5. ХРАНЕНИЕ ПОД МИНЕРАЛЬНЫМ МАСЛОМ

Метод хранения под минеральным маслом применяется для сохранения крупных коллекций и в условиях лабораторий. Он отличается простотой, не требует специальной аппаратуры и обеспечивает относительно длительное сохранение жизнеспособности и стабильности признаков большинства микроорганизмов различных систематических групп.

Впервые Люмьер и Шевротье (Lumiere, Chevrotier, 1914) применили вазелиновое масло для хранения гонококков. Принцип метода заключается в следующем: культуру микроорганизмов выращивают на благоприятной питательной среде и заливают стерильным вазелиновым маслом. Слой масла (0,5—1,0 см)

замедляет скорость обменных процессов («reduced metabolism») микроорганизмов и предохраняет поверхность среды от высыхания.

Аэробные микроорганизмы выращивают в пробирках на поверхности коротко скошенной (под углом  $45^\circ$ ) питательной агаризованной среды (5—6 мл). Бактерии, растущие в анаэробных условиях, например пропионовокислые бактерии, сеют уколом в столбик агаризованной среды. Молочнокислые и некоторые светящиеся бактерии культивируют в полужидкой среде с 0,25—0,40% агара. При определении срока заливки культур маслом следует обращать внимание на образование у них покоящихся форм (спор, цист). Аспорогенные микроорганизмы лучше заливать маслом в начале стационарной фазы роста, а спорообразующие — в стадии спор, актиномицеты и мицелиальные грибы 7—14-суточные, дрожжи 12—14-суточные.

Для хранения применяют высокоочищенное медицинское вазелиновое масло (плотность 0,8—0,9). Масло стерилизуют 60 мин в автоклаве (давление  $1 \cdot 10^4$  Па), затем прогревают в сушильном шкафу при температуре не выше  $150^\circ\text{C}$  для удаления воды или выдерживают при комнатной температуре 2—3 сут. Масло наливают не выше 1 см над верхним краем среды. Более тонкий слой масла не предохраняет среды от высыхания. Микроорганизмы хранят при  $5^\circ\text{C}$  или при комнатной температуре в темноте. При пересеве избыток масла удаляют прикосновением петли к внутренней стенке пробирки. Капли масла на поверхности питательной среды снижают скорость роста культур в первом пассировании. Для определения числа жизнеспособных клеток масло оттягивают пипеткой, содержимое пробирки переносят обычно в колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды и делают высев на плотную среду из серии разведений. Для определения выживаемости дрожжей применяют метод подсчета под микроскопом микроколоний, выросших на покровном стекле в тонком слое усло-желатины.

### 8.5.1. Продолжительность хранения

В крупных коллекциях культуры бактерий, включая актиномицеты, а также мицелиальных грибов и дрожжей часто поддерживают под слоем масла. Для микроорганизмов различных систематических групп устанавливают определенные сроки пересевов. Во время длительного хранения идет процесс отмирания клеток. Поэтому особо чувствительные микроорганизмы, как правило, пересевают из-под масла один-два раза в год. Большинство видов дрожжей пересевают раз в год. Мицелиальные грибы в начале хранения пересевают через год, а затем каждые два-три года.

Большинство испытанных сапрофитных бактерий сохраняют жизнеспособность под вазелиновым маслом без пересевов в течение 8—14 лет. Во Всесоюзной коллекции микроорганизмов



ИБФМ АН СССР 155 штаммов рода *Bacillus* сохраняли жизнеспособность при хранении под маслом в течение шести лет (срок не предельный). Успешно хранятся под маслом в течение четырех-пяти лет представители родов *Rhizobium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Propionibacterium*, *Arthrobacter*.

Аэробные грамположительные бактерии, видимо, несколько более устойчивы при хранении под слоем масла, чем грамотрицательные.

Род микроорганизма	Выживаемость, %
<i>Bacillus</i>	100
<i>Arthrobacter</i>	92
<i>Sarcina</i>	73
<i>Brevibacterium</i>	70
<i>Pseudomonas</i>	100
<i>Aeromonas</i>	94
<i>Alcaligenes</i>	87
<i>Enterobacter</i>	50

Метод оказался надежным для четырехлетнего хранения грибов из числа *Oomycetes* и *Fungi imperfecti*, продуцентов антипротозойных антибиотиков. Ранее их поддерживали периодическими пересевами и лишь немногие сохранялись после лиофилизации.

### 8.5.2. Влияние хранения на свойства микробов

Признаки микроорганизмов после относительно длительного хранения под маслом остаются большей частью стабильными. Но иногда хранение под маслом вызывает задержку роста микробов (в 1,5—2 раза по сравнению с периодически пересеваемыми культурами) и снижает скорость использования ими питательных субстратов. Через два-три пассажа на питательной среде того же состава, на которой хранится культура, скорость роста и ферментативная активность восстанавливаются.

У некоторых мицелиальных грибов после хранения под маслом обнаружены признаки утраты спороношения, уменьшения скорости роста, образования секторных колоний. Грибы родов *Penicillium* и *Aspergillus* под маслом сохраняются хуже, чем при периодических пересевах. Хранение проактиномицета — продуцента ристомидина на плотных питательных средах под маслом позволяет сохранить активность в течение 1,5—2 лет. Мутовчатые актиномицеты, образующие полиеновые антибиотики (трихомицин, микогептин, кандин), сохраняются под вазелиновым маслом до пяти лет.

Следовательно, можно заключить, что хранение под маслом имеет следующие преимущества: обеспечивает относительно дли-

тельное сохранение стабильности свойств большинства микроорганизмов; сокращает время, необходимое для приготовления сред и пересевов; из одной пробирки можно отобрать инокулят несколько раз.

К недостаткам этого метода следует отнести возможность инфицирования лаборатории и работающего персонала из-за разбрызгивания масла при обжигании петли. Поэтому во время работы следует применять необходимые меры предосторожности. Требуется также время для очистки от масла использованной посуды.

#### 8.6. ХРАНЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ

Вышеизложенные данные позволяют заключить, что для хранения микроорганизмов могут быть использованы различные методы. Некоторые микроорганизмы целесообразно хранить только в одних условиях, другие микроорганизмы при возможности выбора предпочтительно сохранять в условиях, обеспечивающих максимальную выживаемость.

**Бактерии.** Бактерии многих видов успешно сохраняются в лиофилизированном состоянии. Наиболее чувствительны к лиофилизации представители родов *Haemophilus*, *Neisseria*, *Campylobacter*. Жидкий азот часто используют для хранения молочно-кислых бактерий, а также бактерий, которые не выдерживают лиофилизации. Большинство бактерий поддерживают субкультивированием и под вазелиновым маслом. Жизнеспособность их может быть продлена хранением при низких температурах. Отдельные виды хорошо переносят L-высушивание. Фитопатогенные бактерии, а также *E. coli*, *P. fluorescens*, *Serratia marcescens* и споры бактерий сохраняют жизнеспособность при хранении густой суспензии в дистиллированной воде и в физиологическом растворе от 1 года до нескольких лет (табл. 8.2). Спирохеты часто трудно сохранить, за исключением субкультур, для поддержания которых требуются живые животные. Высушивание в пептонно-крахмальных таблетках, а также L-высушивание и лиофилизацию использовали для хранения *Leptospira* и *Treponema*.

Актиномицеты часто сохраняют исходный уровень антибиотической активности при консервации спор на высушенных питательных средах или в почве, а также в лиофилизированном состоянии.

**Мицелиальные грибы.** Многие виды грибов сохраняются лиофилизированными в суспензионных средах: сыворотка, сахара, обезжиренное молоко. В жидком азоте могут успешно храниться грибы, не выдерживающие лиофилизации, например *Entomophorales*, водные фикомицеты и виды с очень большими спорами. Хранение грибов под маслом является общепринятым методом. Используются также периодические пересевы, методы высушива-

Т а б л и ц а 8.2. Продолжительность хранения некоторых микроорганизмов различными методами

Род микроорганизма	Периодичность посева	Минеральное масло	Стерильные: почва — а, песок — б, сыпучий — в	1% ный раствор NaCl	Дистиллированная вода	Низкие температуры	Жидкий азот (—196°С)	Лиофилизация
<b>Бактерии</b>								
<i>Acetobacter</i>	1—2 мес	9—12 мес	4 г <sup>в</sup>	6—12 мес	6—12 мес	3—4 г	30 лет	30 лет
<i>Actinomyces</i>	1—2 мес	8 лет	4 г <sup>а</sup>	3—6 лет		2—3 г	30 лет	30 лет
<i>Agrobacterium</i>	1—2 мес	1—2 г	1—2 г <sup>а</sup>		3 г	3 г	30 лет	30 лет
<i>Arthrobacter</i>	1—2 мес	4—5 лет	10 лет <sup>а</sup>		4 г	4 г	30 лет	30 лет
<i>Azotobacter</i>	1—2 мес	5—7 лет	10 лет <sup>б</sup>				20 лет	20 лет
<i>Bacillus</i>	2—12 мес	4—7 лет	10 лет <sup>б</sup>	2 г	2 г	2—3 г	30 лет	30 лет
<i>Chromatium</i>	1 мес						10 лет	20 лет
<i>Clostridium</i>	6—12 мес	1—2 мес	30 лет <sup>а</sup>			2—3 г	30 лет	30 лет
<i>Escherichia</i>	1—4 мес	2 г		2 г	1 г	4 г	30 лет	30 лет
<i>Glucopobacter</i>	1 мес	2 г		1 г	2 г	4 г	30 лет	30 лет
<i>Lactobacillus</i>	20 сут	8 мес				4 г	30 лет	30 лет
<i>Methanobacterium</i>	1 мес					20 мес	10 лет	10 лет
<i>Methanomonas</i>	1 мес	4—5 лет		3 г	4 г	20 мес	10 лет	10 лет
<i>Mycobacterium</i>	2 мес	1 г				5 лет	20 лет	20 лет
<i>Nocardia</i>	1—4 мес	4—5 лет				1—2 г	20 лет	20 лет
<i>Propionibacterium</i>	1 мес	1 г					20 лет	20 лет
<i>Proteus</i>	1—2 мес	4—5 лет				1—2 г	30 лет	30 лет
<i>Pseudomonas</i>	1—3 мес	2 г		1—2 г	1—2 г	5 лет	30 лет	30 лет
<i>Rhizobium</i>	1—2 мес	5—6 лет	30 лет <sup>а</sup>				20 лет	20 лет
<i>Rhodococcus</i>	1—2 мес	5 лет		1 г	1 г	4 г	20 лет	20 лет
<i>Serratia</i>	2 мес	4—5 лет		2 г	6—7 лет		20 лет	20 лет
<i>Spirillum</i>	2 мес	2 г				1 г	30 лет	30 лет
	ежедневно	6 мес						
	НО							
<i>Staphylococcus</i>	1—2 мес	3 г	1 г <sup>а</sup>			4 г	30 лет	30 лет
<i>Streptococcus</i>	1—2 мес	1—3 г	1 г <sup>а</sup>			4 г	30 лет	30 лет
<i>Streptomyces</i>	1—8 мес	6—8 лет	2—3 г <sup>а</sup>	3 г		1—3 г	30 лет	30 лет

Продолжение табл. 8.2

Род микроорганизма	Периодичность пересевов	Минеральное масло	Стерильные: почва — а, песок — б, силикатгель — в	1%-ный раствор NaCl	Дистиллированная вода	Низкие температуры	Жидкий азот (—196°C)	Лиофилизация
<b>Дрожжи</b>								
<i>Candida</i>	4—6 мес	4—6 лет	10 лет <sup>в</sup>		2—4 г	2 г	> 5 лет*	30 лет
<i>Saccharomyces</i>	4—6 мес	1—6 лет	10 лет <sup>в</sup>		2 г	3—20 лет	> 5 лет*	30 лет
<b>Мицелиальные грибы</b>								
<i>Aspergillus</i>	4—6 мес	3—4 г	10—20 лет <sup>а</sup>	2—3 г	2—3 г	2—5 лет	> 10 лет*	18 лет
<i>Penicillium</i>	4—6 мес	2—3 г	10—20 лет <sup>а</sup>	2—3 г	2—3 г	2—5 лет	> 10 лет*	18 лет

\* Срок хранения неопределенный.

ния (в стерильной почве, на питательных средах и др.), хранение при —20°C, в дистиллированной воде и в физиологическом растворе (табл. 8.2).

**Дрожжи.** Методы, используемые для хранения грибов, являются удовлетворительными и для поддержания дрожжей. Широко применяется хранение дрожжей под вазелиновым маслом. Разные способы высушивания используются в производстве хлебных, пивных, винных и кормовых дрожжей. Многие дрожжи сохраняются в лиофилизированном состоянии и в жидком азоте, а также в 20 %-ном растворе сахаразы. В этих работах особое внимание следует уделять составу питательной среды в процессе реактивации для восстановления первоначальных ферментативных свойств дрожжей.

**Водоросли и фототрофные бактерии.** Микроформы водорослей как и фототрофные бактерии обычно поддерживают периодическими пересевами освещаемых культур, но хранят в темноте. При температуре хранения 10—15°C отдельные виды пересевают один раз в год, другие чаще. Цианобактерии рода *Nostoc* успешно хранятся в сухом песке или в почве. Лиофильновысушенные водоросли разных видов *Chlorophyta*, *Chrysophyta*, *Cyanophyta* сохраняют жизнеспособность в течение 4—10 мес. Использование жидкого азота — эффективный метод хранения одноклеточных зеленых водорослей: клетки *Euglena gracilis* оставались живыми в течение трех лет.

**Простейшие.** Простейшие обычно поддерживают в форме субкультур. Метод лиофилизации применяется для хранения амеб. Культуры *Strigomonas oncopelti* сохраняют жизнеспособность после L-высушивания в 50%-ном растворе глюкозы в течение пяти лет, а также после высушивания в пептонно-крахмальных таблетках.

Обобщая вышесказанное, следует подчеркнуть, что для гарантии длительного поддержания стабильной культуры рекомендуется одновременно хранить микроорганизмы различными методами.

### **8.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТУР**

Для определения сохранности живых микроорганизмов различными методами общепринято использовать в качестве критерия подсчет их колоний, выросших после предварительных разведений на богатых питательных средах или только констатировать факт роста на соответствующей жидкой или плотной среде.

Процент выживаемости микроорганизмов определяют по отношению числа сохранившихся клеток к первоначальному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения), принятому за 100%. Процент поврежденных клеток вычисляют по разнице между общим числом клеток на богатой питательной среде и числом клеток, выросших на синтетической («минимальной») среде определенного химического состава.

## **Глава 9 БАКТЕРИОФАГИ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

Микробиологическое производство, использующее бактериипродуценты, может в определенных условиях оказаться зависимым от бактериофагов. Лизис бактерий в промышленных аппаратах — ферментерах, вызванный бактериофагами («фаголизис»), уменьшает выход конечного продукта или ухудшает его качество и тем самым приносит экономический ущерб.

Фаголизис может стать и причиной особого, генетического, загрязнения внешней среды. В производстве обычно используются бактериальные культуры ограниченного числа видов. В случае их массового лизиса и попадания определенных фагов во внешнюю среду может наблюдаться не только качественное изменение состава микроорганизмов, но и взаимодействие «производственных» и «природных» фагов. Это может привести к появлению в природных условиях генетически новых вариантов фагов, еще более активно лизирующих данный продуцент или способных лизировать близкородственные виды бактерий. Следовательно, нарушаются сложившиеся биоценотические отношения.

Исследования бактериофагов и прежде всего их генетики, проведенные за последние десятилетия, внесли существенный

вклад в возникновение молекулярной биологии, молекулярной генетики, новой методологии генетики — генной инженерии, и вместе с ней — биотехнологии.

В настоящей главе будут рассмотрены лишь те аспекты бактериофагии, которые имеют научно-практическое и практическое значение.

### **9.1. МНОГООБРАЗИЕ И ОБЩИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ**

Бактериофаги (или фаги) — разнообразно устроенные вирусы — внутриклеточные паразиты прокариот.

Структура частиц — вирионов — разных бактериофагов различна (рис. 9.1). В отличие от вирусов эукариотов бактериофаги часто обладают специализированным органом прикрепления к поверхности бактериальной клетки, или хвостовым отростком, устроенным с разной степенью сложности, но некоторые фаги не имеют хвостового отростка. Капсид содержит генетический материал фага, его геном. Генетический материал разных фагов может быть представлен разными нуклеиновыми кислотами. Некоторые фаги содержат ДНК в качестве генетического материала, другие — РНК. Геном у большинства фагов — двунитевые ДНК, а геном некоторых относительно редких фагов — однонитевые ДНК. На концах молекул ДНК некоторых фагов присутствуют «липкие участки» (однонитевые комплементарные последовательности нуклеотидов), у других фагов липкие участки отсутствуют. У некоторых фагов последовательности генов в молекулах ДНК уникальны, тогда как у других фагов выявлены пермутации генов. У одних фагов ДНК линейная, у других — замкнутая в кольцо. У некоторых фагов на концах молекулы ДНК имеются концевые повторы нескольких генов, у других фагов такая концевая избыточность обеспечивается присутствием относительно коротких повторов. Наконец, у некоторых фагов геном представлен набором из нескольких фрагментов нуклеиновой кислоты.

С эволюционной точки зрения бактериофаги, использующие столь разные типы генетического материала, различаются между собой в существенно большей степени, чем любые другие представители эукариотических организмов. Вместе с тем, несмотря на такие принципиальные отличия в структуре и свойствах носителей генетической информации — нуклеиновых кислот, разные бактериофаги проявляют общность во многих отношениях, прежде всего по характеру вмешательства в клеточный метаболизм после заражения чувствительных бактерий.

Бактериофаги, способные вызвать продуктивную инфекцию клеток, т. е. инфекцию, завершающуюся образованием жизнеспособного потомства, определяют как недефектные. Для всех недефектных фагов свойственно два состояния: состояние *внеклеточного*, или *свободного*, фага (иногда его называют также зрелым

фагом) и *состояние вегетативного фага*. Для некоторых так называемых умеренных фагов возможно еще и состояние профага.

Внеклеточный фаг — это частицы, обладающие структурой, свойственной фагу данного типа, обеспечивающей сохранение генома фага в период между инфекциями и введение его в очередную чувствительную клетку. Внеклеточный фаг биохимически инертен, а вегетативный фаг — активное («живое») состояние фага, возникает после инфекции чувствительных бактерий или после индукции профага.

Иногда инфекция чувствительных клеток недефектным фагом не завершается образованием жизнеспособного потомства. Это может быть в двух случаях: при абортивной инфекции или вследствие лизогенного состояния клетки при инфекции умеренным фагом.

Причиной абортивного характера инфекции может быть активное вмешательство тех или иных систем клетки в ход инфекции, например разрушение введенного в бактерию генома фага, или отсутствие в клетке какого-то продукта, необходимого для развития фага, и т. д.

Общий признак всех бактериофагов — *внутриклеточный паразитизм* — определяется зависимостью фагов от аппаратов транскрипции и трансляции генетического материала, от систем репликации бактерии, от наличия особых бактериальных структур, необходимых для сборки зрелых частиц фага. В то же время следует отметить, что уровень такой зависимости для разных бактериофагов разный. Некоторые из них (например, Т-четные фаги *Escherichia coli*) несут в своем геноме многие гены, функционально сходные с определенными бактериальными генами; такие фаги более автономны, поскольку способны развиваться в клетках бактерий, не обладающих функциями соответствующих генов.

Фаги принято относить к трем типам. Тип определяется характером влияния продуктивной инфекции фага на судьбу инфицированной клетки.

*Первый тип — истинно вирулентные фаги.* Инфекция клетки вирулентным фагом неизбежно ведет к гибели инфицированной клетки, ее разрушению и освобождению фага-потомства (исключая случаи абортивной инфекции). Такие фаги называют истинно вирулентными, для отличия их от вирулентных мутантов умеренных фагов.

*Второй тип — умеренные фаги.* В ходе продуктивной инфекции клетки умеренным фагом возможны два принципиально разных пути его развития: *литический*, в общем (по своему исходу) подобный литическому циклу вирулентных фагов, и *лизогенный*, когда геном умеренного фага переходит в особое состояние — профаг. Клетка, несущая профаг, называется лизогенной или просто лизогеном (поскольку в определенных условиях она может претерпеть литическое развитие фага). В состоянии профага геном умеренного фага передается от клетки ее потомкам при

клеточном делении как угодно долго в ряду поколений. У профага большинство генов не выражены, и экспрессируются лишь гены (обычно один-два), продукты которых имеют отношение к поддержанию состояния профага. Эти белки получили общее название *репрессоров*. Соединяясь с определенными участками в геноме фага (операторами), репрессор тем самым блокирует расположенные поблизости промоторы — участки, распознаваемые бактериальными РНК-полимеразами, с которых начинается считывание генетического материала. Профаг некоторых фагов ин-

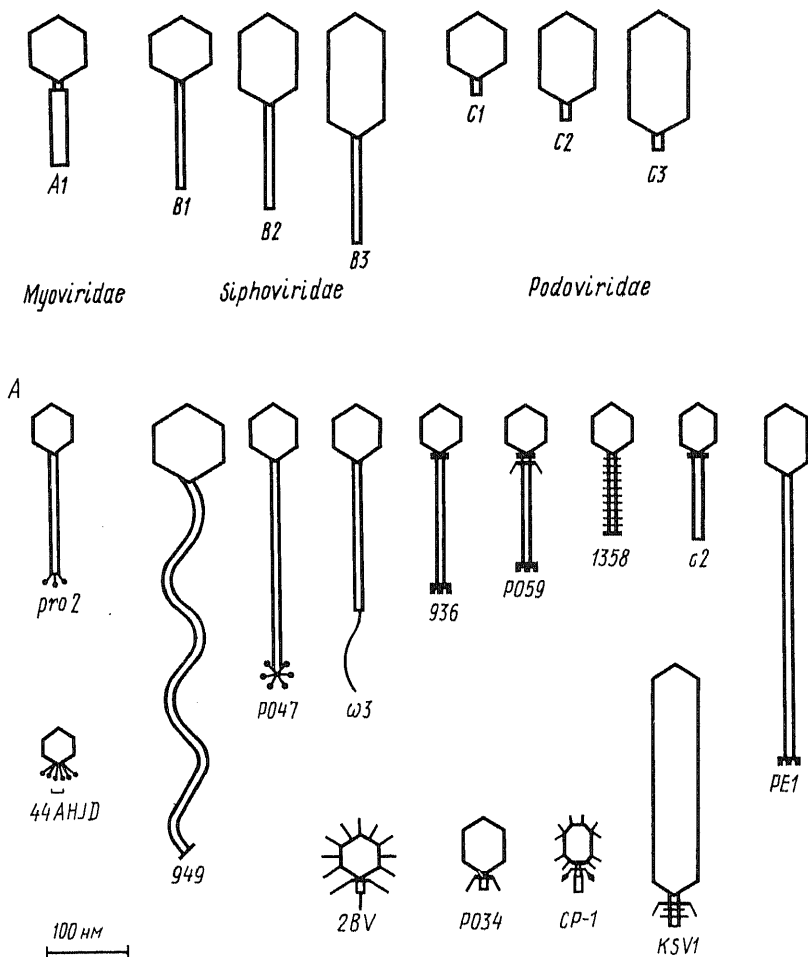


Рис. 9.1. Многообразие морфологических типов бактериофагов и их обозначения. А — бактериофаги стафилококков; Б — бактериофаги вибрионов.

Обратите внимание на присутствие в обеих группах фагов сходных морфотипов. Верхний ряд — типовые морфотипы по Бредли с предложенным Аккерманом подразделением на подтипы 1, 2, 3 в соответствии с размером головки.



тегрирован в бактериальную хромосому (например, профаги  $\lambda$ , P2, P22, Mu1), профаги других фагов присутствуют в клетке в виде самостоятельных репликонов — плазмид (например, профаг P1 *E. coli*). Такие фаги иногда называют фазмидами, подчеркивая их сходство с типичными фагами и с типичными плазмидами. Состояние профага может переходить в состояние литического развития после индукции. Индукция является следствием инактивации репрессора. При этом появляется возможность экспрессии генов, ответственных за осуществление литического

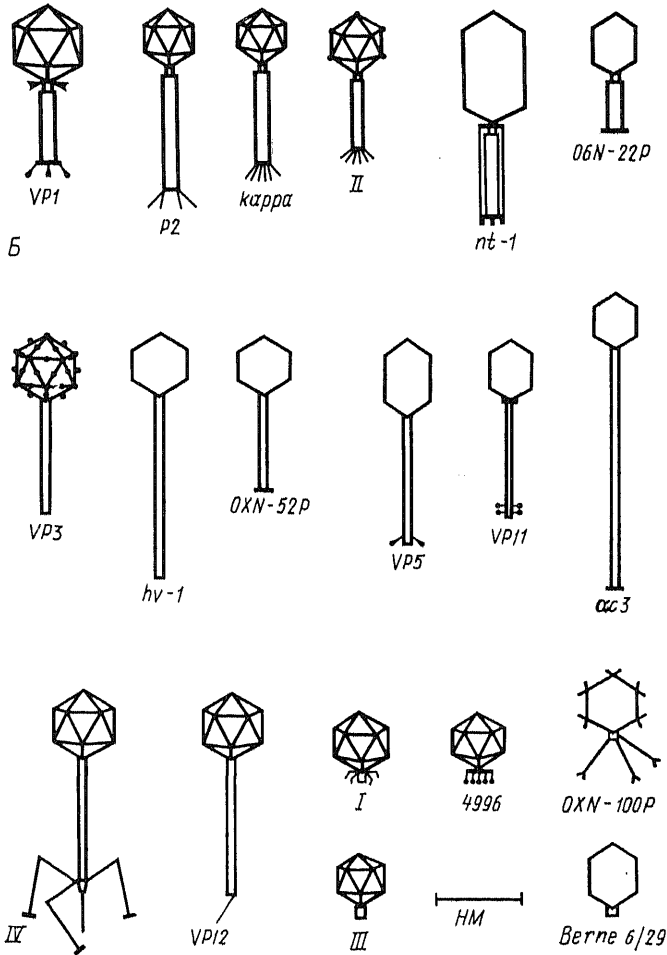


Рис. 9.1. Продолжение

цикла. Химические и физические факторы, ведущие к индукции, называют индуцирующими факторами (митомицин С, УФ-излучение и др.). Умеренные фаги, отвечающие в состоянии профага на применение индуцирующего фактора началом литического развития, называют *индуцибельными*, а фаги, не реагирующие таким образом, — *неиндуцибельными*. У умеренных фагов могут возникать вирулентные мутанты. Мутации вирулентности ведут к такому изменению последовательности нуклеотидов в операторных участках, которое сказывается в утрате сродства к репрессору.

*Третий тип фагов* — это фаги, продуктивная инфекция которыми не ведет к гибели бактерий. Эти фаги способны покидать инфицированную бактерию, не вызывая ее физического разрушения. Клетка, инфицированная таким фагом, находится в состоянии постоянной (перманентной) продуктивной инфекции. Развитие фага сказывается в некотором замедлении скорости деления бактерий.

## 9.2. ПОПАДАНИЕ ФАГОВ НА ПРОИЗВОДСТВО

То, как именно фаг попадает на производство, в существенной степени определяется характером самого производства. Так, например, в отраслях промышленности, где производство ведется в открытых емкостях, фаг может попасть в них из воздуха, с добавками и т. д. В случае таких производств (сыроделие, виноделие) фаголизисы вызываются в основном фагами, попавшими из внешней среды (экзогенные фаги). В этом случае единственной гарантией безлизисного производства может быть использование комплекса специально разработанных мер. Изредка, при использовании лизогенных продуцентов, причиной лизиса может стать возникновение вирулентных мутантов (эндогенные фаги). В случае использования в производстве только одного штамма бактерий аппаратное оформление производства позволяет вести его в микробиологически стерильных условиях, основным источником фаголизиса должны быть фаги, имеющие эндогенное происхождение (вирулентные мутанты профагов лизогенных продуцентов), и лишь при нарушении определенных технологических условий (некачественная стерилизация среды, воздуха, добавок и т. п.) лизис может быть вызван экзогенными фагами. Экзогенные фаги, вообще говоря, могут быть не только вирулентными, но и умеренными, если, например, в ферментеры попадают вместе с нестерильными компонентами лизогенные бактерии вида, родственного продуценту и выделяющие фаг, активный на клетках продуцента.

Знание основных свойств обнаруженного на производстве бактериофага и сравнение его с уже известными, ранее встречавшимися на данном производстве фагами, является решающим условием и для выявления путей попадания данного фага на производство, и для выбора соответствующих мер защиты.

Таким образом, основной задачей после выявления на производстве случая, подозрительного на фаголизис, является доказательство возможной роли фага как причины неудавшейся операции, в том числе выявление самого фага и его характеристики. Это позволяет установить способ попадания фага на производство (эндо- или экзогенный), а также определить, является ли обнаруженный фаг вариантом (мутантом) какого-либо ранее известного фага или встречается впервые.

### **9.3. ОСНОВНЫЕ СТАДИИ РАЗВИТИЯ И ПРОСТЕЙШИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ**

Несмотря на чрезвычайное разнообразие бактериофагов, процедуры их исследования, за редким исключением, применимы к большинству фагов. В заводской лаборатории можно провести предварительное изучение фага с применением относительно простых методов, а затем в хорошо оснащенной специализированной лаборатории подобрать оптимальные условия для размножения фага и подвергнуть фаг подробному изучению (электронная микроскопия, анализы нуклеиновой кислоты, белков капсида и др.). Так осуществляется классификация фага и делается окончательный вывод о пути его попадания на производство. Следует предостеречь от проведения длительных работ по исследованию бактериофагов в заводских лабораториях, территориально связанных с производством. Требующиеся обычно для проведения исследований препараты фагов в высоких титрах могут стать источником новых загрязнений производства, в том числе и мутантами с расширенными спектрами литической активности (см. далее).

Рассмотрим некоторые простейшие способы изучения фагов одновременно с изложением данных об основных стадиях их развития. При этом в большинстве случаев будет рассматриваться «фаг вообще», а где необходимо — приведены свойства определенных фагов.

#### **9.3.1. Адсорбция**

Взаимодействие зрелой частицы фага и бактерии начинается с процесса присоединения фаговой частицы (адсорбции) к поверхностным структурам клетки, или рецепторам. Процесс адсорбции существенно отличается для разных фагов. Даже химическая природа рецепторных участков родственных фагов может быть разной. В то же время неродственные фаги могут использовать один и тот же рецептор: для одних фагов они равномерно распределены по поверхности клетки, а для других — сгруппированы на полюсах бактериальной клетки. Некоторые фаги в качестве рецептора используют специфические образования бактерии — пили.

У многих фагов адсорбция — процесс двухстадийный. На первой стадии происходит обратимое соединение фаговой частицы с бактериальным рецептором, а наступление второй стадии — необратимой адсорбции — сопровождается инъекцией фагового генома в клетку. Для некоторых фагов показано, что инъекция стимулируется при взаимодействии хвостового отростка с определенными белковыми компонентами плазматической мембраны, что предотвращает преждевременное выбрасывание нуклеиновой кислоты.

Часто вследствие воздействия адсорбционного аппарата фага происходит изменение потенциала, проницаемости мембраны клетки. Поскольку такие изменения могут быть несовместимы с поддержанием клеткой биохимической активности, такие фаги несут гены, контролирующие укрепление и модификацию клеточной мембраны инфицированных бактерий.

Для количественной характеристики процесса адсорбции фага используют два метода. Хлороформный метод — простой и надежный, но он применим лишь в отношении фагов, устойчивых к хлороформу. Обработка хлороформом убивает бактерии, разрушая липид-содержащую мембрану. После смешивания бактерий и фага (адсорбционная смесь) и по прошествии определенного времени (время адсорбции) смесь (3—5 мл) энергично встряхивается с несколькими каплями хлороформа. После отделения хлороформа (отстаиванием) определяют количество фага, оставшегося в смеси (неадсорбированный фаг). Рассчитав долю неадсорбированного фага по отношению к его исходному количеству в адсорбционной смеси, определяют уровень адсорбции (%) фага в данных условиях. При втором методе определения адсорбционная смесь центрифугируется для осаждения бактерий; неадсорбированный фаг остается в надосадочной жидкости. Этими процедурами можно определять долю инфицированных и неинфицированных бактерий, множественность инфекции (среднее количество фаговых частиц на одну клетку) и т. д.

Возможность быстро оценить уровень адсорбции для вновь выделенного фага промышленных бактерий очень важна на практике, поскольку позволяет изучить потребность фага в кофакторах адсорбции. Например, для вирулентного фага T4 кофактором адсорбции является триптофан, необходимый для активации хвостовых волокон. Кофакторами адсорбции могут быть ионы тех или иных металлов, особенно часто магния или кальция. Важным условием для выявления кофакторов адсорбции служит строгая стандартизация условий опыта (состав адсорбционного буфера, температура, реакция среды). Если выделенный в производственных условиях фаг нуждается в каком-то кофакторе адсорбции, то устранение этого кофактора из питательной среды может оказаться вполне достаточной мерой для «гашения» вспышки фаголизиса, вызванного данным фагом (при условии, что удаление кофактора не ухудшает рост или биосинтетическую активность бактерий, или иные их важные для производства свойства). Му-

танты фага, способные адсорбироваться без кофактора, обычно возникают редко.

Довольно часто встречаются бактериофаги, плохо адсорбирующиеся на клетках в жидких средах, однако и они могут стать помехой в производстве. Эти признаки — эффективность адсорбции в жидкой среде и требование специфических кофакторов весьма стабильны и часто свойственны всей группе родственных фагов. Поэтому их можно использовать при первичной характеристике выделенного на производстве фага.

Инъекция генома фага в клетку облегчается действием специфических литических ферментов, которые имеются в составе частицы некоторых фагов. Действие этих ферментов может быть столь эффективным, что при высоких множественностях инфекции клетка разрушается очень быстро («лизис извне») и при этом фага-потомства не образует.

Инъекция имеет свои особенности для разных фагов. Так, в случае фага Т4 она обусловлена сокращением чехла фагового отростка и протекает одномоментно. У некоторых фагов, например фага Т5, первоначально в клетку проникает лишь определенный участок ДНК, а затем происходит инъекция оставшейся части генома.

### **9.3.2. Внутриклеточное развитие фага.**

#### **Опыт одноступенчатого цикла роста**

С проникновением генома фага в клетку возникает состояние вегетативного фага, начинается его внутриклеточное развитие. У разных фагов отдельные этапы внутриклеточного развития различаются; рассмотрим внутриклеточное развитие фага на примере вирулентных Т-четных фагов кишечной палочки.

После проникновения фаговой ДНК в клетку начинается ее транскрипция — образование информационной РНК с помощью бактериальной РНК-полимеразы. При этом происходит последовательная смена фаз транскрипции (предранняя, ранняя, поздняя), согласованное образование определенных белков, обеспечивающее осуществление последовательных этапов развития. К предранним относятся и уже упоминавшиеся функции укрепления плазматической мембраны. Осуществление ранних функций обеспечивает репликацию генома фага. У некоторых фагов в ходе развития происходит смена типа репликации (например, у фага  $\lambda$ ). Каждый из типов репликации и их смена контролируются продуктами определенных генов фага.

Для осуществления репликации необходимо, чтобы геном фага находился в определенной форме, защищенной от действия нуклеаз клетки и обеспечивающей репликацию участков генома, расположенных на концах молекулы ДНК. У некоторых фагов (Т-четные) эта форма появляется, например, в процессе объединения нескольких молекул ДНК, возникших после первичных актов репликации, в единый конкатемер, за счет рекомбинации ти-

па «голова-хвост» (рис. 9.2.). У других фагов образуется кольцевая форма ДНК за счет самозалипания двух концов молекулы, несущих комплементарные однонитчатые последовательности (фаг  $\lambda$ ). Наконец, у фагов-транспозонов репликация всегда сопряжена с перемещением генома фага в пределах генома бактерии — транспозицией; в результате концы генома фага находятся постоянно в соединении с нуклеотидными последовательностями бактериальной ДНК и тем самым защищены от действия нуклеаз. Параллельно с репликацией происходит и рекомбинация геномов фага, которую можно обнаружить по образованию рекомбинантов, если клетка инфицируется двумя генетически разными (маркированными) фагами.

После начала синтеза ДНК и накопления нескольких копий генома фага начинается считывание поздних генов, контролирующих разные белки: белки, необходимые только в ходе построения капсида, структурные белки капсида, ферменты, осуществляющие тем или иным способом разрушение инфицированной бактерии.

Практически у всех изученных фагов в геномах имеются кроме существенных и несущественные гены, необязательные для осуществления фагом цикла развития. Иногда удается найти такие условия, в которых активность таких несущественных генов фага становится необходимой для полноценного развития. Ряд несущественных генов контролирует функции, дублирующие функции бактериальных генов. Это позволяет фагам использовать в качестве хозяев штаммы бактерий, отличающиеся активностью соответствующих генов.

На заключительном этапе внутриклеточного развития фага включаются «часы лизиса», т. е. функции фага, ответственные за разрушение бактериальных покровов и освобождение зрелого фага. У разных фагов механизмы «часов лизиса» функционируют по-разному, у фагов, освобождающихся из клетки «секрецией», такого механизма нет вообще. Обычно фаги (Т-четные,  $\lambda$ ) контролируют образование двух разных литических ферментов, один из них разрушает клеточную мембрану, а другой — ригидный мукополимерный слой клеточной оболочки. У фагов  $\lambda$ , P22 соответствующие гены расположены рядом в геноме и входят в состав одной и той же единицы транскрипции. У других фагов, например Т4, гены, контролирующие ферменты лизиса, регулируются, по-видимому, независимо, но согласованно. Обязательное условие лизиса — прекращение фосфорилирования и реакций, ведущих к укреплению мембраны инфицированных бактерий. Детальные механизмы «включения часов лизиса» все еще не выяснены. Хотя лизис большинства клеток в одномоментно инфицированной культуре бактерий наступает в пределах достаточно узкого интервала времени, тем не менее отдельные клетки могут лизироваться с большим запозданием. Некоторые мутации фагов ускоряют наступление лизиса.

Бактериофаг с небольшим геномом,  $\phi$ X174, обладает другим способом лизиса инфицированных клеток. Продукт гена E этого

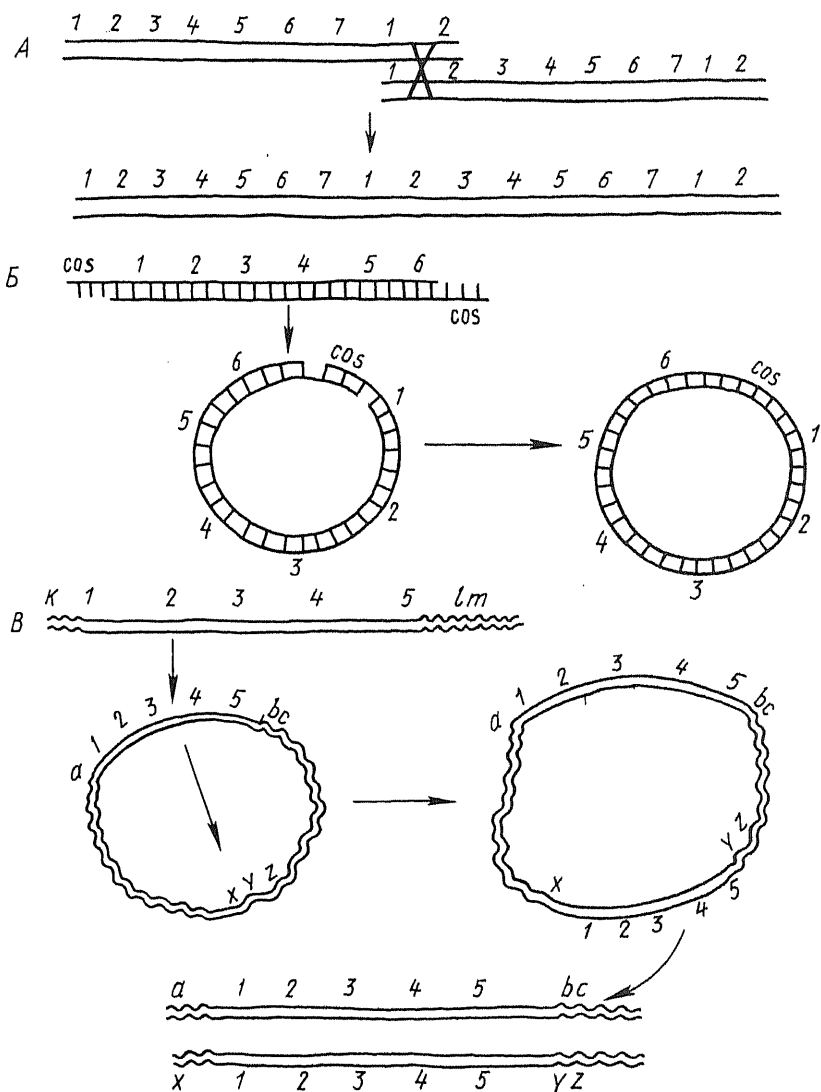


Рис. 9.2. Примеры способов, используемых разными фагами для защиты генома в ходе репликации от экзонуклеаз и для обеспечения репликации концевых последовательностей. *А* — образование конкатемерных молекул при рекомбинации копий ДНК типа «голова с хвостом» у Т-четных и некоторых других фагов в области терминальной избыточности; *Б* — образование кольцевой молекулы ДНК фага  $\lambda$  при замыкании липких концов.

На поздних стадиях инфекции фаг  $\lambda$  реплицируется с использованием конкатемеров, образуемых при репликации по типу катящегося кольца. *В* — постоянное ограничение генома фагов-транспозонов бактериальными последовательностями нуклеотидов, обеспечиваемое сопряженностью процессов репликации и транспозиции. В ДНК зрелого фага собственно фаговый геном также с обоих концов ограничен нефаговыми последовательностями нуклеотидов

фага (всего у этого фага с однокольцевой ДНК выявлено 9 генов, некоторые из которых перекрываются) контролирует включение активности бактериальных автолитических ферментов. Стимулируемый этим фагом лизис подавляется при определенных концентрациях сульфата магния в среде или в том случае, когда клетки перед инфекцией были выращены при pH выше 7,4. Такая специфичность в реакции клетки может использоваться как фактор предотвращения фаголизиса на производстве.

#### **9.4. ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ УМЕРЕННЫХ ФАГОВ (ЛИЗОГЕНИЗАЦИИ И ИНДУКЦИИ)**

Отличие умеренных фагов от вирулентных состоит в способности лизогенизировать бактерии. Явление лизогении широко распространено среди бактерий разных видов, в том числе и среди тех, которые используются в разных отраслях микробиологической промышленности. Выявить лизогенное состояние бактерий по недефектным профагам несложно, если имеется чувствительный к этому фагу индикаторный штамм.

Стабильность поддержания лизогенного состояния бактерий обеспечивается синхронностью репликации профага и генома бактерии и наличием белка-репрессора, выключающего все гены фага, имеющие отношение к литическому циклу. Синхронность репликации геномов бактерии и профага достигается у разных фагов по-разному. Профаги некоторых фагов ( $\lambda$ , P2 и др.) в обычных условиях интегрированы в бактериальную хромосому и реплицируются как ее неотъемлемая часть. Профаги-фазмиды, как, например, P1 *E. coli*, обладают особой функцией *par*, обеспечивающей точное распределение профагов-плазмид по дочерним клеткам в процессе каждого клеточного деления.

В процессе перехода генома фага в состояние профага принимают участие как фаговые, так и бактериальные продукты. Гены фага, участвующие в установлении профага, можно подразделить на две группы. Функции генов одной группы необходимы только при установлении лизогенного состояния, функции генов другой группы — для поддержания лизогенного состояния. Ген, контролирующий структуру репрессора, участвует и в установлении, и в поддержании лизогенного состояния. У большинства фагов для поддержания лизогенного состояния необходима только функция этого гена. У некоторых фагов, например P22, развились более сложные системы поддержания лизогенного состояния (участвуют две группы регуляторных генов).

В определенное время после инфекции клетки умеренным фагом (например, фагом  $\lambda$ ) происходит выбор пути развития. Возможны два выбора — «лизогенное решение» и «литическое решение». Невозможность принятия лизогенного решения вовсе не означает, что инфекция обязательно пойдет по литическому пути и завершится образованием зрелого фага. У фага  $\lambda$  выбор пути развития определяется сложным взаимодействием двух регуля-



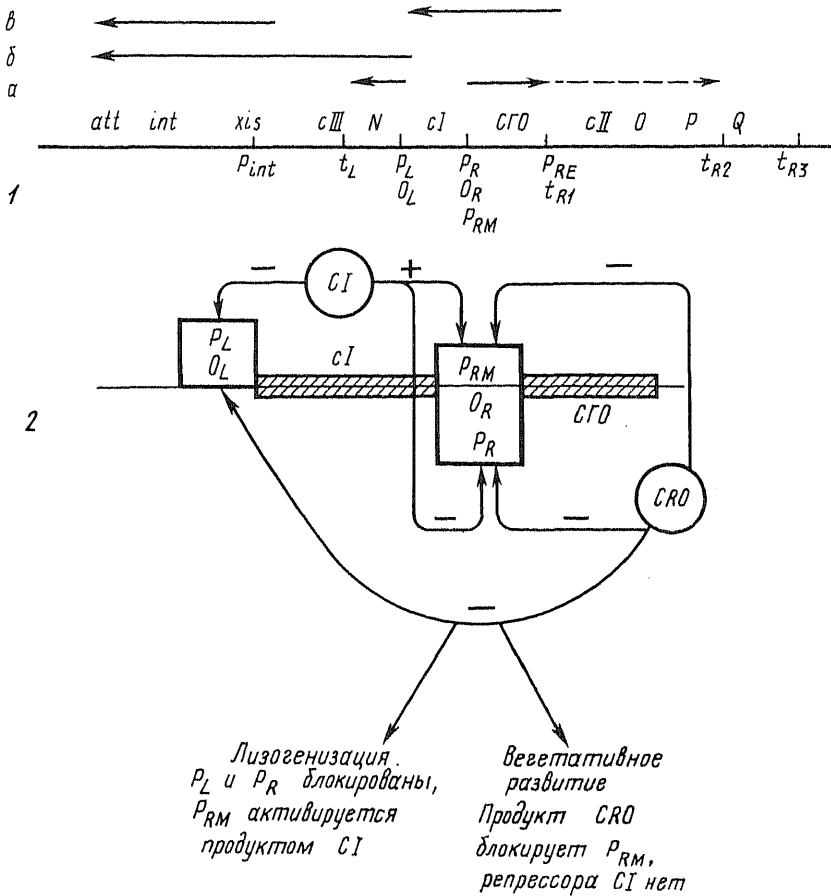


Рис. 9.3. Регуляция выбора пути развития в ходе инфекции фагом  $\lambda$ .

В результате последовательных актов транскрипции участков генома слева и справа от гена  $cI$  (см. текст) появляются продукты генов  $cII$ ,  $cIII$ ,  $CRO$ . Продукты  $cII/cIII$ , воздействуя на промотор  $P_{RM}$ , стимулируют появление репрессора  $cI$ . После появления продукта  $cI$  начинается конкуренция между  $cI$  и  $CRO$  за промотор  $P_{RM}$  (см. стадия 2). Оба репрессора оказывают негативный контроль на промоторы  $P_R$  и  $P_L$ , но противоположный эффект на промотор  $P_{RM}$  продукт  $cI$  активирует и тем самым активирует собственную транскрипцию с этого промотора, и накопление  $cI$  ведет к постоянному выключению всех синтезов (лизогенизация, установление состояния профага); продукт  $CRO$  действует на промотор  $P_{RM}$  негативно, препятствуя синтезу продукта  $cI$  гена. Исход «борьбы» репрессоров  $cI$  и  $CRO$  зависит в существенной степени от определенных бактериальных функций, в том числе подверженных метаболическому контролю.

торных белков, продуктов генов  $cI$  и  $cro$ . Взаимодействие это осуществляется через связывание с определенными участками в пределах операторов. Эти участки — особые для каждого из репрессоров. На рис. 9.3. представлена последовательность событий в клетке, инфицированной фагом  $\lambda$ , при лизогенизации.

После проникновения в клетку ДНК фага  $\lambda$  замыкается в кольцо благодаря комплементарному спариванию одностранных участков на концах генома ( $\cos$ -сайты). Бактериальная РНК-

полимераза соединяется с двумя промоторами  $p_L$  и  $p_R$ , находящимися соответственно слева и справа от гена  $cI$ , и начинает транскрибирование в обе стороны от него. Левосторонняя транскрипция останавливается терминатором  $t_L$ . В пределах транскрибированной левой области находится ген  $N$ , продукт которого обладает антитерминирующей активностью. Транскрипция, идущая в правую сторону, обладает следующей особенностью: часть актов транскрипции прекращается терминатором  $t_{R1}$ , а часть —  $t_{R2}$ . Образовавшиеся транскрипты кодируют белок  $CRO$ , второй репрессор. Накопление продукта гена  $N$  способствует распространению транскрипции левее терминатора  $t_L$ ; при этом в клетке появляются продукты генов  $cIII$  и другие белки. В результате правосторонней транскрипции накапливаются продукты генов  $\lambda O$  и  $P$  (репликативные белки),  $cII$ . Продукт гена  $cII$  обладает центральный действием в выборе лизогенного пути развития. Его действие (совместно с продуктом гена  $cIII$ , который, считается, стабилизирует продукт  $cII$ ) на промотор  $p_{RE}$  ведет к появлению репрессора гена  $cI$ . Соединение репрессора гена  $cI$  с левым и правым операторами выключает всю левостороннюю и правостороннюю транскрипцию с промоторов  $p_L$  и  $p_R$ . В это же время благодаря активности промотора  $p_{INT}$  (который также активируется продуктами  $cII/cIII$ ) накапливается продукт гена  $int$ , фермент интегразы. Интегразы обеспечивает встройку кольцевой молекулы фага лямбда в определенный участок бактериальной хромосомы за счет одиночного акта кроссинговера. Блокада транскрипции репрессором  $cI$  ведет не только к прекращению синтеза продуктов  $cII$ ,  $cIII$ ,  $CRO$ , но и синтеза самого репрессора  $cI$  с промотора  $p_{RE}$ . Однако репрессор  $cI$ , соединяясь с промотором  $p_{RM}$ , активирует его и тем самым автокаталитически регулирует собственный синтез.

При литическом решении накопление продукта гена  $cgo$  блокирует синтез продуктов  $cII$  и  $cIII$ , выключая транскрипцию. Накопившиеся продукты генов  $O$  и  $P$  стимулируют начало репликации генома фага, а продукт гена  $Q$  активирует транскрипцию группы морфогенетических генов (рис. 9.4).

Как сказывается наличие мутаций в разных генах и сайтах, важных для лизогенизации, на свойствах фага? Мутации в гене  $cI$  блокируют как установление, так и поддержание лизогенного состояния (нет функционально-активного репрессора). Мутанты по гену  $cI$ , не имеющие нарушений структуры операторов, не развиваются в клетках, несущих гомоиммунный профаг. Возникновение мутаций в операторах может вести к появлению у фага свойства вирулентности. Поскольку операторные участки таких мутантов не соединяются с репрессором  $cI$ , вирулентный фаг может развиваться в присутствии гомоиммунного фага. Частоты возникновения вирулентных мутантов для разных фагов существенно отличаются.

Модель интеграции замкнутого в кольцо генома фага  $\lambda$  при лизогенизации в кольцевую хромосому *E. coli* путем единичного

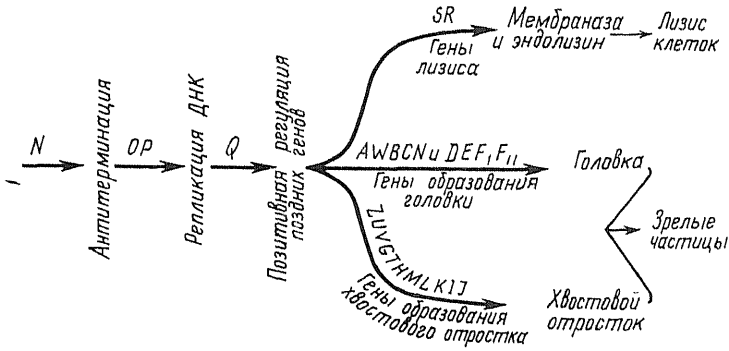


Рис. 9.4. Общая схема последовательности осуществления функций разными группами генов в ходе литического развития фага  $\lambda$

кроссинговера в определенных участках геномов фага и бактерии предложена Кемпбеллом в 1962 г. и с тех пор подтверждена для ряда других (но не всех) умеренных фагов. Эта модель легко объясняет выявленное различие в последовательностях генов в геномах вегетативного фага и в ДНК профага  $\lambda$  (рис. 9.5). Действительно, поскольку концы генома фага в зрелой частице не совпадают с участком сайт-специфической рекомбинации,

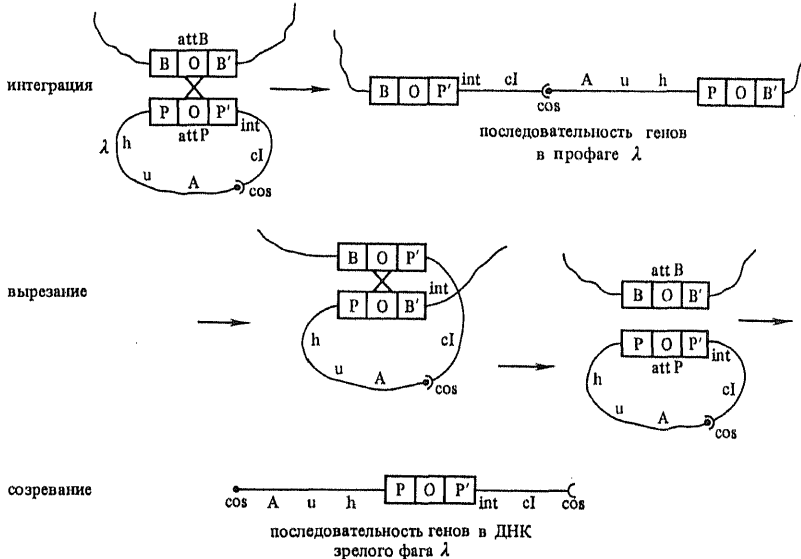


Рис. 9.5. Модель Кемпбелла для объяснения интеграции генома фага при лизогенизации и вырезания после индукции.

Рекомбинация, ведущая к встройке, происходит в пределах небольшого участка с полной гомологией внутри att сайтов бактерии и фага, обозначенного O. После интеграции образуются гибридные att сайты по краям профага. Обратите внимание, что последовательности генов на генетических картах профага и вегетативного фага разные (пермутация), поскольку att сайты и липкие концы, используемые при нарезке зрелой ДНК, не совпадают

включение генома фага в хромосому бактерии ведет к изменению порядка генов (пермутации).

Структуры участков в геномах фага и бактерии, где осуществляется рекомбинация при встройке генома фага в хромосому бактерии (соответственно attP и attB), выяснены. В центральных частях участков attB и attP есть небольшая последовательность нуклеотидов с полной гомологией. Именно в пределах этой последовательности и происходит перекрест, стимулируемый интегразой. Бактериофаг  $\lambda$  может интегрировать в разные участки генома кишечной палочки, однако, лишь один из этих attB, сайтов, или первичной attB сайт, расположенный между оперонами gal и bio, используется с высокой эффективностью. Вторичные attB сайты удается выявить обычно после удаления первичного сайта. После индукции лизогенных бактерий происходит как бы обращение процесса встройки — точное вырезание генома профага  $\lambda$  из хромосомы. Вырезание осуществляется совместным действием продуктов двух генов фага (int и xis) при участии бактериальных фагов.

У некоторых «индуцибельных» фагов к индукции может вести обработка лизогенных бактерий определенными химическими веществами или влияние физических воздействий (как следствие активации SOS-системы бактериальной клетки). SOS-функции проявляются в ответ на любое воздействие, ведущее к блокаде синтеза бактериальной ДНК или к ее разрушению. При этом активируется протеолитическая активность белка, контролируемого геном *gcs A*, которая и разрушает белки-репрессоры, в том числе и репрессоры индуцибельных фагов. Если репрессор фага остается устойчивым к действию протеолитической активности, фаг считается неиндуцибельным. Кроме природных неиндуцибельных фагов существуют и неиндуцибельные мутанты индуцибельных фагов. У таких неиндуцибельных мутантов изменена структура белка-репрессора.

Индуцибельность у выделенных на производстве умеренных фагов легко проверить. Следует, однако, иметь в виду, что индуцибельность свойственна не только профагам, но и некоторым бактериоциногенным факторам. Для быстрого обнаружения индуцибельности профага можно использовать упрощенный способ. Чашка Петри с питательной средой равномерно засеивается испытуемыми бактериями ( $10^3$ — $10^5$  клеток) и покрывается стеклянной пластинкой, не пропускающей УФ-излучение. Под включенным УФ-источником излучения стекло передвигают, открывая чашку, а затем быстро закрывают. Таким образом, бактерии в разных частях чашки Петри по градиенту перемещения пластинки оказываются облученными разными дозами УФ-излучения. Сразу же после облучения чашку засеивают индикаторными бактериями, чувствительными к испытуемому фагу, и инкубируют в термостате в темноте. Изменение плотности распределения негативных колоний по направлению движения стеклянной пластинки (градиент дозы) свидетельствует, что умеренный фаг подвержен

индукции. Дозы, обычно используемые для индукции, существенно ниже доз, необходимых для убивания нелизогенных бактерий. Это позволяет выявлять лизогенность или бактериоциногенность клеток и тогда, когда в результате индукции живого фага не образуется. В этом случае показателем индуцибельности является повышенная чувствительность клеток к обработке индуцирующими факторами (следует, однако, помнить, что повышенная чувствительность к индуцирующим факторам может возникать и у нелизогенных бактерий как следствие мутаций в определенных генах).

#### **9.5. НОСИТЕЛЬСТВО (ПСЕВДОЛИЗОГЕНИЯ) И ИНФЕКЦИЯ КЛЕТОК ПЕРМАНЕНТНО РАЗВИВАЮЩИМИСЯ ФАГАМИ (ПРФ-ИНФЕКЦИЯ)**

От описанного выше состояния лизогении следует отличать два других состояния — носительство (синоним — псевдолизогения) и состояние перманентного развития в клетках особых нитевидных фагов, например M13 *E. coli*, способных осуществлять внутриклеточное развитие и выделяться в среду без убивающего действия на клетку. Рассмотрим особенности этих состояний и их отличие от лизогении.

Лизогенное состояние бактерий характеризуется тремя особенностями. 1. Каждая клетка потенциально способна образовать фаг, но в обычных условиях в популяции лизогенных бактерий лишь небольшая часть клеток находится в состоянии продуктивной инфекции (за счет спонтанной индукции). 2. В состоянии профага большинство генов фага выключено активностью репрессора. 3. Переход клетки-лизогена в состоянии продуктивной инфекции происходит при инактивации репрессора в данной клетке.

Состояние носительства в отличие от лизогенного состояния свойственно не каждой отдельной клетке популяции, а всей популяции инфицированных бактерий в целом. Конкретные причины, благодаря которым популяция бактерий может стать носителем, самые разные. Приведем несколько примеров. 1. Защита чувствительных бактерий слизистым материалом. Бактериофаг ØKZ *Pseudomonas aeruginosa* — вирулентный фаг и образует очень большой выход в расчете на одну чашку Петри со сливным лизисом. Однако даже из зон лизиса с наивысшими концентрациями фага легко выделяются обычные чувствительные бактерии. Такое сосуществование чувствительных клеток и большого количества фага объясняется тем, что при лизисе клеток этим фагом образуется много вязкого слизистого материала. Слизь, обволакивая чувствительные клетки, защищает их от инфекции фагом и какое-то время они еще размножаются в таком слизевом мешочке.

2. Возникновение чувствительных клеток в популяции устойчивых бактериальных мутантов. Бактериальные клетки утрачивают способность адсорбировать фаг в период состояния активного размножения. Однако эти же клетки становятся чувствительны-

ми в условиях, ограничивающих деление или способствующих их старению.

3. В популяции устойчивых клеток могут возникать варианты, способные в той или иной степени поддерживать развитие фага. Например, развитие некоторых фагов блокируется в присутствии определенных плазмид. В популяции инфицированных клеток некоторые из них могут утрачивать плазмиды и при этом приобретают способность поддерживать развитие фага.

Из приведенных примеров ясно, что состояние носительства объясняется длительным сосуществованием в одной популяции бактерий, инфицированных фагом и чувствительных неинфицированных бактерий. Популяцию бактерий, находящуюся в состоянии носительства, возможно очистить от фага, если делать пересевы в присутствии специфической антифаговой сыворотки, способной инактивировать как свободный фаг, так и фаг, освобождающийся из инфицированных бактерий, и тем самым предотвратить повторную инфекцию чувствительных бактерий. Выделение при повторных субклонированиях чувствительных клонов, свободных от фага, также свидетельствует, что исходная популяция находилась в состоянии носительства.

Наконец, инфекция клеток перманентно развивающимся фагом может напоминать состояние носительства, или лизогении, но принципиально отличается по механизму. Явление перманентной инфекции свойственно определенной группе нитевидных фагов, описанных для разных бактерий. Фаги этого типа развиваются в клетке и освобождаются из нее без физического разрушения последней. Для состояния ПРФ-инфекции характерны следующие признаки: 1) состояние ПРФ-инфекции вызывают фаги особого типа; 2) инфицированные клетки не лизируются, делятся и освобождают очень большие (в расчете на генерацию) количества фага; 3) каждая клетка является фагообразователем.

Таким образом, используя признаки трех состояний — лизогении, псевдолизогении (носительства) и ПРФ-инфекции, их легко отличить друг от друга.

## **9.6 ПРОСТЫЕ СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИОФАГОВ**

Общую характеристику внутриклеточного развития фага можно получить в опыте одноступенчатого цикла роста (ОЦР).

### **9.6.1. Опыт одноступенчатого цикла роста**

Важное условие осуществления опыта ОЦР — обеспечение одномоментного начала развития фага в большинстве инфицированных бактерий. Достигается это разными способами. Для фагов, хорошо адсорбирующихся в жидкой среде, проводят адсорбцию в течение короткого промежутка времени (3—5 мин), регулируя число зараженных бактерий подбором опытным путем

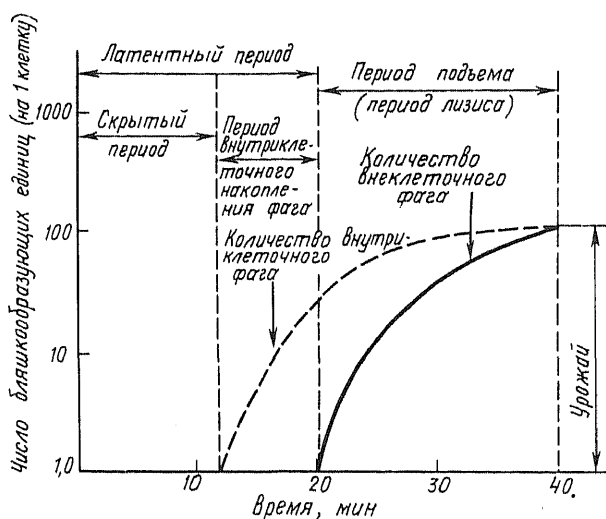


Рис. 9.6. Идеальная кривая одноступенчатого цикла роста фага. Объяснение терминов дано в тексте

множественности инфекции клеток. Неадсорбированный фаг удаляется обработкой антифаговой сывороткой или центрифугированием в условиях, предотвращающих развитие. Если адсорбция данного фага протекает в жидкой среде плохо, использование ингибиторов, предотвращающих начало развития фага (ингибиторы синтеза белка, дыхательные яды, предварительное голодание бактерий в бедной среде и т. д.), позволяет увеличить время адсорбции. Можно, кроме того, осуществить адсорбцию на твердой среде, например на поверхности чашки Петри с питательной средой, опять-таки в условиях, предотвращающих начало развития фага. После удаления неадсорбированного фага и разведения адсорбционной смеси в свежей полноценной среде начинается практически одновременное развитие фага во всех инфицированных бактериях.

Опыт ОЦР дает данные о длительности отдельных периодов в развитии фага и о величине среднего урожая — количестве фаговых частиц на одну инфицированную клетку. Время внутриклеточного развития фага подразделяют на три периода: эклипсный (скрытый), латентный, период лизиса (рис. 9.6).

*Скрытый период* — это время от начала инфекции, определяемое проникновением генома фага в бактерию, до появления в ней первой зрелой фаговой частицы. В течение этого времени осуществляются все процессы внутриклеточного развития, необходимые для образования фага-потомства. *Латентный период* — время от начала инфекции до начала естественного лизиса бактерий с освобождением фага-потомства. *Период лизиса* — интервал времени от лизиса первой клетки до окончания лизиса боль-

шинства инфицированных клеток. Видимое просветление суспензии инфицированных фагом бактерий обнаруживается обычно позже, чем выявляемое в ОЦР начало лизиса.

Длительность эклипсного и латентного периодов является обычно довольно устойчивым признаком того или иного фага. Следовательно, при условии стандартных опытов и соответствующих контролей, например сравнения с каким-то хорошо изученным фагом, активным в отношении данных бактерий, этот признак можно использовать в ходе предварительной идентификации фага на производстве. На длительности латентного периода обычно не сказывается эффективность функционирования морфогенетических генов. Другой признак, оцениваемый по результатам опыта ОЦР, — величина урожая не может быть использована в идентификации, кроме, разумеется, особых случаев, где он столь характерен, что полностью отличает данный фаг от других фагов. Время лизиса, как и величина урожая, не слишком надежный признак даже при первичной идентификации. На него могут влиять многие факторы внешней среды, возраст бактерий и т. д.

Развитием опыта ОЦР является опыт по определению урожая из отдельных инфицированных клеток, используемый лишь в особых случаях; например, с его помощью можно показать способность некоторых фагов выделяться из клетки, не разрушая ее.

### **9.6.2. Негативные колонии (НК) — признак первичной идентификации вновь выделенного фага**

Следствием осуществления фагом циклов последовательных инфекций бактерий, растущих на поверхности твердой среды или в полужидком агаре (газон), является образование негативной колонии (НК), называемой также иногда стерильным пятном, бляшкой. Вид НК — признак, чрезвычайно специфичный для данного фага, иногда для группы родственных фагов. Признаки, которые, позволяют отличить НК одного фага от НК другого фага, разнообразны: наличие и размер зоны центрального лизиса; наличие, степень и характер роста в этой зоне устойчивых бактерий определяют степень мутности центра НК; наличие и размер ореола (часто зависит от выделения клетками литических ферментов); характер края (ровный или рваный, четкий или постепенно переходящий в газон). Иногда — и это специфический признак определенных фагов — НК обладают опалесценцией (голубоватый оттенок в отраженном свете), опалесценция возникает за счет рассеяния света большим количеством фаговых частиц в НК. Специфичен вид НК у умеренных фагов (в их центре обычно растут лизогенные бактерии). Отбор и испытание клеток из центра НК часто позволяет определить, что фаг действительно является умеренным. Следует, однако, заметить, что не у всех умеренных фагов бактериальный рост в центре НК бывает хорошо



заметен. Никакой связи между размером НК и размером фаговых частиц нет, хотя ранее считалось, что более мелкие фаги образуют большие НК из-за более легкой диффузии частиц. Возможно, в распределении фаговых частиц в НК имеет значение выброс фаговых частиц из «взрывающихся» бактерий, что подтверждается образованием иногда специфических краев у НК (рис. 9.7).

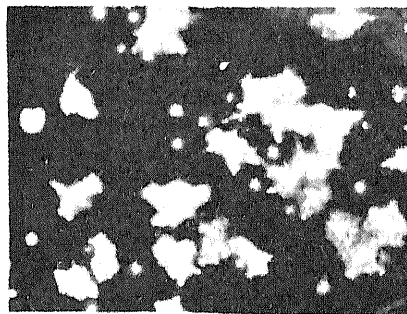


Рис. 9.7. Негативные колонии (НК) фага T4 дикого типа и его мутанта rII на среде с добавлением детергента. Заметно существенное различие НК, рваный характер края НК у rII мутантов, «хвосты» из мелких НК

Сравнение признаков НК фагов, независимо отобранных в производственных условиях, не позволяет решить, родственны фаги или нет, но дает возможность определенно утверждать, что если НК отличаются по какому-то признаку, то фаги неидентичны. Это весьма важно знать в условиях производства.

Надежность применения признаков НК для дифференциации фагов можно повысить, используя разные виды бактерий-хозяев, родственных штамму-продуценту, мутанты продуцента или бактерии, несущие определенные профаги или плазмиды. Специфические взаимодействия между фагами и плазмидами, профагами и инфицирующими фагами могут оказать влияние на вид НК и тем самым делают дифференциацию промышленных фагов более надежной.

### 9.6.3. Спектр литической активности — признак идентификации вновь выделенного фага

Спектр литической активности, или круг хозяев бактериофага, — характеристика, имеющая специфическое и важное значение и при идентификации, и в классификации бактериофага. Вместе с тем, следует отметить определенную условность этого признака, так как выбор группы бактериальных штаммов разных видов для проверки их способности поддерживать рост данного фага в значительной степени произволен. Кроме того, первичная оценка круга хозяев проводится, как правило, качественными (капельными) тестами, и окончательный вывод, например, о неспособности данного фага расти в клетках данного штамма (вида) делается на основании отсутствия НК. Между тем для образования НК необходима определенная минимальная величина урожая (обычно 5—10 частиц на клетку). Следовательно, для повышения надежности использования признака литической активности фага в качестве критерия для идентификации необходимо использовать: во-первых, возможно более широкий набор по-

тенциальных хозяев, включая и относящихся к разным видам, родственным хозяину данного фага; во-вторых, включать в этот набор различные устойчивые мутанты бактерий, отобранные в отношении разных фагов, и, наконец, в-третьих, где это возможно, выяснять причину отсутствия роста фага на бактериях, не поддерживающих роста (отсутствие адсорбции, подавление внутриклеточного развития).

Именно изменение спектра литической активности (расширение его) часто является причиной появления на производстве фага как литического агента. Выявление особенности спектра литического действия фага могут быть полезны при определении пути попадания данного фага на производство, а также при выборе способов придания клеткам фагоустойчивости.

#### **9.6.4. Использование антифаговых сывороток для идентификации бактериофагов**

Специфические антифаговые сыворотки — ценнейшее средство в идентификации и классификации фагов. Ценность их использования в заводских условиях особенно высока, поскольку метод прост и чрезвычайно надежен. Наличие перекрестной реакции нейтрализации для двух фагов почти безусловно свидетельствует, что эти фаги родственны (хотя отсутствие таких реакций не доказывает неродственности фагов). Например, появление на производстве в течение относительно короткого периода времени двух фагов, неотличимых по чувствительности к определенной антисыворотке, но отличающихся по спектрам литической активности, может указывать на вероятность происхождения второго по времени появления фага (с расширенным спектром литической активности) мутационным путем от первого фага.

Фаги, входящие в состав одной и той же группы родственных фагов, могут обладать разными серотипами. Чаще всего реакция со специфическим инактивирующим антителом и специфичность адсорбции фага определяются одним и тем же белком. Следует, однако, отметить, что описаны случаи выделения на одном производстве серологически родственных фагов, не являющихся, однако, мутантами друг друга.

#### **9.6.5. Физико-химические свойства фаговых частиц в первичной идентификации фага**

1. Морфологические признаки и размер частицы, размер генома родственных фагов, выделенных из природных условий, варьируют не слишком часто и не слишком сильно (хотя и можно иногда выделить природные фаги, например лямбдоидные, с утратой части генома). Кроме того, например, фаги лямбда и P22, безусловно родственные, обладают совершенно разной морфологией частицы. Используя примитивный способ — центрифугирова-

ние фага в смеси с группой фагов с известным размером и массой частиц, можно (очень ориентировочно) определить массу и размер частицы изучаемого фага (по изменению соотношения разных фагов в надосадочной жидкости после центрифугирования).

2. Устойчивость фаговых частиц к инактивирующим факторам — ценный и достаточно стабильный признак первичной идентификации. Например, чувствительность к хлороформу обычно отражает наличие липидных компонентов в структуре капсида и является признаком, присущим всем фагам данной группы родственных фагов.

С той же целью можно использовать оценку чувствительности к прогреванию, обработке хелатирующими агентами, действию УФ излучения, разной реакции среды. Однако выявленные при этом признаки не могут рассматриваться, будучи взяты сами по себе, как определяющие. Действительно, даже среди фагов, чувствительных к обработке хлороформом, сейчас выявлено несколько совершенно неродственных групп (с такими представителями, как РМ2, F116, РРО1, Ø6).

Использование нескольких рассмотренных выше приемов первичной идентификации может позволить с достаточной уверенностью сделать вывод относительно возможной принадлежности вновь выделенного на производстве фага к уже известной или к новой группе фагов и тем самым начать полноценную работу по борьбе с фаголизисом, вызванным этим фагом, не дожидаясь результатов окончательной классификации фага, которые можно получить, применяя методы анализа, менее доступные в условиях заводской лаборатории.

#### **9.7. ДЕФЕКТНЫЕ ФАГИ. ПОНЯТИЕ О СУЩЕСТВЕННЫХ И НЕСУЩЕСТВЕННЫХ (ДОБАВОЧНЫХ) ГЕНАХ**

Для каждого из фагов существуют в природе или могут быть получены в лаборатории дефектные варианты. Дефектные фаги неспособны осуществлять полноценный цикл продуктивной инфекции с образованием живого фага-потомства. У дефектных фагов нарушены функции каких-то существенных генов, обязательных для литического развития фага. *Существенными генами* принято называть гены, обязательные для поддержания вируса в любом из свойственных ему состояний — литическом или лизогенном. Гены, необязательные для осуществления нормального цикла развития данного фага в стандартных условиях (хозяйин, среда, температура инкубации и др.), принято обозначать как *несущественные* или, что более правильно, *добавочные*. Становится все очевиднее, что эти гены контролируют осуществление определенных функций, причем в некоторых условиях их функции могут стать необходимыми, существенными. Например, развитие фага Т4 в лизогенных по фагу  $\lambda$  клетках *E. coli* зависит от состояния генов гII фага Т4.

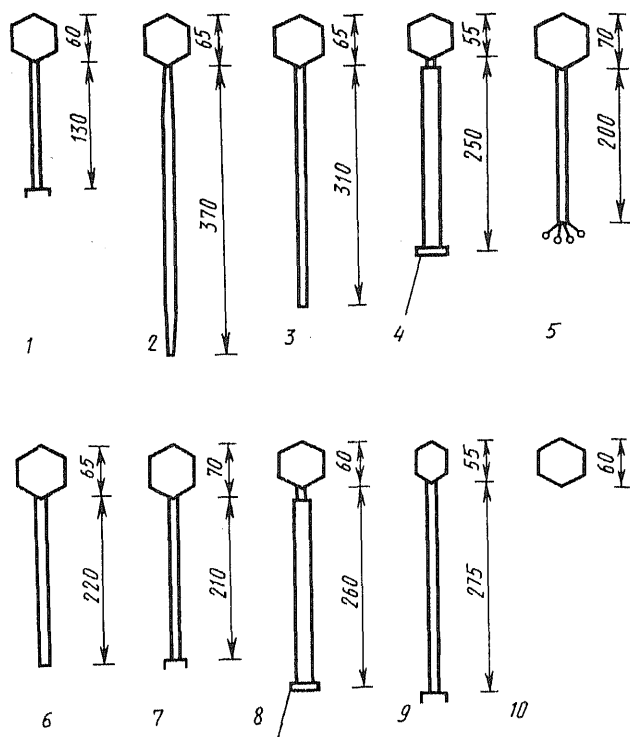


Рис. 9.8. Фагоподобные структуры (1—10), часто выявляемые в лизатах промышленных бактерий, в том числе и после обработки индуцирующими агентами.

У приведенных на рисунке образований не найдено ни специфической фаговой активности, ни признаков активности бактериоцинов, что может быть обусловлено дефектностью геномов соответствующих фагов или отсутствием среди тест-бактерий чувствительных штаммов (Като и др., 1984)

Бактериофаг, выделенный из природной популяции, принято обозначать как бактериофаг «дикого типа», а любые производные от него формы — мутантами или рекомбинантами, в зависимости от способа их возникновения.

Иногда дефектные фаги можно размножить в присутствии родственных фагов дикого типа, выполняющих роль помощника, восполняющего утраченные функции дефектного фага. В ходе совместного развития дефектного и недефектного родственного фага могут возникать рекомбинанты с новыми свойствами. Дефектные фаги и лизогены по дефектным умеренным фагам широко распространены в природных популяциях бактерий (рис. 9.8).

Природные дефектные фаги можно отнести к двум группам: 1) дефектные (включая криптические) профаги; 2) фаги-сателлиты.

*Дефектные профаги* умеренных фагов несут мутации, препятствующие образованию жизнеспособного потомства; криптические

фаги — те же дефектные фаги, однако дополнительно утратившие способность образовывать функционально-активный репрессор. Распознать наличие в клетке дефектного или криптического фага не всегда просто. Иногда в суспензии бактерий выявляют структуры, морфологически сходные с фаговыми частицами, но не проявляющие инфекционности; эти компоненты могут обладать свойствами бактериоцинов, но чаще не обнаруживают и этих свойств. О распространенности дефектных фагов свидетельствует, например, такой факт: широко используемая в молекулярно-генетических исследованиях бактерия *E. coli* линии K12 несет не менее трех разных дефектных профагов, родственных фагу  $\lambda$ . Эти профаги обнаружены по возникновению фагов  $\lambda$ , обладающих необычными свойствами, объяснимыми только комбинацией с родственным фагом.

*Фаги-сателлиты*, хотя их и можно рассматривать как разновидность дефектных фагов, на самом деле явление совершенно уникальное, пример высокоспецифичной эволюции паразитизма на молекулярном уровне. Так, фаг-сателлит P4 при инфекции бактерий нормально лизогенизирует их, но не может вызвать литической продуктивной инфекции, если клетка не инфицирована одновременно или не является лизогеном по полноценному фагу P2. Никакой ДНК/ДНК гомологии между этими фагами, кроме сходства липких концов в геномах, не найдено. Между фагом P4 и P2 существуют особые регуляторные отношения. Фаг P4 использует белковые продукты, кодируемые геномом P2, для синтеза собственного вириона, существенно отличающегося по структуре от вириона P2. В определенных условиях геном P4 может пребывать в клетке в состоянии плазмиды. Интересно, что и в небольшом геноме этого высокоспециализированного фага есть несущественные гены с невыясненной функцией.

*Удаление профага из лизогенных бактерий.* Если обнаружено, что клетки штамма-продуцента лизогенны и с определенной частотой образуют вирулентные мутанты фага, вызывающие фаголизис в производственных условиях, крайне желательно получить нелизогенный вариант бактерий или по крайней мере такой вариант, который не образует с высокими частотами жизнеспособных вирулентных мутантов фага.

Способы получения таких вариантов различны. Если известно, что профаг имеет внехромосомальную локализацию, обработка клеток митомицином C, детергентами или акридиновыми красителями, которые обычно элиминируют плазмиды, может привести к отбору «вылеченного» варианта бактерий. В случае если профаг находится в хромосоме и является индуцибельным, клетки, утратившие профаг, можно искать среди клонов, переживших процедуру индукции (при этом, однако, необходимо создать условия, предотвращающие реинфекцию таких вылеченных клеток фагом). Предотвратить реинфекцию можно разными способами: после индукции клетки высевать в условиях предотвращающих адсорбцию фага — в среду без необходимых кофакторов адсорб-

ции; высевать клетки в присутствии специфической антифаговой сыворотки; использовать варианты исходных бактерий, утратившие способность адсорбировать данный фаг. Эти варианты можно получить с использованием вирулентных мутантов данного фага или с использованием иных фагов (см. далее). Для неиндуцибельных фагов разработаны и более сложные методы «вылечения», использующие, например, введение в геном профага лизогенных бактерий термоиндуцибельных мутаций в гене, контролирующем репрессор с последующей индукцией обработкой теплом.

Иногда вполне достаточно придать фагу состояние дефектности. Нескольких мутаций, введенных в профаг обработкой лизогенных клеток мутагенами, может быть достаточно для предотвращения в дальнейшем фаголизисов, обусловленных возникновением вирулентных мутантов. Такие дефектные лизогены не должны продуцировать жизнеспособного фага в результате реверсий, что и определяет их применимость для использования в качестве продуцентов.

Критериями оценки степени излеченности от профага наряду с отсутствием фагопродукции может быть, например, утрата устойчивости к инфекции гомоиммунным умеренным фагом, обусловленная утратой гена, контролирующего синтез репрессора. Безусловным доказательством излеченности является утрата специфических нуклеотидных последовательностей в бактериальной ДНК, гибридизуемых с фаговой ДНК. Возможен и биологический тест — «спасение маркеров». Если часть генома профага сохранена, то инфекция таких клеток генетически маркированным фагом, т. е. фагом, несущим те или иные мутации, может приводить к возникновению гибридных фагов, несущих «спасенные» маркеры дефектного профага.

#### **9.8. ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ КЛАССИФИКАЦИИ БАКТЕРИОФАГОВ**

В настоящее время еще не разработано единой классификации вирусов вообще и бактериофагов в частности. Практическая необходимость привела к появлению классификаций, в основу которых положены общая морфология частицы (морфотип) и свойства генетического материала. В последнее время делаются попытки уточнить предложенные классификации более точным описанием морфотипов. Наиболее известные из классификаций по морфотипам — это классификация А. Бредли и в общем сходная с ней классификация А. С. Тихоненко.

На рис. 9.1. были представлены некоторые морфотипы фагов в соответствии с классификацией Бредли. Абсолютные размеры частиц в описании морфотипа не учитываются и приводятся отдельно. Такая классификация имеет, естественно, очень ограниченное значение, ее основная цель — создать удобство для описания морфологии частицы вновь выделенного фага. Г. Аккерман для

уточнения классификации по морфотипам ввел использование морфологических подтипов, в которых учитываются относительные размеры головки и хвостового отростка, форма головки, наличие специфических образований.

Морфологический критерий, безусловно, чрезвычайно важен, но сам по себе он недостаточен. Так, бактериофаги P22 *Salmonella typhimurium* и  $\lambda$  *E. coli* признаются родственными на основе способности образовывать жизнеспособные гибриды и выявляемой ДНК/ДНК гомологии, но по морфологии частиц эти фаги совершенно не сходны. С другой стороны, постоянно встречаются фаги, морфологически идентичные или почти идентичные, активные в отношении бактерий разных видов, родов, семейств. При использовании только морфологического критерия эти фаги следовало бы считать родственными (по крайней мере филогенетически).

Международный комитет по таксономии вирусов предлагает при классификации использовать свойства вириона и его нуклеиновой кислоты: 1) морфология и размеры вириона; 2) молекулярная масса частицы, седиментационные свойства, ее плавучая плотность; 3) тип, молекулярная масса, относительная доля, конформация и состав нуклеиновой кислоты; 4) серологические свойства и данные о гибридизации нуклеиновой кислоты; 5) физиологические тесты и тесты на спектр литической активности.

Часто в ранних попытках классификации фагов использовали содержание гуанина и цитозина (G. C.) как важный признак. Однако, как оказалось, этот признак не слишком надежный, особенно при дифференциации бактериофагов, активных в отношении одного и того же хозяина. Часто бактериофаги не отличаются по составу (G. C.) от хозяина; возможно, это отражает определенные эволюционные отношения между фагом и хозяином, например, возникающие как следствие использования общей системы генетического кодирования.

Устоявшегося мнения, как называть выявленные таким образом группы родственных фагов, пока нет. Есть предложение использовать термин *вид*, но некоторые считают этот термин неприемлемым в отношении вирусов вообще. В дальнейшем мы будем такие группы называть *видом* или *семьей* (эти термины используются одинаково часто). Разрабатываемая в последнее время модульная гипотеза структуры геномов бактериофагов и вообще вирусов, возможно, и послужит основой создания новых принципов классификации, причем в основу ее будет положена, и это скорее всего, классификация отдельных компонентов генома — модулей.

Неоценимое значение для классификации бактериофагов представляют методы, позволяющие осуществить прямую оценку наличия и уровня гомологии в их геномах. Среди этих методов следует упомянуть сравнение рестрикционных профилей ДНК фагов, изучение наличия и распределения участков ДНК/ДНК гомологии в геномах группы сравниваемых фагов (построение

гетеродуплексных (ГД) молекул ДНК, метод блот-гибридизации (Саузерна), изучение состава полипептидов фаговых частиц.

Метод рестрикционного анализа относительно прост, а использование большого набора рестрикционных эндонуклеаз существенно повышает его чувствительность в дифференциации фагов. Значительное сходство в профилях рестрикционных анализов для двух фагов свидетельствует, безусловно, о близком их родстве.

Наличие ДНК/ДНК гомологии в прямых тестах на гибридизацию, в ГД-молекулах, безусловно, доказывает родство фагов, однако эти методы осуществимы лишь в специально оборудованных лабораториях.

Наконец, существует и прямой способ доказательства родства фагов по обнаружению способности их к рекомбинации и образованию жизнеспособных гибридов. Именно так было открыто родство фагов P22 и  $\lambda$ .

Использование всего комплекса методов сравнения, как простейших, так и относительно более сложных, имеет своей целью отнести фаг к той или иной известной семье фагов, а затем осуществить сравнение с другими фагами в пределах этой семьи. Такое сравнение дает ответ, является ли данный фаг мутантом одного из уже известных фагов или вновь выделенным представителем этой семьи. Отнесение фага, выделенного в условиях производства, к определенной семье имеет принципиальное значение и для выбора способов получения устойчивых форм бактерий, и для оценки способов профилактики фаголизисов этими фагами, и для оценки вероятности повторных фаголизисов на производстве, вызванных фагами данной семьи.

Так, Джарвис изучила группу фагов молочнокислых стрептококков, используемых в производстве сыра сорта Чеддер (эти фаги были выделены в производственных условиях почти за сорок лет работы). По результатам сравнения морфологии частиц, ДНК/ДНК гомологии, состава полипептидов эти фаги были распределены по пяти видам (семьям). Фаги, относящиеся к одной и той же семье, обязательно проявляли ту или иную степень ДНК гомологии. Фаги, относящиеся к разным семьям, не обнаруживали никакой ДНК гомологии. В большинстве семей выявили по нескольку неидентичных фагов, что свидетельствовало в пользу независимого попадания фагов одной семьи на производство, а не в пользу мутационного происхождения одного фага от другого. В состав одной из семей вошел единственный фаг, и, вероятно, это не случайно: фаг был обнаружен на производстве последним, в 1982 г. Факт многократного выделения на протяжении многих лет фагов, относящихся к одним и тем же семьям, и выделение в самое последнее время нового фага — представителя новой семьи, может отражать определенные эволюционные отношения. Вероятно, этот фаг приобрел способность к развитию на молочнокислых стрептококках данного вида лишь недавно, изменив спектр литической активности мутационным или иным путем.



Исследования фагов, выделенных на производстве, свидетельствуют, что превращения фага одного морфотипа в другой путем мутации не происходит (в лабораторных условиях удается создавать варианты модельных фагов с измененными размерами головки за счет единичных мутаций). Некоторые небольшие отличия структуры фагов одной и той же семьи все же возможны. Так, среди фагов молочнокислых стрептококков описаны два фага, отличающиеся наличием структуры воротника, но проявляющие высокий уровень ДНК/ДНК гомологии.

Таким образом, наиболее простые способы идентификации и классификации фагов могут быть применены и в заводской лаборатории при условии владения общими методами работы с фагами. Почему так важно определить, к какой именно семье относится выделенный на производстве фаг? Фаги, относящиеся к одной семье, имеют сходную генетическую организацию. Их геномы можно представить себе состоящими из блоков генов, модулей, каждый из которых контролирует определенную функцию и связан с другими модулями в определенной, присущей фагам данной семьи, последовательности. Модули могут быть переданы от одного фага другому и при этом будут осуществлять присущую им функцию и в том случае, когда они отличаются по ДНК-гомологии от соответствующих модулей в геноме фага-реципиента. Предполагается, что для каждой семьи фагов количество вариантов таких модулей, контролирующих определенную функцию, не может быть слишком велико. Следовательно, изучение достаточного большого количества фагов — независимых изолятов, относящихся к данной семье, позволяет предсказать, например, могут ли (и с какой вероятностью) встретиться фаги, обладающие такой структурой модуля, контролирующего адсорбцию, что отобранные ранее фагоустойчивые клетки не будут проявлять устойчивости к этому новому фагу. Это позволит ориентировочно определить длительность возможного использования того или иного продуцента в производстве в нестерильных условиях, а также оценить перспективность получения штаммов, устойчивых одновременно ко всем фагам разных семей, активных на данных бактериях.

### **9.9. ФАГОВЫЙ ПРОФИЛЬ ЗАВОДА (ФПЗ)**

*Фаговый профиль завода* — это систематическая регистрация данных о наличии и количестве фагов, активных в отношении используемого на данном предприятии продуцента. ФПЗ дает оценку фагового фона на данном производстве, создающегося путем периодически возникающих и иногда проходящих необнаруженными фаголизисов. Ценность ФПЗ как признака, позволяющего оценить перспективу бесперебойного производства, очевидно, значительно возрастет, если выявленные фаги удастся отнести к определенной семье. Данные ФПЗ следует обязательно учитывать при смене продуцентов. Систематическое определение

ФПЗ позволяет проследить, как влияет введение новых штаммов на фаговый фон, не появляются ли при этом фаги совершенно новых, ранее неизвестных семей, или отбираются фаги ранее известных семей; последние несут в своем геноме модули, контролирующие ранее неизвестный спектр литической активности.

Систематическое исследование фагов, активных на определенных видах бактерий, в некоторых случаях ведет к предположению, что существует неравномерность в распределении числа разных семей фагов в отношении бактерий определенных видов. Так, вирулентные фаги, выделенные в разное время и в разных географических зонах, активные на одном из штаммов корнебактерий (продуцентов аминокислот), оказались принадлежащими к одной и той же семье. Возможно, что причиной такой неравномерности является использование лишь ограниченного числа штаммов индикаторных бактерий данного вида. С другой стороны, в определенных случаях нельзя исключить полностью и географического фактора. Действительно, согласно имеющимся наблюдениям фаги, активные в отношении *Pseudomonas putida*, выделяются чаще в степных зонах с богатыми почвами. Если эти выводы подтвердятся, их, безусловно, следует принимать в расчет при выборе места для заводов, использующих специфические бактерии-продуценты.

Признак неравномерности распределения разных семей фагов в отношении определенного продуцента важен для промышленности и по другой причине. Использование продуцентов с выраженной неравномерностью с ограниченным числом активных семей фагов или разной частотой фагов разных семей позволяет надеяться на получение фагоустойчивых бактерий, проявляющих устойчивость ко всем известным фагам.

#### **9.10. МЕХАНИЗМЫ ФАГОУСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ И СПОСОБЫ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ФАГОЛИЗИСОВ**

Согласно принятому мнению в ходе совместной эволюции бактерий и фагов последнее слово принадлежит бактериям. Следовательно, есть возможность получить устойчивые варианты бактерий, в которых данный фаг не способен развиваться и не может образовать мутантов, преодолевающих устойчивость. Возникает вопрос — почему, в таком случае, природные популяции чувствительных к фагам бактерий не замещаются популяциями полностью устойчивых клеток? Однозначного ответа на этот вопрос нет. Согласно одному из предположений в природе могут существовать такие условия, когда клетка, не обладая никаким специально развитым и генетически контролируемым механизмом устойчивости, все-таки не чувствительна к инфекции фагом («физиологическая устойчивость»). Косвенно в пользу возможности существования такого «физиологического» ограничения литического развития фагов можно рассматривать, на-

пример, то, что голодание клеток понижает вероятность выбора литического пути развития для умеренных фагов.

Другое предположение исходит из того, что фагу необходимы функции бактерии, в определенных условиях обязательные и для поддержания ее жизнеспособности. Действительно, например, белок Lam В *E.coli*, рецептор фага  $\lambda$ , обеспечивает транспорт в клетку мальтозы, а рецептор фага BF23 одновременно является рецептором и витамина В<sub>12</sub> и т. д. В этом случае фагоустойчивые клетки могут оказаться в определенных условиях неконкурентоспособными и их популяция будет снова замещена популяцией чувствительных клеток. Ниже будут рассмотрены механизмы, определяющие устойчивость бактерий к фагам.

### 9.10.1. Взаимодействие частицы фага и бактерии на стадии адсорбции

Химическая природа рецепторов даже в отношении фагов, относящихся к одной семье, может быть разной. Рецепторами могут служить белковые молекулы, полисахариды, липопротеины, липополисахариды.

Первичный контакт между фагом и клеткой осуществляется путем электростатического взаимодействия отрицательно заряженной поверхности клеточной стенки и положительно заряженных групп в структуре фаговой частицы. Для ряда бактериофагов, обладающих хвостовым отростком, показано, что головка обладает отрицательным зарядом, а хвостовой отросток (хвостовые волокна) — положительным зарядом. Специфическое распределение зарядов в частице фага предопределяет ориентацию частицы перед ее прикреплением к клеточной стенке. Некоторые мутации, нарушающие структуру белков головки, могут оказывать влияние на адсорбцию, возможно, изменяя распределение зарядов.

Поскольку такой механизм первичного взаимодействия способствует связыванию фагов с любыми отрицательно заряженными поверхностями, у некоторых фагов развились приспособления, препятствующие такому неспецифическому связыванию или (если оно произошло) инъекции генома. Например, хвостовые волокна фага Т4 обычно уложены таким образом, что не могут обеспечить адсорбции частицы без активации триптофаном. Фаг  $\lambda$  обладает способностью начинать инъекцию ДНК лишь после взаимодействия участка хвостового отростка фага с определенным белком клеточной мембраны, продуктом гена *pts M*. Интересно, что белок гена *pts M*, как и адсорбционный белок Lam В, участвует в транспорте углеводов. Поскольку синтез белка Lam В индуцируется в присутствии мальтозы, то и количество рецепторных сайтов для фага  $\lambda$  зависит от этого.

На разных этапах процесс адсорбции для разных фагов может быть зависим от присутствия в среде ионов двухвалентных металлов. Иногда эти ионы необходимы для внутриклеточного

**Т а б л и ц а 9.1. Зависимость адсорбции группы фагов от мутаций в гене lam B**

Группа мутантов	<i>E. coli</i>	Эффективность роста фагов:				Изменение аминокислот в белке и их положение
		лh <sup>+</sup>	лh	лhh	K10	
Дикий тип		+	+	+	+	
1-я группа	1	—	+	+	—	ГЛУ → ЛИЗ, 148 ГЛИ → АСП, 151 СЕР → ФЕН, 152
	2	—	—	+	—	
	3	—	—	+	—	
2-я группа	4	+	+	+	—	СЕР → ФЕН, 154 ФЕН → СЕР, 155
	5	+	+	+	—	
3-я группа	6	—	+	+	—	ГЛИ → АРГ, 245 СЕР → ЛЕЙ, 247 ГЛИ → АСП, 249
	7	—	+	+	—	
	8	—	+	+	—	
4-я группа	9	—	+	+	+	ГЛИ → АСП, 382
5-я группа	10	—	0,01	+	+	ГЛИ → АСП, 401

Примечание. «+» — рост фага с эффективностью посева 1,0; «—» — рост с эффективностью менее 10<sup>-6</sup>. ГЛУ — глутаминовая кислота, ГЛИ — глицин, СЕР — серин, АРГ — аргинин, ЛИЗ — лизин, АСП — аспарагиновая кислота, ФЕН — фенилаланин, ЛЕЙ — лейцин.

Арабскими цифрами в каждой группе мутантов обозначены различные независимые изоляты. Формальная схема адсорбционных рецепторов для этих фагов, построенная на основании данных работы Чербит и др., 1984, приведена на рис. 9.9.

развития фага. Описаны и иные эффекты ионов, например подавляющее влияние ионов кадмия на репликацию некоторых фагов.

*Мутанты бактерий с нарушенной адсорбцией бактериофагов.* Обычно отбор фагоустойчивых мутантов бактерий не представляет особого труда — достаточно смешать большое количество чувствительных бактерий с избытком фага (в жидкой среде или на поверхности твердой питательной среды). Выросшие в этих условиях инкубации колонии после нескольких последовательных пересевов (для очистки от сопутствующего фага) проверяются на наличие признака фагоустойчивости. Как правило, среди клеток удается найти достаточно много мутантов с нарушенной адсорбцией фага. Однако иногда их выявить трудно или не удастся вовсе (либо из-за трудностей определения адсорбции некоторых фагов в жидкой среде, либо в том случае, когда среди устойчивых форм преобладают мутанты, нарушающие внутриклеточное развитие фага). Иногда отобранные в присутствии избытка фага бактериальные клоны после очистки и проверки оказываются неотличимы от исходных чувствительных бактерий. Это бывает, как отмечалось выше, в ряде случаев псевдолизогении (носительства).

Мутанты бактерий с нарушением адсорбции, отобранные по устойчивости к определенному фагу, часто отличаются друг от друга разными свойствами. Наиболее просто это можно пока-

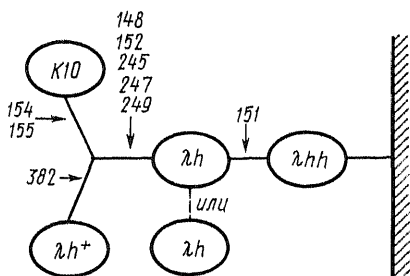


Рис. 9.9. Сопоставление результатов изучения роста разных фагов на разных адсорбционных мутантах бактерий с мутациями типа замен в гене lamB с видом формальной схемы рецепторов.

Построенная на основании данных табл. 9.1 схема формальных рецепторов позволяет сделать некоторые общие выводы о свойствах формальных схем: 1) независимо от степени разветвленности каждая цепочка рецепторов определяет единую молекулу рецептора; 2) каждый рецепторный сайт отражает уникальность данного фага в использовании для адсорбции различных участков данной рецепторной молекулы; 3) фаги, рецепторные участки которых на формальных схемах локализованы ближе всего к условному изображению клеточной стенки (справа), — это те фаги, адсорбционные сайты которых являются в наименьшей степени общими с другими фагами, или фаги, утрата адсорбционных участков для которых требует наличия, например, нонсенс-мутации

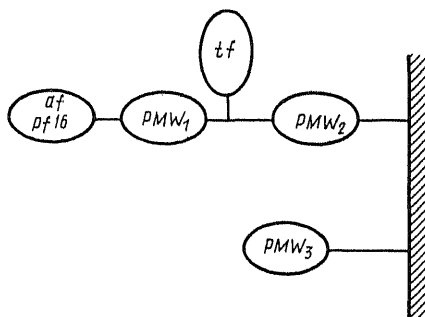


Рис. 9.10. Формальная схема фаговых рецепторов у бактерий *Pseudomonas putida* штамм PrG1 для группы фагов: af, pf16, tf, pMW.

Для данных фагов имеется две независимые рецепторные молекулы. Некоторые неродственные фаги (af, pf16) пока неразличимы по использованию рецепторных сайтов. Наличие всего двух рецепторных молекул и высокая «концентрация» рецепторных сайтов для фагов неродственных семей на этих молекулах позволяет надеяться на возможность отбора бактериальных мутантов с нарушением адсорбции всех фагов. Такие мутанты были отобраны. У некоторых из них выявлено приобретение чувствительности к фагам, к которым исходный штамм *P. putida* PrG1 был адсорбционно устойчив

зять, изучив устойчивость группы мутантов независимо отобранных по устойчивости к какому-то одному фагу, в отношении всех остальных фагов, активных на исходных штаммах (табл. 9.1). Результаты такого перекрестного изучения устойчивости можно представить наглядно в виде формальной схемы бактериальных адсорбционных рецепторов. На рис. 9.9 и 9.10 представлены формальные схемы для некоторых штаммов бактерий разных видов. Возможно, что в ближайшее время удастся найти способы сопоставления таких формальных схем с реальными структурами рецепторов.

Как уже упоминалось, адсорбция фага  $\lambda$  осуществляется на белке Lam B, контролирующем транспорт мальтозы и мальтодекстринов в клетку. Мутанты бактерий, не адсорбирующие фага  $\lambda$  дикого типа, относятся к двум группам. В первую группу входят мутанты с существенными повреждениями структуры белка Lam B, вызываемыми в основном нонсенс-мутациями и делециями. Такие мутации нарушают сразу все известные функции этого белка (адсорбцию разных фагов и транспорт углеводов). Во вторую группу входят миссенс-мутанты, возникающие путем замены отдельных аминокислот в белке. У таких мутантов некоторые свойства Lam B сохранены; например, со-

храняется способность к транспорту углеводов и к адсорбции каких-либо мутантов фага  $\lambda$ . Миссенс-мутации такого типа, по-видимому, не препятствуют образованию белком Lam В третичной структуры. Используя эти мутанты, удалось установить, что собственно рецепторами для фага  $\lambda$  дикого типа и его мутантов являются участки, расположенные по длине молекулы Lam В, причем определенным образом сгруппированные. Мутации устойчивости к разным фагам возникали при заменах аминокислот, занимающих в белке Lam В определенные положения (табл. 9.1). У большинства таких миссенс-мутантов не наблюдалась даже обратимая стадия адсорбции, тогда как у некоторых из них обратимая стадия осуществлялась. Возможно, что не только функция белка Pts М, но и какие-то свойства белка Lam В необходимы для обеспечения инъекции ДНК фага  $\lambda$ . Сравнение чувствительности бактериальных мутантов, имеющих разные замещения аминокислот в белке Lam В, к разным мутантам фага  $\lambda$ , позволило определить, какие именно участки белка Lam В обязательны для адсорбционных рецепторов того или иного фага. Например, аминокислоты в положениях 154 и 155 входят в состав рецепторного сайта фага K10, но не фага  $\lambda h^+$  дикого типа или его мутантов. В то же время аминокислоты в положениях 382 и 401 входят в состав рецептора только фага  $\lambda$  дикого типа. Для фага  $\lambda h$  существенным является положение 151 в белке. Замещение аминокислоты в данном положении ведет к утрате адсорбции этого фага.

Распределение гидрофильных и гидрофобных частей в молекуле Lam В позволило построить рабочую модель, согласно которой рецепторные участки расположены в областях сгибов молекулы Lam В, пронизывающей мембрану клетки.

Можно предположить, что отдельные «ветки» на формальных схемах адсорбционных рецепторов соответствуют отдельным молекулам или критическим для адсорбции данного фага сайтам в пределах молекулы (табл. 9.1, рис. 9.9).

Количество адсорбционных рецепторов для каждой из семей фагов ограничено. Поэтому изучение адсорбционных свойств фага, выделенного на производстве, с использованием (заранее созданного) набора фагоустойчивых мутантов, отобранных в отношении других фагов, может показать возможности дальнейшего отбора устойчивых бактериальных мутантов с блокадой адсорбции.

Пока нет установившегося мнения о пределах коэволюции рецепторов для фага на поверхности бактерий и адсорбционного аппарата фага. Некоторыми исследователями возможности такой коэволюции признаются беспредельными, т. е. предполагается, что в отношении каждого адсорбционно-устойчивого мутанта бактерий можно получить соответствующий мутант фага с расширенным спектром литической активности. Даже из общих соображений это предположение не представляется убедительным. Согласно другой точке зрения, имеющей экспериментальные подтверждения, пределы коэволюции системы бактерия — фаг существуют: огра-

ничество определяется свойствами белков фага и свойствами рецепторного аппарата бактерии.

Некоторые мутации бактерий могут приводить к возникновению механического препятствия для адсорбции, если, например, рецепторный участок вследствие изменения топологии клеточной поверхности оказывается заглубленным и фаговый адсорбционный аппарат не может войти с ним в прямое соприкосновение.

Как правило, очень трудно (а иногда, по-видимому, и невозможно) отобрать мутантные фаги с расширенным спектром действия в отношении таких бактериальных мутантов, у которых рецепторный участок утрачен совсем (например, при возникновении нонсенс-мутаций в соответствующем гене).

Накопление мутаций в определенном гене, контролирующем структуру рецептора бактерии, может привести к нарушению какой-то функции клеточной мембраны, а длительная мутационная изменчивость соответствующего рецепторного белка фага может понизить его стабильность и вместе с тем стабильность частицы фага в целом. Первое из предположений подтверждается частой встречаемостью среди бактериальных фагоустойчивых адсорбционных мутантов форм, несущих изменения и других признаков (мутации с плейотропным эффектом), например скорости деления, устойчивости к антибиотикам, проницаемости и др. Не исключена и возможность возникновения в ходе последовательного отбора фагоустойчивых мутантов бактерий и преодолевающих их устойчивость мутантов фага таких форм белков в адсорбционном аппарате фага, которые могут обладать цитотоксическим эффектом, проявляемым при контакте с клеткой, что предотвратит последующий продуктивный цикл.

Некоторые авторы считают, что мутации, ведущие к изменению клеточных рецепторов, оказывают меньшее влияние на жизнеспособность бактерий, чем мутации, изменяющие рецепторный аппарат фага, на его жизнеспособность. Из этого делается вывод, что имеется определенная асимметрия возможностей эволюции для фага и бактерий. Вместе с тем положение сложнее, поскольку некоторые фаги в ходе эволюции приобрели (приобретают?) способность обходить ограничения, накладываемые этой асимметрией. Например, у разных представителей семьи T-четных фагов *E. coli* при изучении консервативности последовательности нуклеотидов в генах, эквивалентных по функции гену 37 фага T4 (определяет последовательность аминокислот в белке хвостовых фибрилл и специфичность адсорбции) обнаружили следующее. Хотя эти белки и определяют морфологическую структуру (хвостовое волокно), их консервативность существенно ниже, чем консервативность белков головки. В то же время рецепторы для разных T-четных фагов очень разнообразны и представлены не только разными белками-компонентами клеточной мембраны, но и небелковыми веществами. Например, рецептором фага T2 является белок Omp F, фага K3 — белок Omp A, фага T6 — белок Tsx, а рецептором фага 4 — липополисахарид.

Чем же обусловлено такое разнообразие в способности разных фагов одной семьи использовать разные рецепторы? Оказалось, что в генах — аналогах гена 37 встречаются гомологичные участки, разбросанные по длине гена. Такой мозаичный характер распределения участков гомологии/негомологии позволяет предположить, что конкретная структура гена 37 фагов этой семьи возникает как следствие рекомбинации субмодулей в пределах гена. У одного из Т-четных фагов в пределах гена 37 было очень мало областей, гомологичных соответствующим областям генов типа 37 других фагов, в том числе и в той части гена, которая кодирует распознавание хвостовыми фибриллами соответствующего рецептора — белка Опр А. Таким образом, разные родственные фаги могут использовать разные участки одного и того же белка в качестве рецепторов для адсорбции. Возможно, что столь выраженная для Т-четных фагов способность использовать разные по природе бактериальные рецепторы является особым приобретением, типичным именно для вирулентных фагов, причем именно для фагов с высоким уровнем автономности.

### **9.10.2. Лизогенная конверсия как причина фагоустойчивости**

Лизогенная конверсия — частный случай фаговой конверсии — изменение свойств клетки, вызванное присутствием в ней профага. Профаг может сообщать клетке токсигенность (например, образование дифтерийного и скарлатинозного токсинов, а также токсина *E. coli*, сходного по свойствам с токсином *Shigella shiga*, контролируется соответствующими профагами). Присутствие профага Р1 придает клетке *E. coli* способность ограничивать за счет действия рестрицирующего фермента проникновение в клетку чужеродных ДНК, в том числе и геномов других фагов. Иногда лизогенная конверсия проявляется в изменении адсорбционной способности бактерий. Предполагают, что фаги, обладающие такой способностью, в ходе предшествующей эволюции захватили из геномов разных бактерий гены, контролирующие синтез или модификацию бактериальных рецепторов. Лизогенная конверсия адсорбционных свойств может изменять чувствительность бактерий не только к тому фагу, которым вызывается, но и к целой группе иных фагов или бактериоцинов. Широко известна конверсия соматических антигенов у бактерий рода *Salmonella*, контролируемая фагами группы *ϕ*.

### **9.10.3. Возникновение фагоустойчивости при нарушении внутриклеточного развития фага**

Проникновение генома фага в бактерию вовсе не всегда приводит к осуществлению цикла продуктивной инфекции. Развитие фага может быть блокировано на самых разных стадиях внутриклеточного роста.



### **9.10.3.1. Ограничение развития фага активностью рестрикционных эндонуклеаз**

Многие бактерии обладают способностью разрушать проникающую в них чужеродную ДНК (включая и ДНК фагов). Это явление, получившее название рестрикции (ограничения), обусловлено активностью ферментов эндонуклеаз. Защита генома бактерий от действия собственных эндонуклеаз происходит благодаря специфической модификации (обычно метилирования) отдельных нуклеотидов, входящих в определенные последовательности разной протяженности (участки расщепления). При инфекции клеток большим количеством фага рестрикционные эндонуклеазы не всегда успевают разрушить все геномы инфицирующих фагов. В случае репликации генома фага, избежавшего рестрикции после инфекции, вновь синтезированная ДНК фага модифицируется и поэтому возникшее потомство фага уже не будет при вторичной инфекции исходных бактерий подвергаться ограничению. Участки, чувствительные к рестрикционным эндонуклеазам, распределены в геноме каждого фага определенным образом. Мутационная утрата таких участков делает фаг менее чувствительным к ограничению при инфекции бактерий.

### **9.10.3.2. Ограничение развития фага в ходе внутриклеточного цикла роста**

**Ограничения развития фага, обусловленные свойствами бактерии.** Зависимость внутриклеточного развития бактериофага от наличия многих ферментов, а также структур бактерий, не всегда существенных для самой клетки, позволяет отбирать такие мутанты бактерий, в которых развитие фага заблокировано на разных стадиях — транскрипции, трансляции, репликации НК, сборке зрелых частиц. У таких мутантов адсорбция фага обычно не нарушена. Следует отметить, однако, что среди фагоустойчивых мутантов с нарушением внутриклеточного развития фага обычно выявляют лишь те мутанты, которые переносят осуществление определенных стадий развития фага. Обычным отбором не удастся выявить мутанты, которые, ограничивая развитие фага, и сами погибают. Между тем именно такие мутанты были бы хорошим средством для «гашения» вспышки фаголизиса. Действительно, ранняя гибель инфицированной бактерии без образования даже минимального количества жизнеспособного фага способствовала бы тому, что вторичные мутанты фага, способные обойти такой тип устойчивости, отбирались бы редко.

Бактериальные мутанты с нарушением внутриклеточного развития фага чрезвычайно специфичны и часто оказываются неспособными ограничить развитие всех фагов, относящихся даже к одной семье. В то же время некоторые такие мутанты ограничивают развитие фагов, относящихся к разным семьям.

**Ограничения, вызванные присутствием плазмид в клетке.** Блокада внутриклеточного развития фага может быть обусловлена

присутствием в клетке некоторых плазмид. Взаимодействия плазмид и фагов разнообразны и специфичны. Рассмотрим несколько примеров таких взаимодействий.

1. Влияние плазмид RPL11, Rms 163 и Rms 148 на внутриклеточное развитие фагов *Pseudomonas aeruginosa*; эти взаимодействия к настоящему времени изучены наиболее подробно.

Плазида RPL 11 подавляет ранние этапы развития некоторых фагов-транспозонов *P. aeruginosa*, но только после инфекции клеток свободным фагом; при этом подавляется осуществление и литического цикла, и лизогенизации. Типичной рестрицирующей активности плазмиды RPL 11 не контролирует. Ограничение развития фага определяется присутствием в разных местах генома фага двух специфических участков и взаимодействием с этими участками продукта, контролируемого геномом плазмиды. При этом некоторые гены фага сохраняют способность к выражению, а активность других генов (например, контролирующих лизогенизацию) выявить не удается. Наличие в геноме лишь одного участка, взаимодействующего с продуктом плазмиды, недостаточно для полной блокады развития фага. Поскольку подавляющее действие плазмиды RPL 11 проявляется и в отношении некоторых вирулентных фагов, активных в отношении *P. putida*, можно заключить, во-первых, что действие этой плазмиды не ограничено только фагами одной семьи, и, во-вторых, что эффект плазмиды проявляется у самых разных бактериальных видов. Согласно полученным данным плазида RPL 11 понижает эффективность репликации фагов.

Плазида Rms 148 в отличие от RPL 11 ограничивает лишь литическое развитие, но не лизогенизацию; опять-таки, как и в случае RPL 11, ее эффект проявляется только при инфекции клеток свободным фагом, но не после индукции профага. Плазида Rms 148, как и RPL 11, подавляет и развитие некоторых вирулентных фагов. Признаки устойчивости — чувствительности к подавляющему эффекту этих плазмид — свободно рекомбинируют при скрещиваниях родственных фагов. Подавление развития фагов плазмидой Rms 148 осуществляется через взаимодействие продукта плазмиды с двумя или большим числом участков в геномах фагов.

Наконец, плазида Rms 163 обладает (ранее не описано) способностью повышать частоту лизогенизации клеток некоторыми умеренными фагами. Опять-таки и этот эффект не ограничен только родственными фагами, а проявляется в отношении фагов разных семей. Эффект плазмиды Rms 163 определяется сложным взаимодействием группы генов фага, контролирующей лизогенизацию, продукта плазмиды Rms 163 и участка в геноме фага, находящегося рядом с геном *cI*, определяющим синтез репрессора. Возможно, в этом участке находится промотор гена *cI*.

2. Взаимодействие плазмиды RP4 и фага В3 *P. aeruginosa*.

Клетки, несущие RP4, не подавляют литического развития фага В3, однако введение RP4 в лизогены по фагу В3 резко ограничено, а те клетки, которые все-таки получают плазмиду RP4, содержащую дефектный профаг В3 или дефектную плазмиду RP4, утратившую способность к дальнейшей конъюгативной передаче. Взаимодействия такого типа можно использовать в основе рабочих приемов «вылечивания» лизогенных бактерий от хромосомально локализованного неиндуцибельного профага.

3. Взаимодействия между фагами и плазмидами, подвергнутыми генно-инженерным операциям *in vitro*. В приведенных выше примерах описаны взаимодействия между природными плазмидами и фагами. В последнее время выявляется много случаев взаимодействия между плазмидами, утратившими после обработки *in vitro* рестрицирующими ферментами определенные участки или, напротив, получившими фрагменты чужеродной ДНК, и разными фагами. Опять-таки взаимодействие во всех описанных случаях имеет высокоспецифичный характер.

Так, удаление участка из плазмиды Col E1b ведет к появлению у нее свойства подавлять развитие фага Т7 дикого типа. При встройке в плазмиду-вектор участка генома фага Т3, несущего гены фага, контролирующие лизис клетки, возникает способность такой плазмиды подавлять рост исходного фага дикого типа. Предполагается, что этот эффект обусловлен стимуляцией активности встроенных в плазмиду литических генов фага при инфекции клеток нормальным фагом (трансактивация), в результате чего бактерии лизируются и фаг не успевает образовать потомства.

**Влияние профагов на устойчивость бактерий к литической инфекции вирулентными фагами.** Клетки *E. coli*, несущие профаг  $\lambda$  дикого типа, не поддерживают роста мутантов гII фага Т4, но не ограничивают рост фага Т4 дикого типа. Подавление осуществляется активностью генов *gex* фага  $\lambda$ . Оказывается, активность генов *gexA* и *gexB* фага  $\lambda$  исключает развитие и других фагов, например родственных фагу  $\lambda$  фага Ø80 и фага P22, определенных мутантов фагов Т5 и Т7. О механизме подавления роста фагов функцией генов *gex* известно мало. Лизогенные по  $\lambda$  клетки, инфицированные фагом гII Т4, очень рано (в пределах 5 мин после инфекции) утрачивают способность поддерживать развитие фага. Считают, что *gex*-функция как-то влияет на репликацию фага. Гены *gex* считаются с трех разных промоторов. Транскрипция с промоторов *p<sub>RE</sub>* и *p<sub>RM</sub>* ведет к координированному считыванию генов *gex* и гена *cl*. Третий промотор, *p<sub>lit</sub>*, находится в конце гена *gexA* и определяет считывание гена *gexB*. Причина необходимости столь сложной регуляции как будто несущественных генов *gex* остается пока неясной. Одно из возможных предположений — гены *gex* определяют какую-то модификацию плазматической мембраны бактерий, делающую ее структуру в наилучшей степени приспособленной для поддержания репликации фага  $\lambda$ , но не других фагов или их мутантов.

По-видимому, в определенной степени сходные отношения подавления существуют и в отношении фага  $\lambda$  профагом P2. P2-подобные фаги — первая по частоте встречаемости семья умеренных фагов *E. coli*. Фаг  $\lambda$  не образует негативных колоний на клетках с профагом P2, что определяется сложным взаимодействием продуктов гена *old*, фага P2 и генов *ged* и *gam* фага  $\lambda$ .

Специфические профаг — фаг взаимодействия найдены и в других системах, например, для фагов-транспозонов *P. aeruginosa*. В геноме профага функционирует ген, продукт которого осуществляет подавляющий эффект на развитие гетероиммунных родственных фагов. Количество продукта этого гена (число копий профага) определяет степень подавления. У подавляемого фага ухудшается репликация, транспозиция, интеграция в хромосому.

#### **9.10.4. Борьба с фаголизисом в производственных условиях**

Предотвращение фаголизисов и гашение их вспышек в производственных условиях — задача противофаговой службы. Независимо от конкретных организационных форм в эту службу обязательно должны входить заводская лаборатория, научно-исследовательская лаборатория, специализирующаяся на исследовании бактериофагов, и научно-исследовательская генетико-селекционная лаборатория, проводящая исследования и селекцию активных форм соответствующего продуцента. Необходимость согласованной работы этих подразделений в решении задач противофаговой службы объясняется самим характером работы по выявлению и предотвращению фаголизиса (см. ниже).

Выявление роли бактериофага как причины неудачных ферментаций обычно является задачей заводской лаборатории. Вместе с тем глубокое изучение свойств вновь выделенного фага, вплоть до его классификации, провести в заводской лаборатории трудно как из-за ограниченных возможностей в использовании дорогостоящих приборов и реактивов, так и прежде всего из-за опасности распространения фага на производстве (для многих методов исследования требуются большие количества фага). Поэтому работу по классификации фага целесообразно проводить в специализированной фаговой лаборатории, хорошо оснащенной и обладающей соответствующим опытом работы с фагами. Отобранные на любых стадиях работы фагоустойчивые варианты бактерий-продуцентов должны пройти обязательную проверку на сохранение ими всех необходимых производственных свойств и на отсутствие нежелательных свойств, которые могут возникнуть в ходе придания клеткам признака фагоустойчивости. Эти работы в наилучшей степени могут быть выполнены в генетико-селекционной лаборатории.

В самом общем виде задачи противофаговой службы можно представить следующим образом.

1. Обязательный постоянный контроль фагового фона завода и построение фагового профиля завода (ФПЗ). При появлении фагов, активных на используемом продуценте, произвести смену продуцента.

2. Проверка всех штаммов бактерий, вводимых в производство, на чувствительность ко всем известным в отношении данного вида фагам, проверка лизогенности (в том числе и по дефектным фагам), проверка бактериоциногенности и выдача аргументированных рекомендаций относительно возможности использования штамма в качестве продуцента.

3. Опережающий поиск в природных условиях новых фагов, активных на данном продуценте и бактериях родственных видов, отбор фагоустойчивых вариантов к соответствующим фагам. Исследование механизмов фагоустойчивости бактерий. Классификация фагов с использованием современных методов анализа ДНК и белков.

4. Изучение сохранения производственных свойств (продуктивности и др.) у фагоустойчивых мутантов и, при необходимости, осуществление работы по приданию фагоустойчивым вариантам соответствующих свойств.

Борьба с фаголизисами на производстве состоит из работы по их предупреждению, а также из мероприятий, которые необходимо осуществлять при угрозе фаголизиса и при окончательном подтверждении роли фага как причины неудачных ферментаций и после определения пути его попадания на производство.

Некоторые мероприятия носят профилактический характер. Среди них следует отметить прежде всего соблюдение технологической дисциплины и использование соответствующих штаммов-продуцентов.

1. Соблюдение технологической дисциплины: надежность стерилизации питательных сред, воды, воздуха, добавок и другие мероприятия, наличие соответствующих санитарно-гигиенических условий и тщательное соблюдение правил санитарии, герметичность оборудования, использование свободного от фагов посевного материала.

2. Использование соответствующих штаммов-продуцентов. Эти штаммы должны по возможности отвечать двум требованиям: быть нелизогенными (по крайней мере не выделять живого фага) и быть устойчивыми ко всем известным фагам, активным в отношении данного продуцента.

Нет единого мнения о значении лизогенных продуцентов, относящихся к разным видам бактерий, как возможных источников вирулентных фагов на производстве. Для ряда продуцентов происхождение некоторых вирулентных фагов, вызывающих фаголизис на производстве, доказано. В ряде других случаев столь же однозначно доказано, что многолетнее использование лизогенных продуцентов никогда не приводило к возникновению или отбору вирулентных мутантов.

А. Джарвис, сравнив умеренные фаги молочнокислых стреп-

тококков, используемых в производстве сыра, показала, что, во-первых, фаги, выделяемые после индукции и выявляемые электронно-микроскопически, как правило, не удается размножить на каких-либо индикаторных бактериях и, во-вторых, все выделенные до сих пор и изученные вирулентные фаги этих бактерий не проявляют ДНК/ДНК гомологии с профагами. В этом случае использование лизогенных продуцентов оказалось относительно безопасным с точки зрения возможности возникновения фаголизиса, вызываемого вирулентными мутантами. В то же время многократно описано происхождение вирулентных фагов на производстве как вирулентных мутантов умеренных фагов (например, для актиномицетов, бревибактерий).

Случаи выявления в суспензиях бактерий фагоподобных частиц, фаговую природу которых, однако, не удается подтвердить, довольно часты. Неясно, является ли причиной этого дефектность профага или отсутствие среди испытуемых тест-штаммов чувствительного к данному фагу штамма. Не исключено, что иногда фаги, выделяемые бактериями данного вида, могут проявлять свою активность на клетках иного вида или даже рода. Возможность миграции фагов, по крайней мере фагов-транспозонов, в лабораторных условиях между видами, родами и семействами бактерий неоднократно демонстрировалась.

Как следует относиться к использованию лизогенных продуцентов? По возможности этого следует избегать, но в тех случаях, когда это по тем или иным причинам невозможно, желательно сделать попытку получить клетки, «вылеченные» от профага. Для этого следует, во-первых, изучить способность соответствующего профага к индукции, во-вторых, проверить возможность возникновения вирулентных мутантов этого профага в лабораторных условиях в опытах после интенсивной мутагенной обработки и, в-третьих, попытаться вылечить бактерии от профага. Если использование данного лизогенного продуцента и не приводило ранее к отбору вирулентных мутантов, производство, использующее такие бактерии, должно быть под постоянным контролем. Дело в том, что возникновение вирулентных мутантов, и особенно из дефектного профага, может требовать многих мутационных или рекомбинационных событий, что, в свою очередь, требует времени и не всегда может быть обнаружено в лабораторных условиях.

Знание фаготипа продуцента, имея в виду под этим все многообразие фагов, активных на данных бактериях, а также фагов, активных на близкородственных бактериях, должно быть обязательной предпосылкой для введения бактерий в производство. Недопустимо внедрять в производство бактерии заведомо чувствительные к известным бактериофагам, даже если эти штаммы обладают ценными производственными свойствами — высоким уровнем биосинтеза и т. д. Такие штаммы требуют дополнительной работы по приданию им свойства фагоустойчивости.

Имея в виду явление носительства, следует подчеркнуть важность не просто отбора устойчивого к фагу штамма бактерий, но и обязательность тщательного изучения механизма устойчивости. Действительно, известны бактериальные мутанты, утратившие возможность адсорбировать фаг и поддерживать его развитие, но способные при определенных физиологических состояниях становиться фагочувствительными. Введение такого штамма в производство не только не защитит от фага, но может привести к появлению фага с более выраженной литической активностью.

Поскольку внедрение фагоустойчивого штамма в производство требует осуществления обязательных испытаний, работу по отбору фагоустойчивых вариантов (их проверку и характеристику) следует проводить заблаговременно, используя группу фагов, выделенных во внешней среде. Предварительное получение набора разрешенных к внедрению фагоустойчивых продуцентов может в условиях начавшегося фаголизиса быть гарантией его быстрого гашения.

Ниже рассматриваются способы придания продуцентам фагоустойчивости в соответствии с описанными ранее механизмами и дается оценка относительной эффективности этих механизмов. Кроме того, рассматриваются специальные приемы — использование многокомпонентного посевного материала, ротации культур — как способы предотвращения фаголизисов и уменьшения ущерба от них.

1. *Бактериальные мутанты, не адсорбирующие фаг.* В настоящее время наиболее надежный способ придания фагоустойчивости продуцентам. Поскольку разные фаги имеют часто разные адсорбционные рецепторы, очевидно, что для отбора фагоустойчивых бактерий необходимо использовать набор бактериофагов, активных на этих бактериях, с разными спектрами литической активности (в том числе фагов, относящихся к одной семье, если они различаются по специфичности адсорбции). Очевидно, что все это требует проведения предварительной работы по классификации бактериофагов и по изучению их адсорбционной специфичности. Обычно удается выделить мутанты бактерий, не адсорбирующие все взятые в исследование фаги, хотя иногда и встречаются существенные трудности. Во-первых, некоторые мутационные модификации структуры клеточной поверхности обладают плейотропным эффектом и влияют на скорость деления клетки или продукцию клеткой метаболита. Во-вторых, иногда бактерии, изначально устойчивые ко всем известным фагам, активным против данного штамма, неожиданно приобретают чувствительность к этим фагам.

2. *Устойчивость за счет подавления внутриклеточного развития.* Всем типам такой устойчивости присущ один и тот же признак — высокая специфичность. В результате устойчивость ограничивается подавлением роста одного-двух фагов данной семьи, а остальные вовсе не реагируют на данный ограничиваю-

щий механизм. Например, фаги, относящиеся к одной семье, могут существенно отличаться наличием и распределением в их геномах участков, чувствительных к разным эндонуклеазам. В результате использование рестрикционных эндонуклеаз в клетке как факторов ограничения развития фага может иметь относительно малый эффект, определяемый возникновением мутантов или рекомбинантов фагов, способных избегать подавления данным рестрицирующим ферментом.

Использование в качестве факторов ограничения роста фагов таких специфических взаимодействий оправдано лишь в том случае, когда, например, в результате предварительного изучения фагов подтверждено, что большинство из них действительно могут быть эффективно ограничены при использовании этого приема. Правомерность приведенных рассуждений сохраняется и для комбинированного использования разных способов придания фагоустойчивости.

3. *Защита «открытых» производств, использующих бактериальные продуценты.* Современное микробиологическое производство, рассчитанное на осуществление операций в стерильных условиях, может в принципе быть сподобным от фаголизисов. Использование нелизогенных продуцентов, высококачественных аппаратов, тщательное соблюдение технологической дисциплины на всех этапах производства должны гарантировать, что бактериофаги в производственные емкости не попадут вообще. Между тем ряд производств и процессов осуществляется в относительно нестерильных или полностью нестерильных условиях (виноделие, сыроделие, очистка микроорганизмами промышленных стоков и т. п.). Очевидно, что в этих случаях требования к фагоустойчивости исходных штаммов резко повышаются.

Использование ряда приемов способствует ограничению фаголизисов и в условиях использования бактерий в нестерильных или относительно стерильных условиях. Основные идеи — использование смешанных культур, часто разных видов, и ротация — периодическая смена таких многокомпонентных заквасок. Составление исходной маточной суспензии из смеси бактерий (относящихся к разным штаммам одного вида или к разным видам) создает определенную уверенность, что при попадании в ферментационную емкость фага, активного лишь в отношении одного из компонентов такой закваски, остальные компоненты останутся неповрежденными. В результате общая эффективность всего процесса если и изменится, то незначительно, и ущерб будет небольшим. Однако при использовании определенной смеси бактерий в течение длительного времени произойдет отбор и накопление фагов, активных против каждого из компонентов смешанной культуры. Эту трудность обходят использованием второго приема — ротации смешанных культур.

В последнее время такой традиционный подход подвергается определенному пересмотру с целью устранить свойственные ему недостатки. Эти недостатки следующие: 1. Чрезмерно большое



количество компонентов в смеси культур создает трудности в их подготовке и получении. 2. Обычно смешанные культуры используются без учета того, какие именно конкретные фаги в настоящее время вызывают фаголизис. 3. Использование смесей, составленных каждый раз из бактерий разных видов, может привести к нестандартности качества конечного продукта. Как можно преодолеть эти недостатки?

Прежде всего, обязательным условием для включения штамма в многокомпонентную смесь должно быть предварительное исследование бактерий на устойчивость ко всем фагам, ранее обнаруженным на данном производстве. Это требует, очевидно, постоянного наблюдения за наличием и количеством фагов на производстве, а также их идентификации. Другое крайне желательное условие: каждый раз, при использовании многокомпонентной смеси бактерий, сводить до минимума число составляющих, относящихся к разным видам (не более 5—6 штаммов в смеси, относящихся к 2—3 видам). Использование таких смесей с небольшим числом компонентов разных видов способствует исчезновению фагов, активных в отношении бактерий тех видов, которые могут оказаться в составе следующей смеси. Наконец, важное технологическое усовершенствование — приготовление достаточных количеств свободных от фагов исходных смесей бактерий и хранение их до использования в состоянии глубокого охлаждения.

При использовании смешанных культур необходима и обязательна проверка взаимной совместимости штаммов, входящих в смесь. Некоторые штаммы могут быть лизогенны и не исключено, что выделяемый ими при спонтанной индукции фаг может оказаться активным на клетках других штаммов, входящих в эту смесь. Проверка на совместимость исключает еще одну возможность появления фага в смешанной культуре — а именно, возможность «оживления» дефектного профага в одном из штаммов при передаче ему от другого штамма какой-либо фазмиды, или плазмиды, несущей геном дефектного, но родственного фага. Появление жизнеспособных фагов при совместном культивировании двух штаммов, каждый из которых не выделяет жизнеспособного фага, описано, например, для продуцента энтомопатогенного токсина *Bacillus thuringiensis*. Из смешанных культур желательно также исключить штаммы, чувствительные к действию бактериоцинов.

При появлении фага, активного на одном из штаммов, входящих в многокомпонентную смесь, когда титр этого фага превышает некоторую критическую величину (определяемую в каждом случае особо, исходя из реального влияния фаголизиса на выход продукта и его качество), штамм, в отношении которого обнаружен фаг, из исходной смеси изымается и производство продолжается на оставшихся в смеси штаммах; одновременно начинается работа по получению фагоустойчивого варианта штамма, изъятого из общей смеси. Полученный фагоустойчи-

вый вариант штамма снова вводится в многокомпонентную смесь (при условии, что приобретение признака фагоустойчивости не сказалось на необходимых для производства свойствах этого штамма).

Согласно имеющимся данным использование такой системы работы ведет к существенному понижению числа операций, сопровождающихся фаголизисом, и как следствие к существенному повышению качества и стандартности конечного продукта (поскольку в этом случае нет ротации, видовой состав смеси постоянен). У такой схемы работы есть и другое преимущество. Использование определенных хорошо охарактеризованных штаммов бактерий в смеси позволяет начать планомерную научно-исследовательскую работу по улучшению свойств каждого из штаммов. В частности, известно, что некоторые технологически важные свойства бактерий определяются наличием специфических плазмид. Например, плазмиды биodeградации контролируют способность бактерий разлагать сложные и часто очень токсичные химические соединения. Плазмиды бактерий, используемых в сыроделии, контролируя образование протеолитических ферментов, высвобождают свободные аминокислоты из белков молока, обеспечивают хороший рост бактерий и образование ими молочной кислоты. Ограничение состава смеси определенными штаммами позволяет вести длительную работу по изучению соответствующих плазмид и регуляции активности генов (ответственных за данный признак) с целью улучшения свойств производственных штаммов в смеси.

### **9.10.5. Специальные меры при возникновении фаголизисов**

Признаки, позволяющие подозревать фаголизис как причину неудачной ферментации, не слишком специфичны, однако знать их полезно.

1. Изменения в ФПЗ, состоящие в возрастании общего титра фага, появлении необычных по типу негативных колоний или спектру литического действия фагов, дают основание предположить, что существует возможность фаголизиса.

2. Вспенивание культуральной жидкости (лизис клеток ведет к освобождению большого количества белков, обеспечивающих устойчивость пены).

3. Медленное нарастание оптической плотности (мутности) культуры может быть обусловлено лизисом части популяции бактерий фагом. В некоторых случаях происходит почти полное прояснение суспензии бактерий.

4. Возрастание вязкости культуральной жидкости (из-за освобождения при лизисе высокомолекулярных компонентов — нуклеиновых кислот, полисахаридов).

5. Изменение pH (подкисление среды).

6. Падение уровня выхода конечного продукта. Иногда — при сопутствующей инфекции посторонними микроорганизмами — может происходить исчезновение уже образованного метаболита из культуральной жидкости.

7. Развитие сопутствующих микроорганизмов может вести к изменению цвета, запаха культуральной жидкости. Наличие фаголизиса и исчезновение бактерий — продуцентов исходной популяции продуцента — может создать для развития загрязняющих микроорганизмов особо благоприятные условия.

Меры, которые следует принимать при угрозе возникновения фаголизиса, должны быть решительными и срочными. Прежде всего следует с осторожностью относиться к судьбе подозрительной на фаголизис ферментации, чтобы не способствовать дальнейшему распространению фага.

Для быстрого выявления фага большое значение имеет правильный выбор среды для титрования. При этом следует по возможности использовать не просто регламентные среды, но и конкретную партию среды, взятую для данной операции. Дело в том, что приготовленные из нестандартизованных компонентов (мелассы, например) среды могут существенно различаться наличием специфических кофакторов, необходимых для поддержания роста фагов.

После получения окончательного доказательства роли бактериофага в неудачной ферментации (совпадение неудачных операций с признаками фаголизисов, выделение фагов из производственных емкостей) проводят работы по «гашению» вспышки фаголизиса, включающие определенные мероприятия.

1. *Идентификация и классификация фага.* Выяснение пути попадания фага на производство (эндогенный или экзогенный мутант ранее встречавшегося фага или представитель новой семьи фагов, ранее не встречавшейся на производстве).

Эндогенное происхождение вирулентного фага — как мутанта профага в данном продуценте — требует замены продуцента (если такие мутанты возникают с высокой частотой) или временного введения другого, устойчивого к данному фагу продуцента (позволяет освободить производство от данного фага), или принятия иных мер (придание профагу свойства дефектности — для понижения вероятности возникновения жизнеспособных вирулентных мутантов).

2. *Поиск фагоустойчивого штамма в группе заранее отобранных запасных продуцентов* и при нахождении такого — немедленное введение его в производство.

3. *Анализ адсорбционных свойств вновь выделенного фага* (возможность выявления кофактора адсорбции, удаление которого из среды или связывание приведет к остановке роста фага).

Естественно, что сразу же по выявлении фаголизиса следует провести очистку (стерилизацию) оборудования с использованием физических и химических факторов (дезинфектанты типа хлорамина, УФ-излучение и др.).

В последнее время успехи генной инженерии позволяют создавать продуценты разных белков и метаболитов на основе *E. coli*. В связи с этим следует иметь в виду необходимость поддержания высоких стандартов санитарии и гигиены на предприятиях микробиологической промышленности. Известен факт часто выделения людьми, большими диарреями, высоких титров вирулентных фагов разных семей, активных на кишечной палочке. В условиях современного производства не следует упускать из виду и такие возможности попадания фагов на производство.

#### **9.11. БАКТЕРИОФАГИ В ГЕНЕТИКЕ И СЕЛЕКЦИИ ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРОДУЦЕНТОВ**

Значение бактериофагов для промышленности не исчерпывается только их отрицательной ролью как источников фаголизиса.

Разработка методов генетического анализа промышленных бактериальных продуцентов начинается, как правило, с поиска трансдуцирующих бактериофагов. Трансдукция — ценный метод изучения генетического контроля разных признаков, в том числе и промышленно важных. Изучение применимости к промышленным бактериям другого классического метода генетического анализа прокариотов — генетической трансформации — также часто начинается с попыток обнаружить фагообразование после обработки бактерий выделенной ДНК бактериофага (трансфекция).

Бактериофаги широко используют в качестве векторов для клонирования фрагментов ДНК и введения определенных генов в промышленные бактерии.

Некоторые белки фагов, как показано, обладают способностью стабилизировать другие белки, в том числе и те, которые синтезируются под контролем генов, клонируемых на плазидах и иных векторах в *E. coli* (например, белки эукариотического происхождения).

Бактериофаги могут служить зондами для испытания возможности и эффективности выражения генетического материала в гетерологичных условиях.

В некоторых случаях бактериофаги могут сами по себе представлять промышленное значение. Токсигенность некоторых бактерий обусловлена присутствием профагов. Очевидно, что повышение уровня продукции токсинов тем или иным способом — увеличением числа мест интеграции, клонированием соответствующих фаговых генов, может не только повысить продукцию токсина, необходимого для получения лечебного препарата, но и существенно повысить качество продукта, например, путем упрощения процедуры очистки.

Бактериофаги обладают генами, контролирующими синтез ферментов, разрушающих клеточную оболочку бактерий, слизистые капсулы. Эти ферменты представляют прекрасный инструмент в химии углеводов и могут использоваться в промышленных целях. Распыление бактериофагов в садах может способствовать

уменьшению поражаемости плодовых деревьев весенними заморозками: способствуют ликвидации центров кристаллизации льда, которыми являются обычно фитопатогенные бактерии определенных видов.

Некоторые бактериофаги дают столь высокий конечный выход, что могут представлять интерес как источники выделения чистой, гомогенной по составу и размерам ДНК (например, выход фага  $\phi$  Kz *P. aeruginosa* с одной чашки Петри составляет около  $10^{13}$  частиц, при молекулярной массе ДНК одной частицы около 210 Мд). ДНК ряда бактериофагов, выпускаемых на коммерческой основе, используется в молекулярной биологии в качестве стандарта молекулярной массы.

Бактериофаги используются в терапии раневых, ожоговых и некоторых кишечных инфекций; эти фаги также получают в промышленных масштабах.

Использование бактерий, инфицированных фагами, как источника специфических фаговых ферментов, имеющих иные свойства, нежели соответствующие бактериальные ферменты, также вошло в практику биотехнологии: ряд фаговых ферментов получают на коммерческой основе (полинуклеотидлигаза фага T4, фаговый лизоцим, ДНК-полимераза и др.).

#### **9.12. ОБЩЕБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ**

Прогресс в бактериофагии обусловлен прежде всего приложением к бактериофагам (в том числе фагам промышленных бактерий) принципов генетических исследований и сосредоточением усилий многих исследователей на изучении относительно небольшого числа фагов (лямбдоидные фаги, группа Т-четных фагов и др.), послуживших основными фаговыми моделями при разработке принципов молекулярной генетики. Исследование ряда модельных фагов достигло сейчас очень высокого уровня. Для некоторых из них полностью расшифрована нуклеотидная последовательность генома, установлены границы генов, определено положение многих мутаций в последовательности нуклеотидов, выявлены промоторы, операторы, терминаторы, определены возможные рамки считывания и соответствующие им белковые продукты и т. д. Вместе с тем продолжается выявление и новых фагов. Некоторые из них становятся удобными моделями для решения определенных проблем. Например, липидсодержащие бактериофаги используют как модель для изучения структуры мембраны; бактериофаги, геном которых представлен несколькими фрагментами РНК, служат хорошей моделью при изучении некоторых сторон репликации вирусов с такими же геномами; бактериофаги-транспозоны — прекрасная модель в изучении механизмов транспозиции, играющих существенное значение в канцерогенезе, эволюции и т. д.

Найдены фаги с уникальным способом укладки ДНК в капси-

де в виде ниток на шпулке. Детальное изучение механизма такой укладки может дать принципиально новые сведения о взаимодействии белков и ДНК в ходе компактизации и в этом смысле может быть полезным для моделирования структуры хромосом эукариот.

Важно отметить, что многие, с этой точки зрения перспективные фаги выделены при изучении бактерий, используемых в промышленности или имеющих значение для медицины.

\* \* \*

В представленной главе были рассмотрены некоторые вопросы, связанные с ролью бактериофагов в промышленности как фактора, понижающего эффективность производства (фаголизисы), как факторов, способствующих генетическому исследованию бактерий-продуцентов, и как модельных организмов при изучении фундаментальных биологических явлений.

Очевидно, что универсального способа борьбы с фаголизисами не существует. Однако постоянная, систематически проводимая работа по выделению бактериофагов, исследованию их свойств быстрое внедрение фагоустойчивых штаммов бактерий могут стать основой производства, свободного от фаголизисов.

## **Глава 10 ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

Клетки микроорганизмов — неиссякаемый источник ферментов. Они способны выполнять самые тонкие реакции и сложнейшие многостадийные синтезы. Такие процессы не всегда могут быть воспроизведены путем химического синтеза. Кроме того, химические методы в ряде случаев уступают микробиологическим по эффективности, так как имеют больше стадий, происходят в агрессивных средах под высоким давлением и дают низкий выход. Можно отметить еще одно качество микроорганизмов — удивительную стабильность их ферментатов в закрепленном (иммобилизованном) состоянии. Имобилизованные тем или иным способом клетки микроорганизмов удается использовать для проведения трансформации или биосинтеза ряда соединений в течение нескольких месяцев и даже лет. Следует напомнить, что в природе, а именно в почвах, в илах, в горных породах, на поверхности растений микроорганизмы в основном существуют в закрепленном состоянии. Еще 150 лет тому назад Шутценбах в Германии использовал закрепленные на буковой стружке бактерии для производства уксуса. Особое внимание привлекли иммобилизованные клетки в конце 60-х — начале 70-х годов XX столетия.

На десятилетие раньше начались работы по иммобилизации ферментов. Закрепление глюкозоизомеразы, аспартазы, пенициллинамидазы и многих других ферментов на носителях привело к значительной стабилизации их активности. В иммобилизованном виде были получены и сложные, полиферментные системы. Но необходимость добавления кофакторов и частичной очистки ферментов приводит к увеличению относительной себестоимости осуществляемых реакций. В настоящее время лишь несколько процессов с использованием иммобилизованных ферментов имеют крупномасштабное применение.

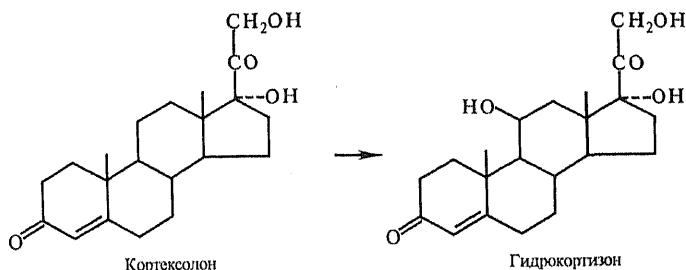
1. Получение 6-аминопенициллановой кислоты с помощью иммобилизованной пенициллинамидазы (СССР, Япония, Финляндия).

2. Получение глюкозо-фруктозных сиропов с использованием иммобилизованной глюкозоизомеразы (США, Великобритания, Голландия, Финляндия, Дания, Япония).

3. Разделение рацемических смесей аминокислот с использованием иммобилизованной аминокислотазы (Япония).

4. Получение безлактозного молока с использованием иммобилизованной лактазы (СССР, США, Италия). В большинстве случаев это непрерывные процессы, протекающие в колонках. Производительность 1 кг иммобилизованной глюкозоизомеразы составляет 600—6000 кг, активность снижается на 50 % через 20—70 сут.

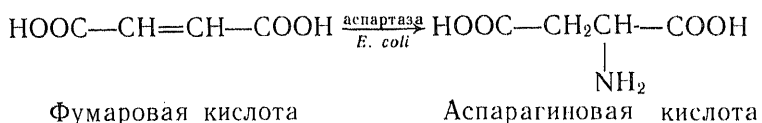
В период активного изучения иммобилизованных ферментов было показано, что соответствующие клетки микроорганизмов также могут во многих случаях осуществлять одностадийные и многостадийные процессы. В 1970 г. Мосбах с соавт. (Швеция) опубликовал результаты изучения возможности проведения такого сложного, НАД-зависимого процесса, как гидроксирование стероидов с помощью иммобилизованного в полиакриламидный гель (ПААГ) мицелия гриба *Curvularia lunata*.



В 1974 г. Скрябин с соавторами (СССР) показал, что процесс 1,2-дегидрирования стероидов и НАДН-зависимые процессы их 11 β-гидроксирования и 20 β-восстановления осуществляют живые иммобилизованные клетки микроорганизмов.

Японская фирма Танабэ Сейяко осуществила в 1974 г. промыш-

шленный синтез аспарагиновой кислоты с использованием иммобилизованных клеток *Escherichia coli* и показала преимущества этого метода перед синтезом аспарагиновой кислоты с помощью иммобилизованной аспартазы или свободных клеток:



Анализ имеющегося экспериментального материала позволяет говорить об определенных преимуществах использования иммобилизованных микроорганизмов перед иммобилизованными ферментами и свободными клетками.

1. Отсутствие затрат на выделение и очистку ферментов.
2. Уменьшение затрат на выделение и очистку продуктов реакции, которые отделены от биомассы или фермента.
3. Более высокая ферментативная активность (в некоторых случаях) и высокая стабильность ферментов в иммобилизованных клетках.
4. Возможность создания непрерывных и полунепрерывных автоматизированных процессов при промышленном производстве.
5. Способность к длительной регенерации кофакторов (при использовании живых иммобилизованных клеток).

Известны и трудности при использовании иммобилизованных клеток: наличие в некоторых случаях побочных процессов, а также дополнительного диффузионного барьера для субстрата и продукта, которым являются клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана. Однако эти трудности преодолимы, более того, именно при иммобилизации появляются новые возможности для направленного изменения ферментативной активности микроорганизмов и ее увеличения по сравнению со свободными клетками.

Для иммобилизации применяют микроорганизмы различных таксономических групп: живые клетки, а также мертвые (ацетоновые препараты) и в различной степени поврежденные (замороженные, высушенные, обработанные органическими растворителями и др.). Иммобилизованными могут быть не только вегетативные клетки, но и споры микроорганизмов. Выбор состояния клеток и способа иммобилизации обусловлен задачей исследователя, т. е. тем, какой процесс необходимо осуществить — одностадийный или полиферментный, требующий наличия одного или нескольких кофакторов. Одностадийные процессы во многих случаях могут осуществлять поврежденные клетки. Часто при этом возникает необходимость увеличения проницаемости клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. Именно это обуславливает необходимость воздействия на такие микроорганизмы токсичными органическими растворителями (толуолом, ацетоном) либо бифункциональными реагентами (например, глутаровым альдегидом).



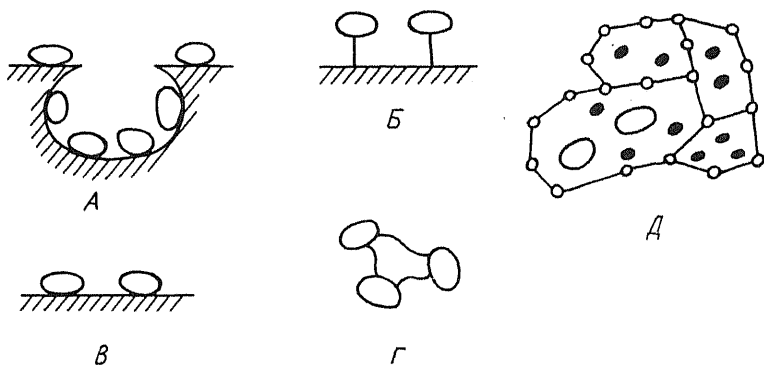


Рис. 10.1. Схемы различных методов иммобилизации клеток микроорганизмов. А — адсорбция на крупнопористом носителе; Б — ковалентное связывание; В — адсорбция; Г — поперечная сшивка; Д — включение в полиакриламидный гель

Полиферментные процессы трансформации и биосинтеза более эффективно осуществляют живые клетки, способные регенерировать кофакторы. Поврежденные клетки и экзогенные кофакторы применяют для этого лишь в некоторых случаях.

Выбор метода иммобилизации также зависит от реакции или процессов, которые будут осуществлять клетки. В целом для иммобилизации клеток микроорганизмов используют те же методы, что и для иммобилизации ферментов — адсорбцию, ковалентное и поперечное связывание, включение в гели (рис. 10.1). Ковалентное и поперечное связывание применяют чаще для мертвых или поврежденных клеток. Носители используют природные и синтетические, способные обеспечивать необходимые процессы и параметры.

1. Высокую активность и стабильность системы.
2. Высокое качество получаемого продукта.
3. Низкую стоимость иммобилизации.
4. Сохранение механической прочности носителя в течение длительного времени.
5. Возможность автоматизации процессов иммобилизации, ферментации и выделения продуктов реакции.

Иммобилизованные клетки применяют при проведении непрерывных и полунепрерывных процессов, что облегчает их автоматизацию, позволяет использовать реакторы различного типа, например непрерывные реакторы с вытеснением (колонки с подачей раствора сверху без перемешивания), реакторы с перемешиванием и продуванием воздуха (периодические и непрерывные), пластинчатые реакторы и др.

В настоящее время иммобилизованные клетки микроорганизмов в промышленном масштабе используют при получении аспарагиновой и яблочной кислот (Япония, Китай, США), фенол-

аланина (США), 6-аминопенициллановой кислоты (Япония), фруктозы и фруктозо-глюкозных сиропов из различного сырья (США, Италия), в виноделии (Дания, Голландия, Франция), в пивоварении (СССР, ЧССР) и в ряде других процессов (табл. 10.1).

В СССР разработаны и испытаны на пилотных установках такие процессы, как разделение рацематов аминокислот, получение 6-аминопенициллановой, аспарагиновой и яблочной кислот, превращение гидрокортизона в преднизолон.

**Т а б л и ц а 10.1. Технологические процессы с использованием иммобилизованных клеток микроорганизмов**

Продукт	Носитель, метод иммобилизации	Фирма, организация	Промышленное или пилотное освоение
Аспарагиновая кислота	ПААГ, каррагинан + ГА + ГМДА, ПААГ + полиазетидин	Танабе Сейяку (Япония) США	Пром. Пром. Пром.
Аланин	ПААГ + керамика	Минвуз СССР	Пил. у.
Фениланин	ПААГ	Танабе Сейяку (Япония)	Пром.
Гидролиз рацематов аминокислот	Ковалентное связывание + ПААГ	Purification Engineering (США) ЧССР	Пром. Пром.
Яблочная кислота	ПААГ	Минхимпром СССР	Пром.
Глюкозо-фруктозный сироп	ПААГ, Каррагинан + ГА + ГМДА карагинан	Танабе Сейяку (Япония) Минвуз СССР	Пром. Пром.
Гидролиз лактозы	Ковалентное связывание + адсорбция	Ново-Индастри (Дания)	Пил. у. Пром.
Пивоварение	Волокна из триацетата целлюлозы	Снам Проджетти	Пром. Пром.
Этанол	Ковалентное связывание	Биотика (ЧССР)	Пром.
Акриламид	Адсорбция на кольцах Рацига	Минпищепром СССР	Пром.
Преднизолон	Ковалентное связывание + адсорбент	Биотика (ЧССР)	Пром.
	Кальций-альгинат	Кюова Хакко (Япония)	Пром.
	Фотопоперечносшитые полимеры		
	ПААГ	ИБФМ АН СССР ВНИХФИ Минмедбиопром СССР	Пил. у.

Примечание. Пром. — промышленное освоение, Пил. у. — пилотные установки, ГА — глутаровый альдегид, ГМДА — гексаметилендиамин, ПААГ — полиакриламидный гель.

## 10.1. МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

Расширение исследований в области использования иммобилизованных клеток позволит предложить новые микробиологические синтезы и усовершенствовать действующие процессы.

### 10.1.1. Адсорбция

Метод адсорбции был, как уже отмечалось, одним из первых, примененных для закрепления клеток. В качестве адсорбентов используют самые различные материалы, природные и синтетические, например керамику, уголь, песок, дробленые раковины, металлическую крошку, капрон, полиуретан (табл. 10.2).

При адсорбции главную роль играет ионное и электростатическое взаимодействие носителя и поверхности клеток. Однако сродство того или другого микроорганизма к адсорбенту во многих случаях непредсказуемо. Сам метод технологичен. Суспензия клеток смешивается с носителем, перемешивается несколько часов на качалке, лучше выдержать ее затем при 4 °С несколько часов, а затем тщательно отмыть носитель от невключившихся клеток. Положительными качествами метода адсорбции являются также следующие: относительная дешевизна носителей, отсутствие диффузионных затруднений и токсичного воздействия на микроорганизмы. Преимуществом неорганических адсорбентов, кроме того, можно признать устойчивость к воздействию микроорганизмов, стабильность объема при действии давлений и пото-

Т а б л и ц а 10.2. Применение адсорбированных клеток микроорганизмов

Процесс	Микроорганизм	Адсорбент
Глюкоза → глюконовая кислота	<i>Aspergillus niger</i>	Стекло, металл, пористые синтетические материалы
Холестерин → холестенон	<i>Nocardia erythropolis</i>	Стекло, кольца Рашига, керамические бусы
Сбраживание пивного сусла*	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Гидрокортизон → преднизолон	<i>Arthrobacter globiformis</i>	Целлюлоза, керамика
Азотфиксация	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Анионообменная целлюлоза
Синтез метана	Метанобразующие бактерии	
Получение биомассы	<i>Bacillus subtilis</i>	Уголь, асбест
Синтез тинамицина	<i>Streptomyces cattleya</i>	Частицы нержавеющей стали
Очистка сточных вод от красителей*	<i>Pseudomonas</i> sp.	
Очистка морской* воды от нефти	<i>Pseudomonas</i> sp.	Целит
Органические отходы → метан*	Ассоциации бактерий	Песок + створки мидий + уголь активированный
		Пенопласт
		Крупнопористая керамика

\* Крупномасштабное использование.

ка субстрата, высокую плотность. Но адсорбция может менять свойства микроорганизмов: размеры, морфологию и скорость размножения клеток, интенсивность некоторых биохимических реакций, что может оказывать положительное или отрицательное влияние на проводимый процесс.

Недостаток метода адсорбции — незначительная прочность удерживания клеток и ограниченное количество биомассы, адсорбируемой единицей носителя. Эти недостатки в значительной мере устраняются при использовании крупнопористых носителей (пористых стекол, керамики). К крупнопористым относятся материалы, имеющие адсорбционную поверхность более  $0,01 \text{ м}^2/\text{г}$ . Величина пор при этом должна в несколько раз превышать размер клеток. Показано, например, что для микроорганизмов, размножающихся почкованием, величина пор должна превышать размер клетки в 4—6 раз, а в случае адсорбции спор грибов с последующим прорастанием мицелия — в 12—16 раз. Именно использование такого рода адсорбентов позволило создать установку для переработки органических отходов с целью получения метана (в США такая установка действовала эффективно в течение 2 лет). Эффективно также использование адсорбированных клеток в процессах очистки сточных промышленных вод.

Оптимизация процессов очистки промышленных сточных вод возможна лишь при работе с иммобилизованными микроорганизмами. При этом используют подращивание микроорганизмов, их пространственное разобщение для направленного разрушения того или иного соединения с помощью подобранных или сконструированных штаммов. Например, с помощью специально селекционированной чистой культуры *Bacillus subtilis* 23/3, закрепленной на стекловолкне или глинистых минералах, успешно разрушается гексаметилендиамин (токсичное соединение в сточных водах предприятий, выпускающих анидные волокна). В очистных сооружениях устанавливают специальные каркасы с гибкими ершами из стекловолкна, на которых адсорбированы микроорганизмы. Такие системы обезвреживают нитропродукты, ароматические углеводороды и другие соединения в 2—10 раз быстрее, снижают себестоимость очистки, улучшают качество воды. Применение ершей из стекловолкна с адсорбированными клетками освоено в полупроизводственных биотенках объемом  $24 \text{ м}^3$ .

### 10.1.2. Ковалентное и поперечное связывание

Ковалентное присоединение микроорганизмов к носителям начали применять позднее других методов вследствие токсичности используемых реагентов, например, глутарового и других альдегидов, цианурхлорида и др. Рассматриваемый метод иммобилизации основан на образовании ковалентных связей молекул белков и других соединений клеточной оболочки микроорганизма с активированными бифункциональными реагентами носителями (табл. 10.3). Возможна предварительная обработка носителя,

Т а б л и ц а 10.3. Ковалентное привязывание целых клеток микроорганизмов\*

Процесс, фермент	Микроорганизм	Носитель
L-Гистидинаммоний-лиаза β-Галактозидаза	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>	Карбодимид + агароза Глутаровый альдегид + + альбумин
β-Галактозидаза	<i>Zygosaccharomyces lactis</i>	Сефарон + гексаметилендиамин
17β-Оксистероиддегидрогеназа	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	β-Аланин-NH <sub>2</sub> -сефарон
Спирт → уксусная кислота	<i>Acetobacter aceti</i>	Оксид титана
Окисление метана	Метаноокисляющие бактерии	Силохром, модифицированный изоцианатом

\* Все процессы проведены в лабораторном масштабе

например, карбодимидом, гексаметилендиамином с последующим привязыванием клеток. При этом исключается контакт с токсичным реагентом, активность клеток не снижается либо снижается в меньшей степени, сохраняется жизнеспособность клеток.

Такой метод предложен для проведения различных реакций трансформации, в том числе для использования микроорганизмов с β-галактозидазной и 17 β-оксистероиддегидрогеназной активностями. Для ковалентного привязывания дрожжевых клеток использовали оксиметакрилатный гель типа сефарон. Наличие доступных для практического использования синтетических носителей позволило применить метод ковалентного привязывания клеток в пивоваренной промышленности и для получения безлактозного молока (ЧССР).

Непосредственное привязывание клеток друг к другу с помощью бифункциональных или полифункциональных реагентов типа альдегидов или аминов относится к «химическому поперечному связыванию». Этот метод дает хорошие результаты для клеток, проводящих одностадийные процессы, например, с глюкоизомеразной, пенициллинамидазной и аминоксиллазной активностью. Колонка с поперечношитыми клетками *Streptomyces olivaceus* сохраняла глюкоизомеразную активность неизменной более 40 сут (при скорости протока 1,5 ч<sup>-1</sup>). Метод ковалентного связывания и поперечной сшивки живых клеток используется реже остальных методов иммобилизации.

### 10.1.3. Включение в гели

Метод включения клеток в полимеры различной природы имел и имеет в настоящее время наибольшее применение как в лабораторном, так и в промышленном масштабе. Используют при этом природные полимеры (каррагинан, агар, желатину, хитозан, коллаген, различные пектины) и синтетические (полиакриламидный гель, фоточувствительные полимеры, полиуретаны, поливи-

ниловый спирт и др.). В зависимости от их механических свойств и характера проводимого процесса полимеры могут использоваться в различной форме: гранул, мембран, волокон.

### 10.1.3.1. Полиакриламидный гель

Метод включения клеток в полиакриламидный гель (ПААГ) используется уже более 20 лет. В первых работах он рекомендовался как универсальный для многих микроорганизмов. Имеющиеся сейчас экспериментальные данные свидетельствуют о наличии отрицательного воздействия акриловых мономеров и в еще большей степени самого процесса полимеризации на жизнеспособность и ферментативную активность многих микроорганизмов. Поэтому в ряде случаев ПААГ заменяют Са-альгинатным гелем, каррагинаном и другими носителями. С другой стороны, следует отметить и преимущества геля: простота приготовления, относительная дешевизна, возможность включения клеток любого размера и заданное их количество, прочность фиксации клеток, прочность гранул на стирание и разрыв (свойство, необходимое для реакторов с перемешиванием). Уменьшить набухание геля можно путем его армирования каким-либо неорганическим носителем.

ПААГ является продуктом сополимеризации акриламида  $\text{NH}_2$   
|  
( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}$ ) и сшивающего агента N, N-метиленбисакриламида ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ). Реакция индуцируется химическим или фотохимическим путем: в первом случае в качестве катализаторов применяют персульфат аммония — тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), либо персульфат аммония — 3-диметиламинопропионитрил. При фотополимеризации катализаторами служат ТЕМЕД и рибофлавин при освещении видимым светом. Величина пор геля определяется концентрацией мономеров. Используют ПААГ, как правило, в форме гранул диаметром 1—5 мм.

Процесс полимеризации может оказывать значительное влияние на ферментативную активность клеток, как положительное, так и отрицательное. В тех случаях, когда должна быть изменена клеточная проницаемость, частичный положительный эффект достигается уже в процессе полимеризации. Он может быть усилен под действием различных факторов до и после полимеризации. К таким факторам воздействия на активность клеток, включенных в ПААГ, относятся: их тепловая обработка, замораживание и оттаивание, автолиз, обработка органическими растворителями, поверхностно-активными веществами, ультразвуком и др. Например, фумаразная активность автолизированных и иммобилизованных клеток *Brevibacterium ammoniagenes* в 19 раз превышала активность интактных свободных клеток и в 7,5 раза — активность интактных иммобилизованных клеток. При получении

яблочной кислоты из fumarовой как побочный продукт образуется янтарная кислота. Тепловая обработка, автолиз и замораживание — оттаивание клеток не были эффективным средством подавления побочной реакции. Обработка клеток желчным экстрактом не только повышала fumarазную активность, но и препятствовала образованию янтарной кислоты, подавляя побочный процесс.



С 1973 г. фирма «Танабэ Сейяко» (Япония) приступила к промышленному выпуску аспарагиновой и яблочной кислот на основе клеток бактерий, иммобилизованных в ПААГ. Процессы с растворимым или иммобилизованным ферментом либо со свободными клетками менее эффективны (рис. 10.2). Для промышленного производства, например, аспарагиновой кислоты, используют клетки *E. coli*, включенные в ПААГ. Иммобилизацию проводят в следующих условиях: 10 кг клеток (масса сырой биомассы) суспендируют в 40 л физиологического раствора, добавляют 7,5 кг акриламида, 0,4 кг метиленбисакриламида, 5 л 5 %-ного диметиламинопропионитрила и 5 л 2,5 %-ного персульфата калия; смесь оставляют при 40 °С на 10—15 мин. Образующийся гель разрезают на кубики размером 2—3 мм. Время полужизни (потеря активности на 50 %) такого препарата при 37 °С равно 120 сут (неиммобилизованных клеток — 2 сут). Полученными гранулами заполняют колонку. Раствор fumarата аммония (1 моль/л), содержащий 0,001 моль/л хлористого магния, пропускают через колонку с гранулами, при рН 8,5 и 37 °С скорость потока 0,6 об/ч. В стандартных условиях получают 2400 л элюата, доводят рН до 2,8 с помощью 60 %-ной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 90 °С, затем охлаждают до 15 °С и выдерживают 2 ч. Кристаллы аспарагиновой кислоты собирают центрифугированием и промывают водой. Перекристаллизация не нужна. Выход составляет 3048 кг (95% от теоретического). Процесс полностью автоматизирован.

Для сохранения клеток в жизнеспособном состоянии и проведения полиферментных процессов трансформации или биосинтеза необходимо учитывать следующие факторы: 1) концент-

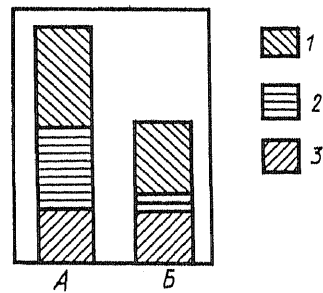


Рис. 10.2. Сопоставление затрат на промышленное производство L-аспарагиновой кислоты с помощью растворимого фермента и иммобилизованных клеток. А — периодический процесс, растворимый фермент; Б — непрерывный процесс, иммобилизованные клетки (компания «Танабэ Сейяко», Япония): 1 — топливо, труд и т. п., 2 — затраты на фермент и проведение реакции, 3 — материалы и субстрат

рацию мономеров и их соотношение, длительность контакта клеток с мономерами и длительность их нахождения в блоке геля; 2) температурный режим иммобилизации; 3) количество включаемой биомассы.

Рассмотрим действие этих факторов на примере клеток *Arthro-bacter globiformis* с 3-кетостероид- $\Delta^4$ -дегидрогеназной активностью. При увеличении концентрации мономеров с 10 до 20 % активность значительно снижается. По-видимому, это обусловлено как уменьшением размера пор, так и снижением количества жизнеспособных клеток вследствие повышения концентрации акриламида. При повышении температуры от 4 до 20 °С и длительности полимеризации от 5 до 20 мин ферментативная активность, ее стабильность и количество жизнеспособных клеток снижаются в три раза. В оптимальных условиях иммобилизации ферментативная активность сохраняется на уровне свободных клеток и весьма стабильна — период полужизни составляет 5 мес (или 160 трансформаций гидрокортизона в преднизолон). Полученные результаты позволили предложить эффективный способ получения преднизолона из гидрокортизона, который прошел полупромышленную проверку (в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР и во Всесоюзном химико-фармацевтическом институте им. С. Орджоникидзе).

### 10.1.3.2. Каррагинан

Поиски более экономичных и эффективных носителей для иммобилизации клеток микроорганизмов привели к полисахаридам природного происхождения. В результате был найден К-каррагинан (каппа-каррагинан) — полисахарид из морских водорослей, используемый как пищевая добавка. Полисахарид состоит из структурных единиц сульфата  $\beta$ -D-галактозы и 3,6-ангидро- $\alpha$ -D-галактозы. Молекулярная масса его 100 000—800 000.

Процесс полимеризации весьма прост: разогретый до 45 °С—48 °С каррагинан смешивают с суспензией клеток и дают затвердеть при охлаждении. Носителю можно придать форму частиц, шариков, мембран, волокон, трубок. Однако без дополнительной обработки механическая прочность его незначительна. Сшивка глутаровым альдегидом и обработка гексаметилендиамином резко повышает прочность носителя. Обработка повышает активность ферментов и стабильность одностадийных процессов, но снижает жизнеспособность клеток. Например, аспартазная активность клеток *E. coli*, включенных в каррагинан, после указанной обработки значительно стабилизируется: период полужизни увеличивается с 50 до 600 сут и более (колонки работали при 37 °С).

Использование каррагинана вместо ПААГ и клеток *Brevibacterium flavum* вместо *V. ammoniagenes* позволило в пять раз снизить стоимость получаемой яблочной кислоты. Этот метод с 1980 г. используется в промышленном масштабе (Япония).

Живые клетки микроорганизмов, введенные в каррагинан,



интенсивно размножаются в присутствии питательной среды и являются активной полиферментной системой, регенерирующей коферменты и необходимые ферменты.

#### Применение клеток микроорганизмов, включенных в каррагинан

Продукт	Микроорганизм
Этанол*	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Изолейцин*	<i>Serratia marcescens</i>
Сорбоза*	<i>Gluconobacter suboxydans</i>
Аспарагиновая кислота	<i>Escherichia coli</i>
L-Аланин	<i>Pseudomonas dacunhae</i> + <i>E. coli</i>
То же	<i>Pseudomonas dacunhae</i>
Фруктоза	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
Глутаминовая кислота	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Глутатион	<i>Sacch. cerevisiae</i>
$\alpha, \omega$ -Додекандикарбоновая и	<i>Candida tropicalis</i>
$\alpha, \omega$ -Тридекандикарбоновая кислоты	
Уксусная кислота	<i>Acetobacter aceti</i>

\* Живые клетки.

Процессы получения сорбозы, изолейцина и этанола осуществлены в лабораторном масштабе с помощью живых клеток в каррагинане. Оказалось, что микроорганизмы растут в таком геле с той же скоростью, что и свободные клетки, или с большей скоростью. Рост сосредоточен в приповерхностном слое геля, поэтому диффузионные эффекты незначительны, кислород и компоненты питательной среды хорошо потребляются. Метод нашел широкое применение в исследовательской практике, но процессы с применением живых клеток для проведения процессов биосинтеза пока не имеют промышленного применения.

#### 10.1.3.3. Альгинатные гели

Включение в альгинатные гели относится к мягким методам иммобилизации — клетки остаются живыми и могут осуществлять полиферментные процессы. Положительным качеством геля является возможность клеток размножаться в нем, а также его способность к растворению при изменении pH и температуры. Это позволяет выделять жизнеспособные клетки и облегчает изучение их свойств. Большим преимуществом Са-альгинатного геля являются его хорошие диффузионные качества. В этот гель могут быть включены лишь микроорганизмы и ферменты с очень большой молекулярной массой. Кислород, глюкоза, альбумин диффундируют в гель с той же скоростью, что и в водной среде.

Применение клеток микроорганизмов, включенных в альгинатный гель, весьма разнообразно. Механическая прочность шариков или волокон из альгината позволяет их использовать в непрерывных и периодических процессах.

## Применение клеток микроорганизмов, включенных в альгинатные гели

Процесс	Микроорганизм
Разложение фенола	<i>Candida tropicalis</i>
Получение этанола*	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Получение смеси спиртов (изопропанол, бутанол, этанол)	<i>Clostridium beijerinckii</i>
Получение ацетона и этанола	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
Трансформация гидрокортизона в преднизолон	<i>Arthrobacter globiformis</i>
Трансформация стерина до C <sub>19</sub> -стероидов	<i>Mycobacterium phlei</i>
Трансформация стерина до C <sub>22</sub> -стероидов	<i>Nocardia erythropolis</i>
Превращение кортексолона в гидрокортизон	<i>Curvularia lunata</i>
Получение L-кетокислот	<i>Trigonopsis variabilis</i>
Биосинтез инулазы	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Биосинтез пенициллина	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Биосинтез тилозина и никкомидина	<i>Streptomyces tendae</i>
Биосинтез агроклавина	<i>Claviceps purpurea</i>
Трансформация глицерина в диоксиацетон	<i>Gluconobacter suboxydans (+ Chlorella)</i>
Денитрификация	<i>Pseudomonas denitrificans</i>
Извлечение металлов из сточных вод*	<i>Alcaligenes eutrophus</i>
Азотфиксация	<i>Anabaena</i> sp.
В виноделии* (яблочная кислота → молочная кислота)	<i>Leuconostoc oenus</i>

\* Освоено в промышленном масштабе.

Во многих случаях включение клеток в альгинат приводит к лучшим результатам в сравнении не только с ПААГ, но и с каррагинаном и другими гелями (при синтезе агроклавина, пенициллина, гидроксилации прогестерона).

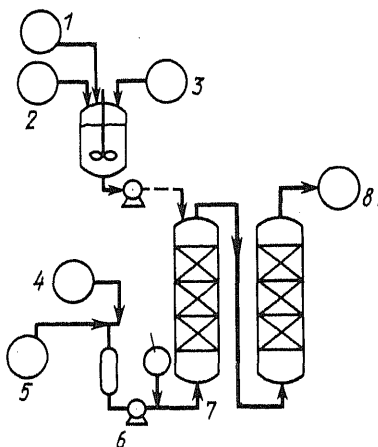


Рис. 10.3. Схема пилотной установки для получения этанола:

1 — стерин, 2 — дрожжи, 3 — альгинат, 4 — меласса, 5 — вода, 6 — воздух, 7 — ферментеры, 8 — продукт

Именно Са-альгинатный гель наряду с fotocувствительными полимерами использован в промышленном масштабе для синтеза этанола. Длительная жизнеспособность дрожжей в альгинате обеспечивается хорошей аэрацией в реакторе башенного типа и добавлением стерина прямо в гель. Альгинатные гранулы, содержащие дрожжи и приготовленные в асептических условиях с низким рН (4,0), обеспечивают отсутствие посторонних микроорганизмов в течение четырех месяцев. Производительность пилотной установки 33 г спирта · л<sup>-1</sup> геля · ч<sup>-1</sup>.

В сутки может быть получено 600 л чистого этанола с колонки объемом 1 м<sup>3</sup>. Выход спирта составлял 95 % от теоретического. Такая установка действует на фирме Киова Хакко в Японии с марта 1982 г. (рис. 10.3).

Представляет большой интерес возможность включения клеток растительных и животных тканей в Са-альгинатный гель и осуществление с их помощью процессов трансформации и биосинтеза. При этом биосинтез антрахинонов иммобилизованные растительные клетки осуществляют даже более активно, чем свободные. Фирма LKB (Швеция) рекламирует систему производства моноклональных антител, иммобилизованных в альгинате. Клетки в геле остаются жизнеспособными 180 сут. и синтезируют за это время 20 кг моноклональных антител.

#### 10.1.3.4. Фотопереносимые и уретановые полимеры

Фотопереносимые и уретановые полимеры пригодны для включения клеток, органелл и ферментов. Как исходные преполимеры, так и другие используемые реагенты не токсичны для клеток. Большим преимуществом является возможность варьировать гидрофильность этих полимеров. Метод весьма прост и состоит в следующем: фоточувствительный преполимер, например полиэтиленгликольдиметакрилат, расплавляют при 38—40°C, тщательно перемешивают с водной суспензией клеток и добавляют в кристаллическом виде инициатор реакции полимеризации — этиловый эфир бензоина, еще раз перемешивают и выливают на кварцевое стекло (ограниченное бортиками) для получения мембраны толщиной 0,1—0,2 мм. Смесь подвергают действию УФ излучения (254 нм в течение 3—4 мин). Образуется плотная мембрана, которую используют для мембранного реактора, или после измельчения мембраны — для периодического флуидизированного реактора. Метод весьма перспективен, особенно для живых клеток, органелл и лабильных ферментов.

Возможно включение живых вегетативных клеток и спор с последующим их размножением в геле в присутствии питательной среды. Мицелий, выросший в геле, как правило, имеет ферментативную активность на уровне свободного. Это показано для *Rhizopus nigricans* (11  $\alpha$ -гидроксилирование) и *Curvularia lunata* (11  $\beta$ -гидроксилирование). В последнем случае использование периодических инкубаций позволило сохранить неизменной активность в течение двух месяцев (50 трансформаций кортексолона в периодических условиях).

Синтез этанола также весьма успешно осуществляется дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, введенными в фоточувствительный полимер. Метод прошел 2-летнюю проверку на пилотной установке и используется в Японии с 1985 г. для промышленного производства спирта. Разработана и промышленная установка для получения мембран с клетками высокой производительности.

Бактерии рода *Athrobacter*, включенные в такие полимеры, начали применять для промышленного получения акриламида из акрилонитрила. Акриламид в дальнейшем может быть использован для приготовления гелей и отбеливания бумаги в промышленном масштабе.

Клетки микроорганизмов, иммобилизованные указанным способом, применяют также для реакций трансформации, проводимых в двухфазных системах (вода—органический растворитель). Такие условия используют для трансформации малорастворимых в воде соединений, например стероидов и эфиров ментола.

Кроме указанных выше применяют иные полимеры: различные целлюлозы, коллаген, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон и др. И в настоящее время продолжается поиск новых носителей с хорошими диффузионными и механическими качествами. Используются комбинации различных методов иммобилизации, например, адсорбция и включение в гель, а также другие приемы, позволяющие улучшить свойства носителей. Наиболее перспективными методами иммобилизации для живых клеток можно признать следующие: адсорбция на крупнопористых неорганических носителях и включение в Са-альгинатный гель, фоточувствительные полимеры, каррагинан и полиакриламидный гель.

Для поврежденных клеток наиболее перспективными методами представляются применение ковалентного связывания с активированными носителями и включение в каррагинан. Однако

**Таблица 10.4. Активность и стабильность иммобилизованных ферментов и клеток, включенных в каррагинан и полиакриламидный гель (по данным Чибата с соавт., 1979)**

Фермент или микроорганизм	Фермент, активность, выход, %		Операционная стабильность		
	полиакриламид	каррагинан	температура, °С	период полужизни, сут	
				ПААГ	каррагинан
Аспартаза	29	46	37	20	—
Глюкозо-изомераза	12	69*	60	5	120
<i>Escherichia coli</i> (аспартаза)	29	33*	37*	120	686*
<i>Streptomyces phaeo-rotogenes</i> (глюкозо-изомераза)	57	59*	60	150	289*
<i>Brevibacterium am- niogenes</i> (фумараза)	60	60*	37	53	75
<i>Brevibacterium flavum</i> (фумараза)	34	51	37	72	70

\* Обработка глутаровым альдегидом и гексаметилендиаминном.

**Т а б л и ц а 10.5. Стабильность 1,2-дегидрогеназной активности *Arthrobacter globiformis* при трансформации гидрокортизона иммобилизованными клетками**

Метод иммобилизации	Количество циклов при 95% трансформации	Остаточная активность, % от исходной
ПААГ	200	44 через 180 сут
Са-альгинат	50	60 через 90 сут
Мембраны из поливинилового спирта	7	50 через 7 сут
Мембраны из фоточувствительных преполимеров	20	30 через 90 сут
Адсорбция на керамике	50	40 через 50 сут
Ковалентное связывание с активированным силикателем	2	50 через 3 сут

Примечание. Удельная активность во всех случаях равна активности свободных клеток.

ни один из методов иммобилизации не является универсальным для всех микроорганизмов.

Данные, приведенные в табл. 10.4 и 10.5, иллюстрируют роль носителей при создании разных биокатализаторов.

### **10.2 ОСОБЕННОСТИ ЖИВЫХ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ**

Выше уже отмечалось, что живые иммобилизованные клетки осуществляют как одностадийные, так и многостадийные процессы, даже сложнейшие процессы биосинтеза антибиотиков, ферментов и коферментов. В отличие от свободных клеток они подвергаются специфическим воздействиям уже на стадии иммобилизации. Особое влияние оказывает процесс полимеризации акриловых мономеров. Рассмотрим более детально особенности поведения клеток в полиакриламидном геле (ПААГ).

После включения в ПААГ в зависимости от условий иммобилизации микроорганизмы частично или полностью остаются жизнеспособными. Жизнеспособность определяется либо по количеству колоний, выросших на чашках Петри из клеток, выделенных из гранул, либо по количеству клеток, способных к делению в специальных микрокамерах с питательной средой. На рис. 10.4, А представлены микроколонии *Saccharomyces cerevisiae* после шести часов инкубации в микрокамере с питательной средой. В отдельных случаях о жизнеспособности судят по дыхательной активности или по подвижности клеток.

Действие полимеризации на разные микроорганизмы различно. Например, при строгом соблюдении режима полимеризации: низкая температура, образование 10% геля в течение 5 мин с дальнейшим охлаждением при 4 °С, измельчением и тщательным отмыванием гранул от остатков мономеров, возможно сохранить

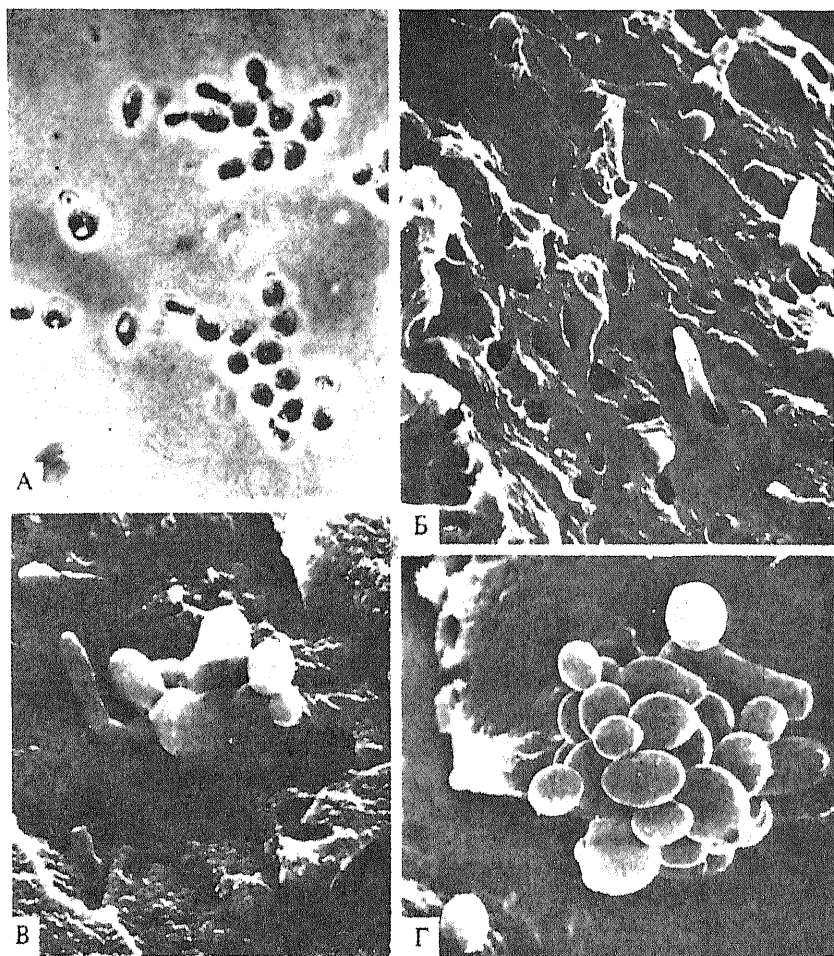


Рис. 10.4. Клетки *Saccharomyces cerevisiae* в микрокультуре и на поверхности ПААГ в непрерывных условиях («голодная» среда, трансформация секокетона). А — микрокультура через 7 ч инкубации в микрокамере ( $\times 600$ ); Б — клетки на поверхности геля сразу после иммобилизации ( $\times 5000$ ); В, Г — микроколонии дрожжей на поверхности геля через 8 и 9 сут ( $\times 50\ 000$ )

в жизнеспособном состоянии 85—90% клеток *A. globiformis* и 30—35% *Sacch. cerevisiae* ВКМУ-488. Эти данные свидетельствуют о большем токсичном действии процесса полимеризации акриловых мономеров на дрожжевые клетки.

После иммобилизации микроорганизмы распределяются в толще геля равномерно. В дальнейшем как в ходе трансформаций в «голодной» среде, так и при инкубации геля с клетками в питательной среде образуется активный приповерхностный слой; формирование последнего обусловлено доступом в гель

питательных веществ и кислорода. На «голодной» среде размножение клеток весьма незначительно и обусловлено наличием продуктов лизиса части клеток (рис. 10.4, В, Г). Тем не менее дрожжи могут активно делиться в течение двух месяцев при проведении, например, 17β-восстановления секостероида в «голодной» среде. Удельная дегидрогеназная активность живых клеток *A. globiformis* в ПААГ снижается в «голодной» среде в два раза через пять месяцев (после 160 трансформаций гидрокортизона в преднизолон). При этом через шесть месяцев в приповерхностном слое геля содержится много интактных клеток *A. globiformis*.

Активность и стабильность иммобилизованных систем с живыми клетками может быть повышена путем их периодической инкубации в питательной среде. В одних случаях достаточно 1—2 инкубаций, в других случаях используют частые (1 раз в неделю) инкубации с последующими трансформациями в «голодной» среде.

Таким образом, активность и стабильность иммобилизованных систем, используемых для проведения полиферментных процессов трансформации, регенерирующих не только необходимые ферменты, но и кофакторы, определяются преимущественно способом иммобилизации и природой носителя, условиями иммобилизации и возможностью инкубации в питательной среде, а точнее, возможностью сохранения клеток в жизнеспособном состоянии.

Именно жизнеспособные клетки осуществляют в иммобилизованном состоянии процессы биосинтеза различных органических соединений, в том числе органических кислот, антибиотиков, ферментов и др. (табл. 10.6 и 10.7).

Наиболее изученным следует признать процесс получения этанола, осуществляемый растущими клетками *Sacch. cerevisiae*. Лучшим из примененных носителей (ПААГ, каррагинан, агар, полиуретан) при производстве этанола оказался Са-альгинатный гель.

По данным электронно-микроскопических исследований, клетки растут в приповерхностном слое альгината. Для увеличения количества биомассы и продления срока жизни клеток в гель

**Т а б л и ц а 10.6. Биосинтез антибиотиков иммобилизованными клетками**

Антибиотик	Микроорганизм	Метод иммобилизации, носитель
Пенициллин	<i>Penicillium chrysogenum</i>	ПААГ, Са-альгинат
Бацитрацин	<i>Bacillus subtilis</i>	ПААГ
Кандицидин	<i>Streptomyces griseus</i>	Коллаген
Никкомицин и тилозин	<i>Streptomyces tendae</i>	Са-альгинат
Низин	<i>Streptococcus lactis</i>	ПААГ
Тинамицин	<i>Streptomyces cattleya</i>	Адсорбция на целите
Цефалоспорин	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	ПААГ и ПААГ-гидразид

Т а б л и ц а 10.7. Биосинтез ферментов иммобилизованными клетками

Фермент	Микроорганизм	Носитель
α-Амилаза	<i>Bacillus subtilis</i>	ПААГ
β-Лактамаза	<i>Escherichia coli</i>	ПААГ
β-Инулаза	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Альгинат
Протеаза	<i>Streptomyces sp.</i>	ПААГ
Целлюлаза	<i>Trichoderma reesei</i>	Каррагинан

при иммобилизации вводят стерилы или ненасыщенные жирные кислоты.

Биосинтез возможен не только на полноценных, но и на обедненных средах. Так, на безазотистой среде осуществлен с помощью клеток *Propionibacterium shermanii* в ПААГ такой многостадийный процесс, как пропионовокислое брожение.

В ходе непрерывных процессов биосинтеза возможна также импульсная подача среды различного состава. Такой вариант предложен для проведения бутанол-этанол-пропанольной ферментации.

Таким образом, живые иммобилизованные клетки являются активными и стабильно действующими системами. Очевидно, что при наличии подходящего носителя, т. е. носителя с хорошими физическими и механическими свойствами, клетки микроорганизмов могут нормально размножаться внутри полимера и частично в среде, окружающей носитель. Следовательно, такая система состоит из иммобилизованных и свободных клеток.

Не менее важной для биосинтеза, чем состав среды, является проблема аэрации. Лимит по кислороду возникает весьма часто при проведении аэробных процессов, осуществляемых иммобилизованными клетками. Для решения этой проблемы необходимо улучшать диффузионные качества носителя. Возможны и другие решения проблемы аэрации, например замена воздуха чистым кислородом (положительный эффект достигнут при образовании уксусной кислоты клетками *Acetobacter aceti* в каррагинане). Предложено использовать иммобилизацию клеток *Chlorella sp.*, выделяющих при фотосинтезе кислород, в комбинации с микроорганизмами, требующими значительного содержания O<sub>2</sub> (например, *Gluconobacter oxydans* + *Chlorella sp.* при окислении глицерина в диоксиацетон).

\* \*  
\*

Иммобилизованные клетки микроорганизмов — один из перспективных типов биокатализаторов; последние все шире применяют не только в области синтеза ценных органических соединений, но и при очистке сточных вод и воздуха от загрязне-



ния, для извлечения из них ценных веществ. Решение проблем биоэнергетики и азотфиксации также будет связано с применением иммобилизованных клеток. Поэтому необходимы глубокие знания особенностей взаимодействия носителей и клеток, физиологии клеточных популяций, развивающихся внутри носителей и в присутствии носителей. Проблема длительного поддержания клеток в жизнеспособном состоянии в ходе непрерывных и периодических процессов на «голодных» средах или в присутствии питательной среды — одна из главнейших задач настоящего времени. Не менее важна и интересна проблема иммобилизации клеток, сконструированных генной инженерией, сохранение их в активном, жизнеспособном состоянии после иммобилизации. Наконец, важны усилия технологов для успешной реализации фундаментальных исследований в этой области, для создания крупномасштабных экономических процессов.

## Получение биологически активных веществ и отдельных компонентов микробных клеток

### Глава 11 АНТИБИОТИКИ

Антибиотики (антибиотические вещества) образуются различными группами организмов (бактериями, грибами, высшими растениями, животными). История открытия первого антибиотика, нашедшего широкое применение в медицинской практике, связана с именем шотландского микробиолога А. Флеминга (1881—1955).

В научную литературу термин *антибиотик* был введен Ваксманом в 1942 г. Этот термин, несмотря на определенное несовершенство (дословно—против жизни), прочно вошел не только в научный лексикон, но и в повседневный обиход. Однако в само определение понятия «антибиотик» разные авторы вкладывают далеко неоднозначный смысл: от весьма расширенного до очень суженного толкования этого явления.

Нам представляется целесообразным дать следующее представление о понятии «антибиотик» (антибиотические вещества).

*Антибиотики — специфические продукты жизнедеятельности организмов или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (бактериям, грибам, водорослям, протозоа), вирусам или к злокачественным опухолям, задерживая их рост или полностью подавляя развитие.*

Специфичность указанных продуктов обмена состоит в том, что, во-первых, антибиотики в отличие от таких продуктов жизнедеятельности, как, например, спирты, органические кислоты, перекиси и некоторые другие, также подавляющих рост отдельных видов микроорганизмов, обладают высокой биологической активностью. Так, для подавления роста грамположительных бактерий (микрোকков, стрептококков, диплококков, и др.) требуется минимальная концентрация антибиотика эритромицина, равная всего 0,01—0,25 мкг/мл. Конечно, при таких ничтожно малых концентрациях спирта или органической кисло-

ты никакого ингибирующего бактерии эффекта быть не может. Во-вторых, антибиотические вещества обладают избирательностью биологического действия. Это означает, что не все организмы, находясь в контакте с антибиотиком, оказываются чувствительными к его действию. В этой связи микроорганизмы делятся на две группы: чувствительные к определенным антибиотикам и резистентные (устойчивые) к ним.

Одни антибиотики подавляют рост небольшого числа видов микроорганизмов, другие же угнетают рост многих видов микроорганизмов. Исходя из этой особенности антибиотиков, их разделяют на две группы: антибиотики узкого спектра действия и антибиотики широкого спектра биологического действия. К первой группе относятся бензилпенициллин (пенициллин G), новобиоцин, гризеофульфин и другие антилиотики, подавляющие рост ограниченного и небольшого числа видов или даже штаммов чувствительных микроорганизмов. Ко второй группе антибиотиков, обладающих широким спектром действия, относятся тетрациклины, хлорамфеникол, трихотецин и др. Антибиотики второй группы подавляют развитие многих (но не всех!) видов бактерий и крупных вирусов.

Образовавшиеся в процессе жизнедеятельности организмов антибиотики могут накапливаться внутри клеток их продуцентов и лишь в небольшом количестве выделяться в окружающую среду (грамидин С, эндомицин, нистатин и др.), могут содержаться как внутри клеток, так и выделяться в окружающую среду (ристомин, кандицидин) или преимущественно выделяться в среду и лишь частично содержаться в клетках продуцента (стрептомицин, тетрациклины, макролиды, новобиоцин и многие другие).

Итак, антибиотики — это действительно специфические вещества, образующиеся в процессе жизнедеятельности организмов. Они представляют собой *конечные продукты* метаболизма клеток. Особенность образования антибиотических веществ — наследственно закрепленный тип обмена веществ их продуцентов. Иными словами, каждый антибиотик может образовываться одним или несколькими, но вполне определенными штаммами (видами) микроорганизмов (в случае образования этих соединений микроорганизмами). Соответствующий вид (штамм) микроорганизма может синтезировать в процессе жизнедеятельности один или несколько определенных антибиотиков.

Указанная закономерность имеет большое и принципиальное значение для понятия самого процесса антибиотикообразования и для практики, связанной с поиском продуцентов новых антибиотиков, с их выделением.

Антибиотические вещества образуются не только в лабораторных условиях развития продуцентов этих биологически активных соединений. Они, как показано рядом авторов, образуются непосредственно при развитии микроорганизмов в почве. Впервые прямыми опытами Д. Г. Звягинцевым, К. А. Вино-

градовой и др.<sup>1</sup> было показано, что антибиотики могут образовываться непосредственно в почве. На примере *Streptomyces olivocinereus*, образующим люминесцентный антибиотик гелиомицин, были получены убедительные доказательства биосинтеза антибиотика непосредственно при развитии актиномицета в почве<sup>1</sup>.

Образуюсь в природных условиях, антибиотики сохраняются определенное время в почве и проявляют заметный экологический эффект, они служат средством адаптации для своих продуцентов. Одной из функций этих биологически активных веществ, образуемых клеткой, является их защитная роль в процессе борьбы за существование. Антибиотики выступают в качестве фактора антагонизма. Вместе с тем необходимо иметь в виду, что антагонизм среди микроорганизмов может проявляться не только в результате образования антибиотиков, но и благодаря другим факторам. Поэтому продуцирование антибиотических веществ — это лишь одна из форм проявления антагонистических взаимоотношений в мире микроорганизмов.

Значение образования антибиотиков в природных условиях показано в работе Хопвуда и Меррика, 1977. Они пишут: «...было много спекулятивных рассуждений по этому вопросу, и при этом делались прямо противоположные выводы. Образование антибиотиков в природных условиях, хотя бы в небольших концентрациях, не подлежит никакому сомнению. Адаптивный характер образования антибиотиков, по меньшей мере в большинстве случаев, является бесспорным, так как очень трудно найти адаптивно-нейтральные признаки при детальном изучении генетики популяций высших организмов. Углубление наших знаний по генетическому контролю продукции антибиотиков будет способствовать лучшему пониманию роли антибиотиков в природных условиях. Так, например, обнаружено, что большинство диких штаммов *Aspergillus nidulans* продуцирует пенициллин приблизительно в одинаковых концентрациях, однако у различных штаммов за это ответственны различные гены. Это свидетельствует в пользу адаптивного характера способности продуцировать антибиотик и поддерживать его биосинтез на определенном уровне»<sup>2</sup>.

Что касается роли антибиотиков в метаболизме собственных продуцентов, то на основании наших исследований, проведенных на кафедре микробиологии Московского университета с такими антибиотиками, как грамицидин С, новобиоцин, ристомицин, неомицин, аурантин и их продуцентами, а также результатов исследований других авторов, можно с достоверностью сказать, что антибиотики, являясь мощными физиологически активными соединениями, выполняют функцию регуляторов ряда ферментных систем продуцирующих их организмов.

<sup>1</sup> Звягинцев Д. Г., Виноградова К. А., Ефременкова Л. М. Микробиология, 1976, т. 45, в. 2, с. 337; Микробиология, 1978, т. 47, в. 5, с. 871.

<sup>2</sup> Цитировано по Гаузе Г. Ф. // Антибиотики. 1979, т. XXIV, № 2, с. 83.

К настоящему времени описано около 6000 антибиотических веществ, образуемых различными группами организмов и полученных в результате химической модификации основных структур ряда антибиотиков. Наибольшее число антибиотиков (более 3000) образуется актиномицетами. Описание новых антибиотических веществ, синтезируемых актиномицетами, продолжается. Достаточно указать, что за период 1965—1976 гг. освоен промышленный выпуск почти 40 новых антибиотиков, образуемых актиномицетами, в том числе адриамицин, алмамицин, бицикломицин, блеомицин, гелиомицин, карминомицин, оливомицин, уромидин и др.

Продолжающийся активный поиск новых антибиотиков, образуемых различными группами организмов, связан, с одной стороны, с тем, что многие антибиотические вещества находят широкое применение в медицине и ветеринарии в качестве химиотерапевтических препаратов, используются в различных отраслях народного хозяйства (пищевая промышленность, сельское хозяйство и др.), а также в научных исследованиях как реагенты, блокирующие реакции обмена веществ изучаемых организмов. С другой стороны, поиск обусловлен тем, что применение антибиотиков как лечебных препаратов в медицинской практике способствует появлению значительного числа резистентных форм микробов. Одним из методов борьбы с появлением и распространением устойчивых к антибиотикам форм микроорганизмов является применение новых антибиотических веществ, обладающих биологической активностью по отношению к резистентным формам.

Антибиотики — представители различных классов химических соединений — от довольно простых ациклических соединений до весьма сложных структур типа полипептидов и актиномицинов.

Благодаря разнообразному химическому строению антибиотические вещества обладают различным механизмом биологического действия, их можно подразделить на следующие группы:

1. Антибиотики, обладающие конкурентным действием в процессе метаболизма (пуромицин, D-циклосерин, актигназовая кислота).
2. Антибиотики, ингибирующие синтез клеточной стенки (пенициллины, бацитрацин, ванкомицин, цефалоспорины).
3. Антибиотики, нарушающие функции мембраны (полиены, вадиомицин, грамицидины, трихомицин и др.).
4. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез (обмен) нуклеиновых кислот.
  - А. Подавляющие синтез РНК (анзамицины, гризеофульвин, канамицин, неомицин, новобиоцин, оливомицины и др.).
  - Б. Подавляющие синтез ДНК (актиномицин Д (актиномицин C<sub>11</sub>), брунеомицин, митомицины, новобиоцин, саркомицин и др.).
5. Антибиотики-ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин, декоинин, саркомицин и др.).

6. Антибиотики, подавляющие синтез белка (бацитрацин, аминогликозиды, метимидин, тетрациклины, хлорамфеникол, макролиды и др.).
7. Антибиотики — ингибиторы дыхания (олигомицины, патулин, пиоцианин и др.).
8. Антибиотики — ингибиторы окислительного фосфорилирования (валиномицин, грамицидины, колицины, олигомицин и др.).
9. Антибиотики, обладающие антиметаболитными свойствами (антибиотические вещества, образуемые некоторыми видами актиномицетов и грибов). Эти соединения выступают в качестве антиметаболитов аминокислот, витаминов, нуклеиновых кислот. Известно более 50 антибиотиков, обладающих антиметаболитными свойствами (в их числе циклосерин).

### 11.1. ОБРАЗОВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ В ПРОМЫШЛЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Получение антибиотических веществ в промышленных условиях осуществляется в основном в результате биологического синтеза или путем химической модификации полученных в процессе биосинтеза молекул этих физиологически активных соединений. И лишь единичные антибиотики (например, хлорамфеникол) получают химическим синтезом.

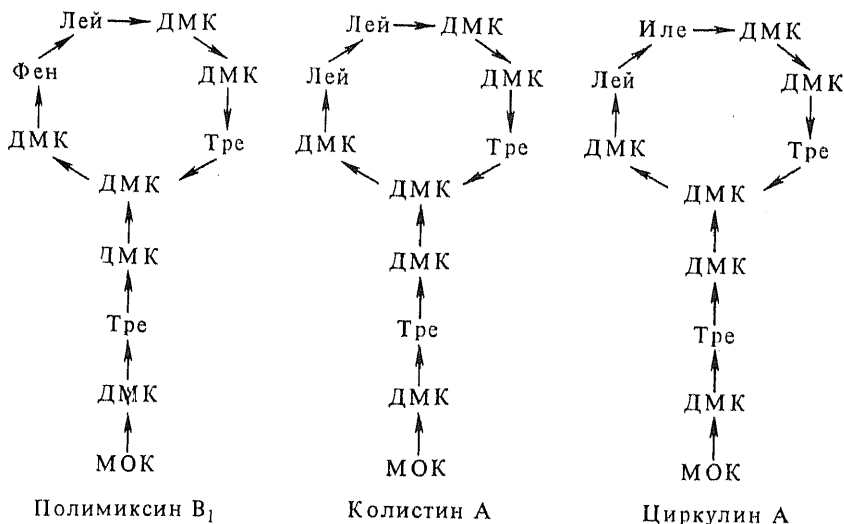
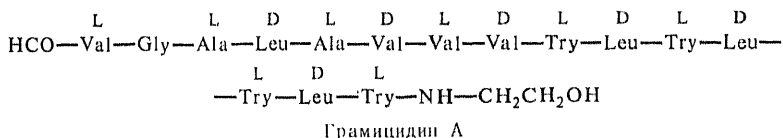
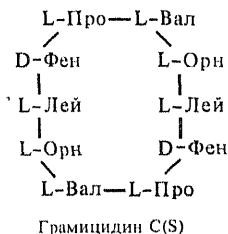
Продуцентами антибиотиков, выпускаемых промышленностью являются собственно бактерии, актиномицеты, мицелиальные грибы.

#### 11.1.1. Антибиотики, образуемые бактериями

К антибиотикам бактериального происхождения принадлежит около 600 наименований. Однако относительно небольшое число веществ выпускается промышленностью. Среди них можно назвать грамицидин С, образуемый *Bacillus brevis* var. G. В., полимиксины, продуцентами которых являются *Bac. polymyxa* и *Bac. circulans*; бацитрацины, синтезируемые *Bacillus licheniformis*; низины, продуцируемые культурой *Streptococcus lactis*.

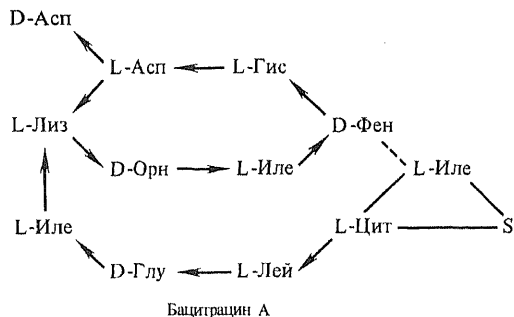
Особенностью антибиотиков бактериального происхождения является то, что они по своему химическому строению принадлежат к полипептидам (линейным или циклическим) и низкомолекулярным белкам. Один продуцент в процессе развития может образовывать несколько близких по химическому строению антибиотиков. Поэтому обычно имеют дело с группами антибиотиков, синтезируемых бактериями: *грамицидины*, которых известно пять форм (А, В, С<sub>D</sub>, С(S), D), отличающихся аминокислотным составом; *полимиксины* (включают 22 формы, в том числе А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub>, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, С, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, Е<sub>1</sub> (колистин А), Е<sub>2</sub> (колистин В), М, Р<sub>1</sub>, Р<sub>2</sub>). В состав полимиксинов наряду с аминокислотами входят диаминомасляная и метилоктановая (метилгептановая) кислоты. *Бацитрацины* объединяют десять индивидуальных антибиотиков (А,

A<sub>1</sub>, B, C, D, E, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> и G). Низин, образуемый молочнокислым стрептококком, входит в состав семи основных белков. Однако лишь только он обладает биологической активностью. Низин составляет около 20 % от всех основных белков, синтезируемых стрептококком.



DMK — остаток α, γ-диаминомасляной кислоты; MOK — остаток 6-метилоктановой кислоты

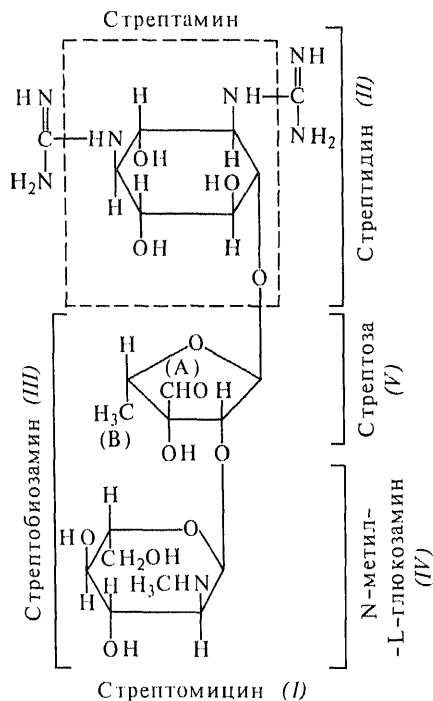
Обозначения: Лей — лейцин; Тре — треонин; Фен — фенилаланин; DMK — остаток α-γ-диаминомасляной кислоты; MOK — остаток 6-метилоктановой кислоты



### 11.1.2. Антибиотики, образуемые актиномицетами

Наибольшее число антибиотиков, нашедших широкое применение в практике и, следовательно, выпускаемых промышленностью, относится к биологически активным соединениям, образуемым актиномицетами.

К этим антибиотическим веществам относится ряд групп соединений, имеющих разнообразное химическое строение и широкий спектр биологического действия.

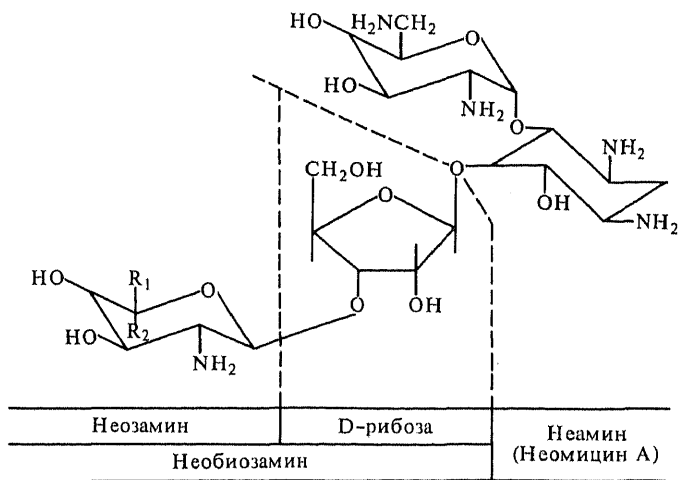


(A)  $\text{CHO} \rightarrow \text{CH}_2\text{OH}$  в дигидрострептомицине

(B)  $\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_2\text{OH}$  в гидроксистрептомицине

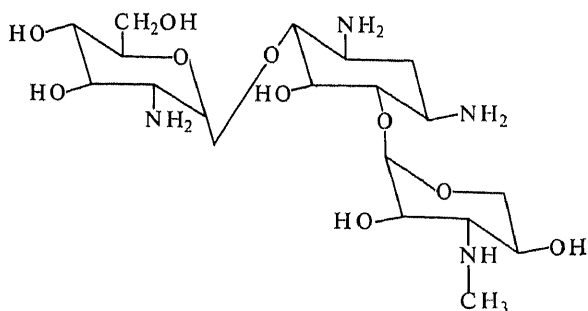


**1-я группа. Аминогликозиды.** В эту группу актиномицетных антибиотиков входят вещества, молекулы которых имеют гликозидные связи: стрептомицин, образуемый *Streptomyces griseus*; неомицины, продуцентами которых являются *Streptomyces fradiae*, *Str. albogriseolus*; канамицины, образуемые *Str. kanamyceticus*; гентамицины, образуемые *Micromonospora purpurea*; фортомицины, к которым относятся собственно фортомицин, образуемый *Micromonospora olivoasterospora*; спорарицин, продуцируемый *Saccharopolyspora hisuta* subsp. *kobensis*, саннамицины, продуцентами которых является *Str. sannanensis*, и некоторые другие вещества.

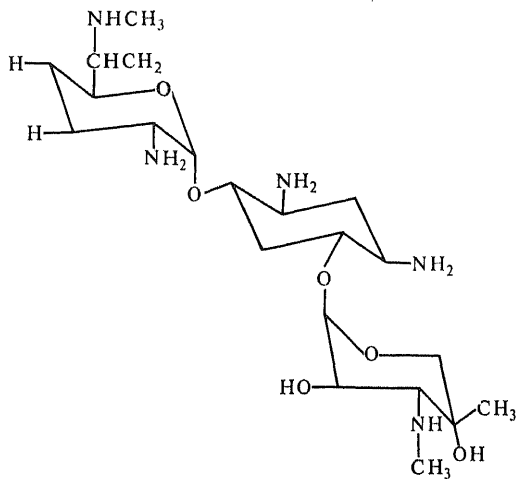


Неомицин В:  $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{CH}_2\text{NH}_2$

Неомицин С:  $R_1 = \text{CH}_2\text{NH}_2$ ;  $R_2 = \text{H}$

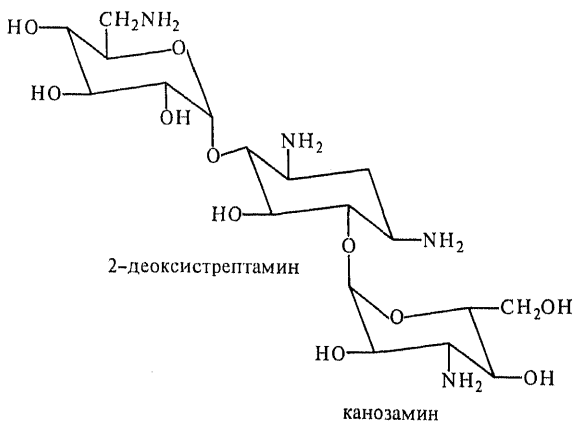


Гентамицин А



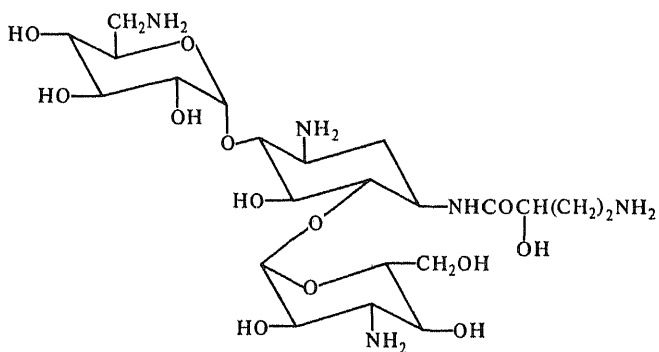
Гентамицин C<sub>1</sub>

*Канамицин* — противотуберкулезный антибиотик, он более активен, чем стрептомицин, по отношению к *Mycobacterium tuberculosis*.



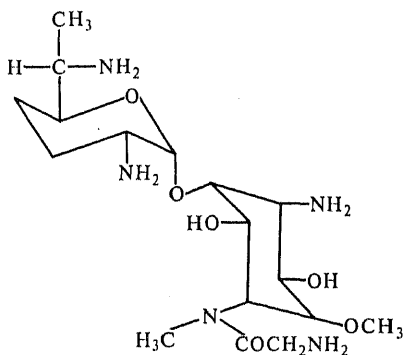
Канамицин А

В 1972 г. была получена химическая модификация канамицина — амикацин. Этот полусинтетический антибиотик подавляет рост патогенных бактерий как чувствительных, так и резистентных к канамицину, гентамицину и некоторым другим аминогликозидам.



Амикацин

**Фортимицины.** В 1976 г. из культуры *Micromonospora olivasterospora*, изолированной из почв окрестностей города Хиросимы, выделены антибиотики фортимицин А и фортимицин В, из которых первый обладает наибольшей антибиотической активностью, подавляет рост большинства грамотрицательных патогенных бактерий, устойчивых к другим аминогликозидам.



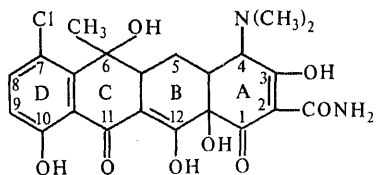
Фортимицин А

К фортимицинам относится и спорарицин — аминогликозид, образуемый новым и редким подвидом актиномицета *Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *kobensis*, выделенным в 1979 г. Спорарицин А имеет строение, аналогичное строению фортимицина А.

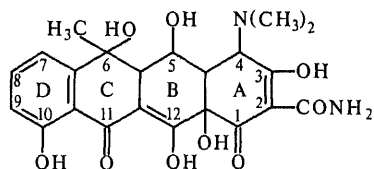
К этим антибиотикам принадлежат также саннамицин А и саннамицин В, образуемые культурой нового вида — *Streptomyces sannanensis*.

**2-я группа. Тетрациклины.** В группу тетрациклинов входит ряд соединений, имеющих близкое химическое строение и обладающих широким спектром антибиотического действия. К антибиотикам тетрациклинам относятся: хлортетрациклин, образуемый *Streptomyces aureofaciens*; окситетрациклин, синтезируемый

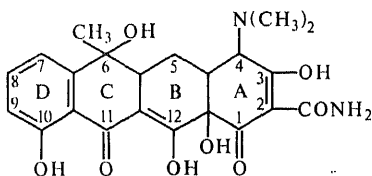
культурой *Str. rimosus*; тетрациклин, продуцентом которого являются определенные штаммы *Str. aureofaciens*.



Хлортетрациклин

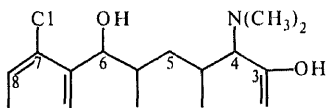


Окситетрациклин

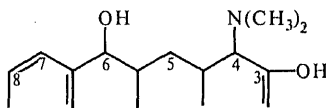


Тетрациклин

Мутантные штаммы *Str. aureofaciens* с нарушенным механизмом процесса переноса метильных групп могут синтезировать тетрациклиновые антибиотики, не содержащие в 6-м положении метильные группы. Такие антибиотики получили название деметилхлортетрациклин и деметилтетрациклин. Деметилсоединения могут быть получены и в процессе развития исходных штаммов *Str. aureofaciens*. Для этого в среду для культивирования актиномицета необходимо ввести вещества — антиметаболиты метионина — основного донора метильных групп молекулы тетрациклинов (этионин, *D*-норлейцин, *D*-метионин).



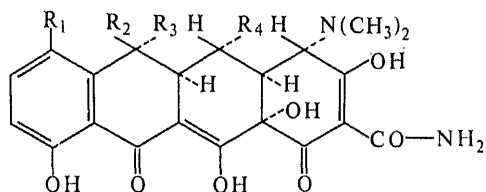
Деметилхлортетрациклин



Деметилтетрациклин

Тетрациклины, лишённые метильных групп, более устойчивы к действию кислот и щелочей по сравнению с метилированными гомологами.

Химическая модификация естественно образующихся тетрациклинов позволяет получать антибиотические препараты с изменёнными антимикробными свойствами. Так, в результате модификации молекулы окситетрациклина были получены новые формы антибиотиков: метациклин (рондомицин) и доксициклин, а в результате изменения молекулы 6-деметилтетрациклина получен миноциклин.



	Метациклин	Доксициклин	Миноциклин
R <sub>1</sub>	H	H	N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
R <sub>2</sub>	 CH <sub>2</sub>	H	H
R <sub>3</sub>	 CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	H
R <sub>4</sub>	OH	OH	H

Эти новые вещества, полученные в результате смешанного (биологического и химического) синтеза, обладают способностью подавлять рост ряда микроорганизмов, устойчивых к обычным тетрациклинам.

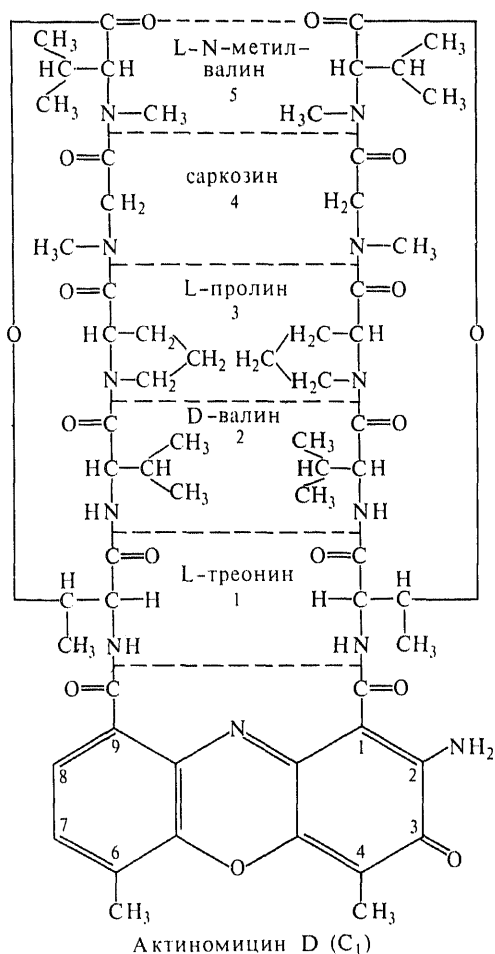
**3-я группа. Актиномицины.** Антибиотики актиномицины — большая (более ста препаратов) группа близких по химическому строению веществ, образуемых актиномицетами, относящимися к более чем 20 видам этих микроорганизмов, в том числе *Streptomyces antibioticus*, *Str. chrysomallus*, *Str. flavus*.

По химическому строению актиномицины относятся к хромопептидам, состоящим из общей для этих антибиотиков феноксазиновой хромофорной группировки и двух пентапептидов. Каждый полипептид содержит лактонный цикл, раскрытие которого приводит к потере биологической активности препарата.

Разнообразие актиномицинов связано с различным аминокислотным составом входящих в молекулу полипептидов.

У всех известных к настоящему времени актиномицинов в первом положении от хромофорной части молекулы находятся два остатка L-треонина. Наиболее лабильны второе и третье положения от гетероцикла. Во втором положении могут быть D-аминокислоты: D-валин (актиномицины А, В, С<sub>1</sub>, D) или D-аллоизолейцин (актиномицины С<sub>2</sub>, С<sub>3</sub>, E), или их сочетания (актиномицины (С<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>)). В третьем положении могут быть L-пролин (актиномицины С<sub>1</sub>, С<sub>2</sub>, С<sub>3</sub>, D и др.), гидроксипролин (актиномицины А, В), L-кетопролин (актиномицины А<sub>5</sub>, В<sub>5</sub>, X<sub>2</sub>), саркозин (актиномицины А<sub>2</sub>, В<sub>2</sub> и др.). В четвертом положении всегда два остатка саркозина и в пятом — два остатка L-N-метилвалина.

Вмешательство исследователей в биосинтез полипептидных группировок, связанное с изменением входящих в них аминокислот, дает возможность получить актиномицины, отличающиеся по своим свойствам. Ценными свойствами этой группы антибиотиков является то, что некоторые актиномицины обладают способностью задерживать рост злокачественных новообразований.



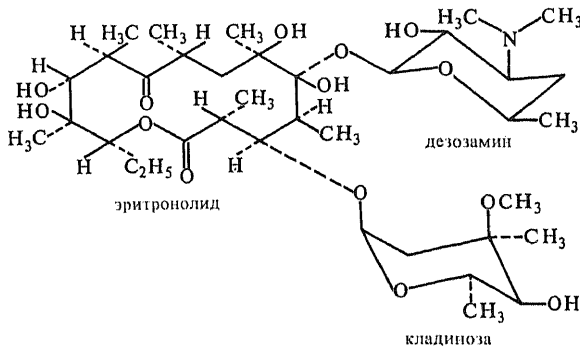
**4-я группа. Макролиды.** Антибиотики, относящиеся к макролидам, характеризуются наличием в молекулах макроциклического лактонного кольца, связанного с одним или несколькими углеводными остатками (обычно аминсахарами).

Группа объединяет значительное число соединений, среди которых наиболее известные эритромицин, магнамицин, олеандомицин и др.

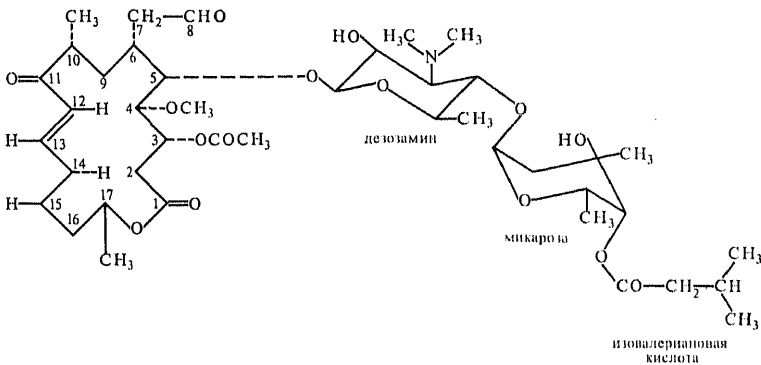
По биологическому действию макролиды можно разделить на две группы; антибиотики, подавляющие развитие грамположительных бактерий, и антибиотики, обладающие антигрибной активностью, но мало влияющие на рост бактерий. К первой группе относятся эритромицин, образуемый *Streptomyces erythreus*, олеандомицин (продукт *Str. antibioticus*), магнамицин, выделенный из культуры *Str. halstedii*, и др.; ко второй — филипин,

синтезируемый *Str. filipensis*, пимарицин, образуемый *Str. notalensis*, и др.

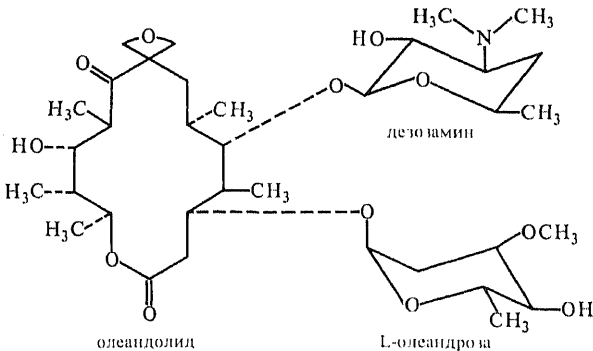
Антибиотики-макролиды подавляют рост ряда бактерий, устойчивых к пенициллинам, тетрациклинам, стрептомицину. Они преимущественно находят применение в качестве резервных антибиотиков при лечении ряда заболеваний, вызванных возбудителями, устойчивыми к другим антибиотикам.



Эритромицин



Магнамицин (карбамицин)



Олеандомицин

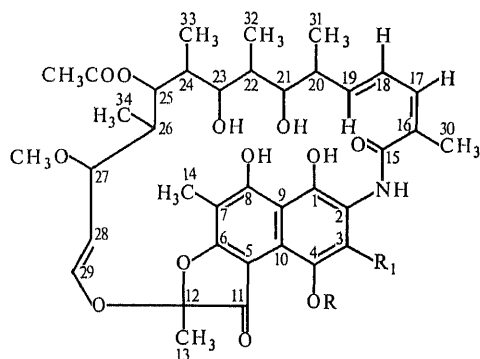
**5-я группа. Анзамицины.** Антибиотики, относящиеся к анзамидинам, образуются актиномицетами, нокардиями и некоторыми видами высших растений. Свое название эта группа антибиотиков получила от характерного строения их молекул. Соединения группы имеют ароматическое ядро и связанную с ним макроциклическую алифатическую цепь, которую называют анза-цепью (ansa в переводе с латинского означает ручка).

Следует подчеркнуть, что в отличие от макролидных антибиотиков анзамицины не имеют лактонных связей. Особенности строения этой группы антибиотиков определяют их своеобразные биологические свойства.

Анзамицины оказывают биологическое действие в отношении бактерий, некоторых вирусов и ряда эукариотов.

Среди известных природных анзамицинов можно назвать следующие: стрептоварицины (образуются культурой *Streptomyces spectabilis*); рифамицины, продуцируемые *Nocardia mediterranea* и некоторыми видами *Micromonospora*; толипомидины, образуемые *Str. tolypophorus*; галамицины, обнаруженные *Micromonospora halophytica*; майтанзиноиды, продуцируемые *Nocardia* и растениями вида *Mautenis, Colubrina*; нафтомицин, образуемый *Str. collinus*; гельданамицин, продукт жизнедеятельности *Str. hygrosopicus*.

Наибольший практический интерес имеют рифамицины, представляющие очень большую группу (около тысячи) природных и полусинтетических препаратов. Среди этих анзамицинов рифамицин SV («рифоцин»); рифампицин и рифамид — антибиотики широкого спектра действия; применяются в медицине.



Рифамицин SV («рифоцин»):  $R=H$ ;  $R_1=H$

Рифампицин:  $R_1= -CH=N-N$  (с циклическим ядром)  $-CH_3$ ;  $R=H$

Рифамид:  $R= -OCH_2CON(C_2H_5)_2$ ;  $R_1=H$

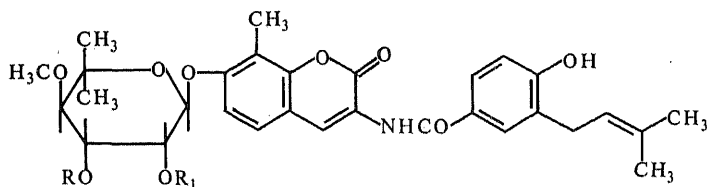
Рифампицин применяется в клинике в качестве ценного противотуберкулезного препарата. Он также эффективен в отношении



острых неспецифических стафилококковых инфекций. Антибиотик подавляет у чувствительных организмов бактериальную ДНК — зависимую РНК-полимеразу.

К антибиотикам актиномицетного происхождения, имеющим существенное практическое значение, необходимо отнести и новобиоцин.

**Новобиоцин.** Этот антибиотик образуется культурой *Streptomyces spheroides*. Он подавляет развитие грамположи-



Новобиоцин:  $R = -CONH_2$ ;  $R_1 = H$

Изоновобиоцин:  $R = H$ ;  $R_1 = -CONH_2$

Дескарбамилновобиоцин:  $R = H$ ;  $R_1 = H$

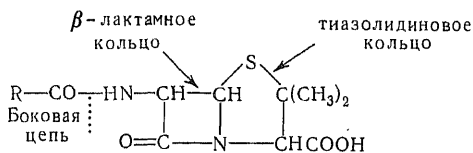
тельных и некоторых грамотрицательных бактерий. Ценное свойство антибиотика — активность против микроорганизмов, приобретших устойчивость к пенициллинам, стрептомицину, эритромицину, тетрациклинам, неомицинам.

Новобиоцин применяют при лечении различных форм пневмонии, энтерококков, флегмон, ангин, раневых инфекций.

### 11.1.3. Антибиотики, образуемые мицелиальными грибами

Мицелиальные грибы образуют относительно большое (около 1200) число антибиотических веществ. Наибольший интерес представляют пенициллины, цефалоспорины, гризеофульвин, трихотecin, фумагиллин и некоторые другие продукты жизнедеятельности грибов, используемые в медицинской и сельскохозяйственной практике.

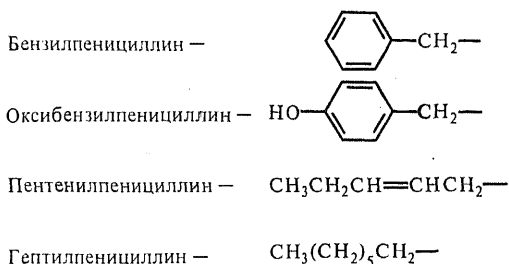
*Пенициллины* образуются определенными видами *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. nigricans* и др.) и некоторыми видами *Aspergillus* (*Asp. flavus*, *Asp. flavipes*, *Asp. nidulans* и др.). Основным организмом, применяемым для получения антибиотика, является *Pen. chrysogenum*. Гриб в процессе жизнедеятельности образует различные формы пенициллинов, отличающиеся строением боковой цепи молекулы антибиотика, биологической активностью и спектром противомикробного действия.



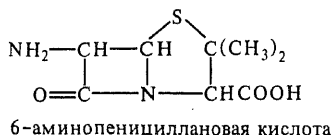
Общая структура молекулы пенициллина

Молекула пенициллина — это бициклическая структура, состоящая из  $\beta$ -лактамного и тиазолидинового колец, соединенная с определенной для каждого типа пенициллина боковой цепью.

В естественно образуемых пенициллинах (бензилпенициллин, оксibenзилпенициллин, пентенилпенициллин и гептилпенициллин) радикал (R) боковой цепи молекулы представлен различными соединениями:



В результате отщепления боковой цепи от молекулы пенициллина образуется 6-аминопенициллановая кислота, практически лишенная антибиотической активности:



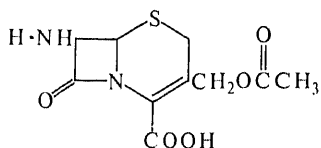
6-Аминопенициллановая кислота (6-АПК) служит основным продуктом для получения большого числа разнообразных полусинтетических пенициллинов, среди которых наиболее ценными препаратами признаны ампициллин, оксациллин, диклоксациллин, нафциллин, метициллин и карбенициллин.



рины не применяются в медицинской практике. Однако большое значение в химиотерапии имеют химически модифицированные аналоги природного цефалоспорина С. На его основе были получены тысячи полусинтетических цефалоспоринов, среди которых обнаружены высокоэффективные и практически ценные препараты (цефалотин, цефалоридин, цефалоглицин, цефалексин и др.).

Возможность получения большого числа полусинтетических цефалоспоринов обусловлена тем, что химическая модификация молекулы этого антибиотика может происходить по обеим боковым цепям (при С-7 и С-3).

Основным путем модификации молекулы цефалоспорина С является замещение 7-аминогруппы аминокадипильного радикала (в положении С-7) разнообразными ацильными радикалами. При этом исходным продуктом для химической модификации служит 7-аминоцефалоспоровая кислота (7-АЦК):

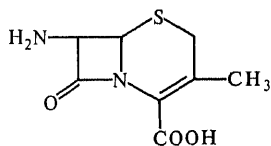


7-аминоцефалоспоровая  
кислота

Получение 7-аминоцефалоспоровой кислоты осуществляется в результате химической обработки цефалоспорина С путем превращения его под действием пятихлористого фосфора в легко гидролизуемый амнохлорид.

В положении С-3 производят замещения ацетоксигруппы различными заместителями.

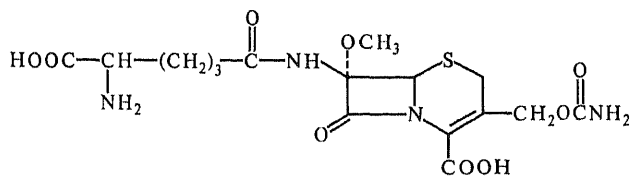
В результате гидрогенизации цефалоспорина С получают дезацетоксицефалоспорин С, из которого путем отщепления аминокадипильного радикала образуется 7-аминодезацетоксицефалоспоровая кислота (7-АДЦК):



7-аминодезацетоксицефалоспоровая  
кислота

7-АДЦК также служит основой для получения полусинтетических цефалоспоринов.

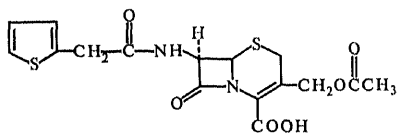
Близкий к цефалоспорину С антибиотик цефамицин С образует актиномицет *Str. clavuligerus*:



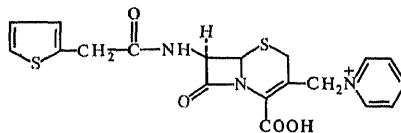
Цефамидин С

Цефамидин С обладает высокой биологической активностью по отношению к грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам, устойчив к действию  $\beta$ -лактамазы. На основе цефамидина С получен высокоэффективный полусинтетический препарат цефоксин.

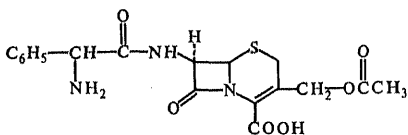
Наиболее ценными полусинтетическими препаратами, полученными на основе 7-АЦК, можно назвать цефалотин, цефалоридин, цефалоглицин и др.; на основе 7-АДЦК — цефалексин, цефрадин:



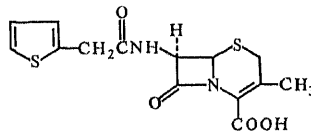
Цефалотин



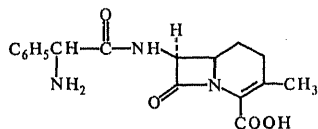
Цефалоридин



Цефалоглицин

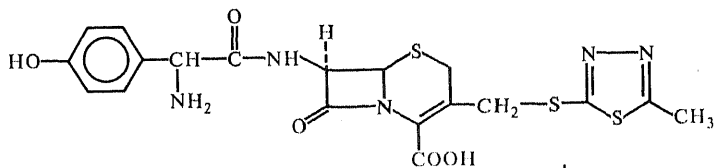


Цефалексин

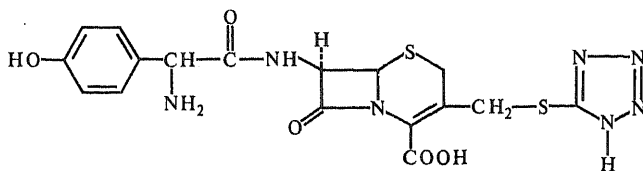


Цефрадин

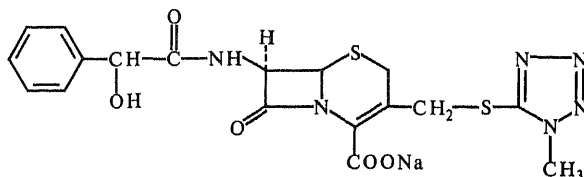
В последние годы получены новые химические модификации цефалоспоринов, среди которых большой практический интерес представляют цефепарол, цефатризин, цефамандол, цефакситин:



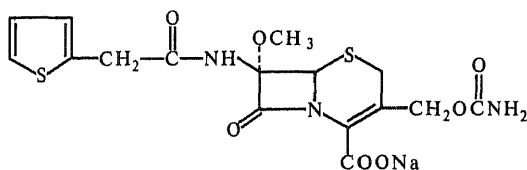
Цефепарол



Цефатризин

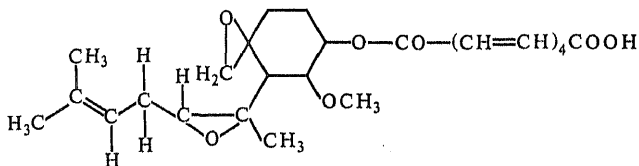


Цефамандол, Na-соль



Цефалексин, Na-соль

Фумагиллин — один из немногих грибных антибиотиков, относящихся к группе полиеновых соединений, характерной особенностью которых является наличие системы сопряженных двойных связей ( $-\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCH}=\text{CHCH}-$ ). Фумагиллин образуется культурой *Aspergillus fumigatus*:



Фумагиллин

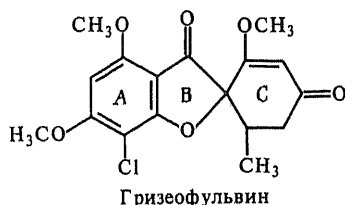
Антибиотик обладает способностью подавлять бактериофаги, стафилококки, некоторые виды амёб (*Entamoeba histolytica*), активен против *Nosema apis*, *Plasmodium gallinaceum*, но практически не действует на бактерии и грибы.

Фумагиллин применяется при лечении заболеваний, вызываемых амёбами, а также для профилактики ноземы пчел (возбудитель *Nosema apis*) и при лечении шелковичных червей.

Гризеофульвин — препарат, относящийся к группе кислородсодержащих гетероциклических соединений. Антибиотик обра-

зуется плесневыми грибами из рода *Penicillium*: *P. nigricans*, *P. urticae* (синоним *P. patulum*), *P. griseofulvum*.

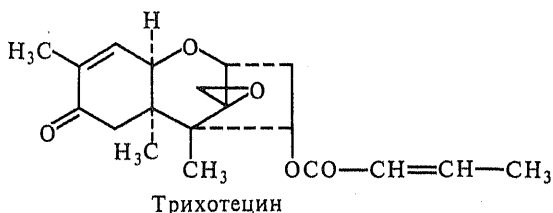
Это один из немногих природных соединений, образуемых микроорганизмами, который содержит в молекуле неионный связанный хлор. Среди таких соединений наряду с гризеофульфином можно назвать хлорамфеникол, хлортетрацилин, эрдин, геодин, калдармиоцин и некоторые другие.



Молекула антибиотика состоит из трех колец (А, В и С). Кольца А и В образуют кумариновую систему.

Гризеофульвин обладает высокой биологической активностью против грибов, в том числе и имеющих хитиновую оболочку. Это малотоксический препарат. Он оказывает хорошее влияние при лечении стригущего лишая, вызываемого грибом *Trichophyton rubrum*, ряда кожных заболеваний, болезней ногтей. Антибиотик — эффективный препарат для борьбы с мучнистой росой клубники, огурцов, с возбудителем увядания цитрусовых.

*Трихотецин* принадлежит к группе антибиотиков, содержащих в своем составе несколько О-гетероциклов. Этот антибиотик образуется вместе с розеином культурой гриба *Trichothecium roseum*, а также некоторыми видами несовершенных грибов.



Трихотецин обладает сильным антифунгальным действием, особенно против некоторых видов рода *Penicillium*. Он показал положительные результаты в ветеринарии при борьбе с болезнями сельскохозяйственных животных, вызываемыми патогенными грибами (трихофитоз крупного рогатого скота и пушного зверя), а также в растениеводстве против фитопатогенных грибов из рода *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*.

Трихотецин инактивируется ферментом трихотециназой, продуцируемым *Penicillium chrisogenum* и *Aspergillus niger*, в присутствии антибиотика.

## 11.2. ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ БИОСИНТЕЗА АНТИБИОТИКОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Известно, что микроорганизмы, выделенные из природных источников, обладают весьма низкой антибиотической активностью. Например, различные штаммы *Penicillium*, изолированные из почвы и других естественных субстратов, образуют пенициллин в пределах 10—30 ед/мл. Продукент стрептомицина (*Str. griseus*), выделенный из хорошо унавоженной почвы, образует не более 100 мкг/мл антибиотика. Примерно такого порядка активностями обладают и другие продуценты антибиотиков, выделенные из природы (так называемые дикие штаммы).

Разумеется, современная антибиотическая промышленность не могла бы работать с такими низкоактивными продуцентами. Да и стоимость антибиотиков была бы необычайно высокой, что резко ограничило бы использование их в медицинской практике и в сельском хозяйстве. В этой связи перед учеными была поставлена задача получить высокопродуктивные штаммы. Поставленная задача успешно решена.

В настоящее время в промышленности используются такие штаммы, которые образуют антибиотики на 2—3 порядка выше по сравнению с исходными, «дикими», продуцентами. Так, по данным Polinson (1974), получены штаммы *Penicillium chrysogenum*, образующие до 25 000 ед/мл пенициллина.

Каковы же основные способы, позволяющие значительно повысить биосинтетическую активность продуцентов антибиотиков? Можно назвать два основных способа:

1) получение из исходных штаммов новых генотипов микроорганизмов, обладающих повышенной активностью в отношении синтеза антибиотика;

2) подбор наиболее благоприятных для максимального образования антибиотиков условий культивирования отобранных мутантов.

Существуют, как известно, два процесса, способные вызывать новые генотипы микроорганизмов: мутационный процесс и процесс рекомбинации.

Мутация в сочетании с селекцией используется в качестве основного приема в улучшении штаммов микроорганизмов — продуцентов антибиотиков. Как правило, применяют комбинацию процесса мутации и селекцию, процесса рекомбинации и селекцию или же и того и другого вместе (мутации, рекомбинации и селекцию), так как одной селекцией невозможно решить указанную проблему.

Мутации получают в результате обработки исходного штамма сильнодействующими мутагенными факторами; вегетативные клетки или споры облучают рентгеновским и ультрафиолетовым излучением, обрабатывают клетки (споры) азотистой формой иприта, этиленимином и другими мутагенными веществами. Режим обработки подбирают такой, при котором большинство



клеток или спор погибают. У выживших клеток (спор) в этих экстремальных условиях могут возникнуть глубокие физиологические изменения, появиться новые генотипы. Наряду с вариантами, вообще потерявшими способность к биосинтезу антибиотика (их обычно бывает большинство), появляются формы с повышенной способностью антибиотикообразования.

Методами селекции выделяют наиболее активные варианты, которые вновь могут быть подвергнуты обработке мутагенными факторами. Такие операции повторяют несколько раз. В результате ступенчатого отбора удается получить мутанты, обладающие в несколько раз более высокой антибиотической активностью по сравнению с исходным штаммом.

Применение метода генетической рекомбинации так же дает возможность получать штаммы организмов, обладающие повышенным синтезом антибиотических веществ. Эти методы используют для получения высокоактивных продуцентов среди собственно бактерий, актиномицетов, мицелиальных грибов.

Существенное значение в увеличении выхода антибиотиков имеет подбор соответствующих условий культивирования выделенных мутантов. Под условиями культивирования понимают комплекс факторов окружающей среды, влияющих на развитие микроорганизма и определяющих его биосинтетическую активность (состав среды, степень ее аэрации, температура, значение активной кислотности (рН) и другие факторы).

При разработке (подборе) среды для культивирования необходимо уделять большое внимание формам источников азота, углерода, фосфора и других компонентов питания, их концентрации и соотношению в среде, наличию в субстрате (если это необходимо) соответствующих предшественников биосинтеза молекулы антибиотика, необходимых витаминов, микроэлементов и других веществ.

**Источники азота.** Для многих микроорганизмов-продуцентов антибиотических веществ легко усвояемыми формами азота служат аммонийные соли и аминокислоты; последние оказывают заметное влияние на метаболизм организмов. Связано это с тем, что аминокислоты принимают непосредственное участие в синтезе белков (структурных и ферментативных), полипептидов, в образовании ряда антибиотиков. Кроме этого, аминокислоты могут оказывать влияние на ферментные системы: индуцировать или распрессировать их образование, активировать или ингибировать их активность.

Однако ряд микроорганизмов образуют антибиотики лишь в том случае, если в среде присутствует азот в окисленной форме (в виде нитратов). К таким организмам можно отнести продуценты аурантина (*Streptomyces auranticus*), альбомицина (*Str. subtropicus*). Биосинтез пенициллина идет гораздо активнее, если в среде наряду с аммонийным источником азота присутствует нитрат.

В натуральных средах неопределенного состава, включающих

соевую муку, кукурузную муку, пшеничную муку, кукурузный экстракт и другие растительные или животные продукты, азот содержится преимущественно в форме белков, полипептидов и аминокислот.

**Источники углерода.** Источники углерода оказывают существенное влияние на метаболизм микроорганизмов и образование ими антибиотиков. Приведем примеры, показывающие значение источников углерода при биосинтезе некоторых антибиотиков.

Так, для производства пенициллина культурой *Penicillium chrysogenum* лучшим источником углерода является сочетание глюкозы и лактозы. Однако глюкоза может быть использована в этом процессе в качестве единственного источника углерода, если она будет вводиться в среду дробно небольшими порциями по ходу развития гриба.

Образование грамицидина С может происходить на относительно простой по составу синтетической среде, в состав которой в качестве источника углерода входят глицерин и янтарная кислота (янтарнокислый аммоний).

Лучшим источником углерода для развития продуцента стрептомицина и образования им антибиотика считается глюкоза. Некоторые штаммы *Str. griseus* не способны использовать сахарозу и рафинозу.

Продуцент неомицина *Str. fradiae* лучше развивается на синтетической среде с глюкозой, чем на среде, содержащей соевую муку. Однако образование антибиотика на синтетической среде примерно в 8 раз ниже, чем при развитии актиномицета на среде с соевой мукой.

Биосинтез хлортетрациклина происходит на высоком уровне в том случае, если *Str. aureofaciens* работает в среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу. Актиномицет может использовать также жиры, некоторые органические кислоты, крахмал, глицерин.

Для каждого продуцента антибиотика с целью наилучшего развития и высокого уровня образования антибиотика необходимо подбирать не только соответствующие источники углерода, но и их концентрацию в среде, правильные соотношения азота и углерода.

Например, для продуцента тетрациклина *Str. aureofaciens* концентрация глюкозы в среде, равная 50 мг/мл при содержании 2,4 мг/мл азота аммония, способствует хорошему росту актиномицета и высокому уровню биосинтеза антибиотика. Увеличение концентрации глюкозы до 80—85 мг/мл ингибирует рост актиномицета, а 26 мг/мл сахара не обеспечивает нормальный рост продуцента тетрациклина.

**Фосфор.** Огромное значение для роста микроорганизмов и образования ими антибиотиков имеет концентрация фосфора в среде.

Недостаток или избыток фосфора в среде резко сказывается

на обмене веществ микроорганизмов и, следовательно, на процессе биосинтеза антибиотика. Это особенно заметно проявляется на образовании таких антибиотиков, как тетрациклины, макролиды и некоторые другие, биосинтез которых связан с углеродным обменом.

Левитов и Бринберг<sup>1</sup> условно разделили продуценты антибиотиков в связи с их чувствительностью к концентрации фосфора в среде на три группы.

1. Высокочувствительные организмы, для которых оптимальная концентрация фосфора в среде составляет менее 10 мг% (продуценты тетрациклинов, нистатина, флоримицина, ванкомицина).

2. Организмы средней чувствительности, для которых оптимальная концентрация фосфора в среде составляет 10—15 мг% (продуценты стрептомицина, эритромицина, циклосерина, неомицина).

3. Малочувствительные организмы, для которых оптимальная концентрация фосфора равняется 18—20 мг% (продуценты новобιοцина, грамицидина С, олеандомицина).

Большое влияние на биосинтез антибиотиков оказывают и другие компоненты среды, в том числе сера, марганец, магний, железо, цинк, кобальт.

**Предшественники биосинтеза антибиотиков.** В ходе биосинтеза некоторых антибиотиков большую роль в увеличении их выхода оказывают так называемые предшественники биосинтеза — органические вещества субстрата, которые в процессе образования антибиотика тем или иным способом включаются в его молекулу без предварительного расщепления на отдельные фрагменты и последующего синтеза. Например, при образовании молекул пенициллина предшественниками выступают фенилуксусная кислота и ее производные.

**Аэрация среды.** Продуценты известных антибиотиков, образуемых микроорганизмами, — это аэробы, требующие для своего развития хорошо аэрируемых условий. Обеспечение культур микроорганизмов кислородом осуществляется в основном следующими способами: пропусканием воздуха через культуральную жидкость с одновременным ее перемешиванием; встряхиванием культуральной среды, находящейся в колбах, на специальных качалках; выращиванием микроорганизмов в виде пленки на поверхности питательной среды.

Из этих путей наиболее совершенен первый путь аэрации — продувание через среду воздуха с одновременным ее перемешиванием (метод позволяет регулировать степень аэрации и учитывать ее количественно).

Перемешивание культуральной жидкости способствует равномерному распределению питательных веществ и перемещению их к клеткам продуцента, способствует удалению от клеток

<sup>1</sup> Левитов М. М., Бринберг С. Л. // Антибиотики. 1967, 12, 11, С. 985.

микроорганизма продуктов обмена и лизиса, а также обеспечивает равномерное распределение кислорода в культуральной жидкости.

Степень аэрации культуры продуцента антибиотика должна коррелировать с составом среды. С повышением концентрации компонентов среды для развития продуцентов пенициллина, стрептомицина, новобиоцина, тетрациклиновых антибиотиков и других необходимо повышать степень аэрации среды.

Изменение степени аэрации приводит к изменению характера обмена веществ организма. Например, при ухудшении аэрации среды для развития *Str. aureofaciens* происходит повышение содержания в культуральной жидкости летучих органических кислот и снижение биосинтеза тетрациклина.

**Активная кислотность (рН) среды.** Большое значение на процесс развития продуцента антибиотика имеет значение рН среды. Многие виды собственно бактерий для своего развития предпочитают исходную кислотность среды (рН=7); актиномицеты лучше развиваются при начальном значении рН=6,7—7,5; большинство видов мицелиальных грибов развивается при слабокислой начальной реакции среды (рН = 4,5 — 5,0).

Для получения антибиотика в промышленных условиях среда для культивирования продуцента должна отвечать следующим требованиям; должна обеспечивать быстрый рост продуцента и высокий уровень биосинтеза антибиотика; быть дешевой по составу; не должна давать сильного вспенивания в процессе глубинного культивирования, обеспечивать хорошую фильтруемость в процессе выделения антибиотика.

В промышленных условиях обычно используют *натуральные среды неопределенного состава*, т. е. среды, в состав которых наряду с известными по химическому составу компонентами (глюкоза, сернокислый аммоний, NaCl и др.) входят продукты, как правило, растительного происхождения (соевая мука, кукурузный экстракт<sup>1</sup>, крахмал, гидрол<sup>2</sup>, жмыхи масличных культур и др.), имеющие неопределенный, непостоянный состав.

*Синтетические среды*, т. е. среды, содержащие вполне определенные химически чистые вещества в строго известных концентрациях, в промышленном получении антибиотиков не исполь-

<sup>1</sup> Кукурузный экстракт — продукт замочки кукурузного зерна в растворе 0,3% сернистого газа в течение 40—55 ч при температуре 50 °С с последующим упариванием полученного раствора.

В состав кукурузного экстракта входят (в % от сухого вещества):

общий азот . . . . .	6—8
аминный азот . . . . .	3—4
общая кислотность . . . . .	7—13
фосфор . . . . .	0,7—2,0
зола . . . . .	18—20

<sup>2</sup> Гидрол — густой темный сироп, содержащий от 65 до 70% редуцирующих веществ или около 50% сахаров (от общей массы гидрола). Сахара состоят в основном из глюкозы. Зольность гидрола не более 7%.

зуются. Они широко применяются при решении научных проблем, в исследовательской деятельности.

Таким образом, увеличение выхода антибиотиков (значительное повышение биосинтетической активности продуцентов) осуществляется двумя взаимосвязанными процессами: получением и выделением высокопродуктивных мутантов и разработкой наиболее благоприятных для образования антибиотика условий культивирования продуцентов.

### 11.3. ДВУХФАЗНЫЙ ХАРАКТЕР РАЗВИТИЯ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ

Процесс развития микроорганизмов — продуцентов антибиотических веществ, имеет, как правило, двухфазный характер (рис. 11.1).

**Первая фаза** развития (тропофаза, или фаза сбалансированного роста) характеризуется тем, что в культуре продуцента

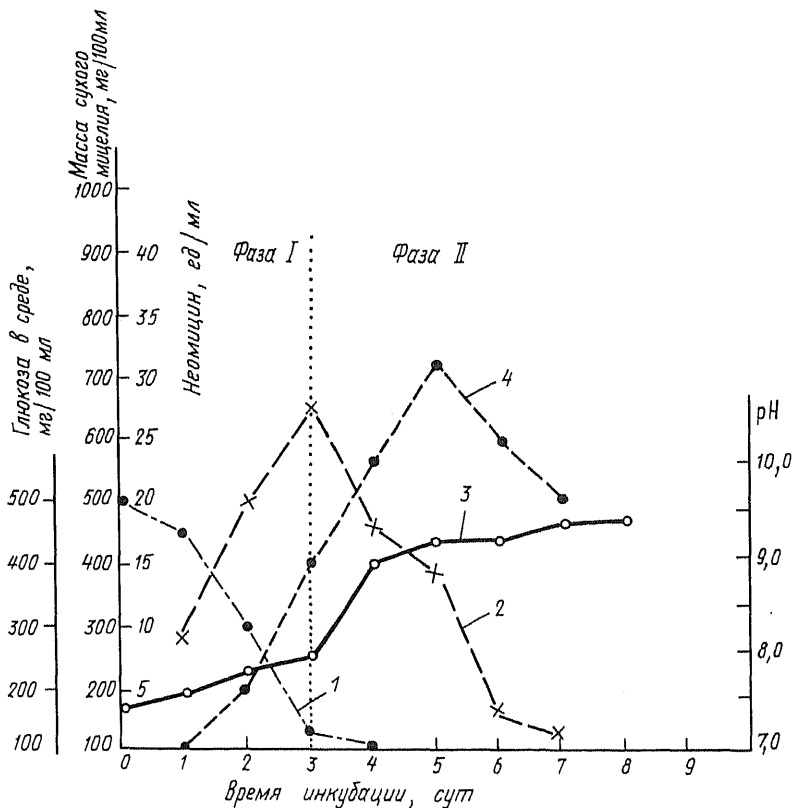


Рис. 11.1. Процесс развития *Streptomyces fradiae* 3535 в синтетической среде и образования неомицина (по Вакману, 1953):

1 — глюкоза, 2 — мицелий, 3 — значение pH, 4 — неомицин

антибиотика происходит быстрое накопление биомассы, сопровождаемое интенсивным потреблением основных компонентов субстрата (источников углерода, азота, фосфора и др.), некоторым снижением значения рН среды в результате образования кислых продуктов. Биосинтез антибиотика в этот период не происходит или осуществляется в незначительном количестве.

**Вторая фаза** (идиофаза — фаза несбалансированного роста) характеризуется снижением общего количества биомассы. В период второй фазы происходит развитие организма и образование новых клеток, но в культуре начинают преобладать аутолитические процессы, что и приводит к снижению общего числа биомассы. Среда обогащается продуктами обмена и продуктами автолиза клеток, несколько возрастает значение рН, происходит бурный процесс биосинтеза антибиотика. В этот период происходит депрессия ферментов, участвующих в биосинтезе антибиотика.

Следовательно, интенсивное образование антибиотика в культуре продуцента начинает происходить в период, когда развивающиеся клетки микроорганизма находятся в условиях среды, которая не содержит уже основных исходных компонентов, но обогащена продуктами обмена организма и продуктами его автолиза. Так, по данным Слугиной и Горской (1973)<sup>1</sup>, к концу второй фазы развития продуцента стрептомицина в культуральной жидкости кроме минеральных (зольных) элементов обнаруживаются белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, полисахариды и другие вещества.

Принцип двухфазности развития большинства микроорганизмов-продуцентов антибиотических веществ характерен лишь для нормально развивающихся культур, т. е. для организмов, которые развиваются в периодической культуре при использовании посевного материала в виде вегетативных клеток в возрасте не старше 24 ч или в виде спор.

#### 11.4. ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

Антибиотическое вещество, имеющее практическую значимость и являющееся новым препаратом, необходимо выпускать в промышленных масштабах. Поэтому при изучении продуцента и образуемого им антибиотика в лабораторных условиях подготавливается так называемый лабораторный регламент.

Лабораторный регламент — это *технологический документ*, завершающий лабораторные исследования по выработке метода получения антибиотика. Он служит основой для разработки промышленного регламента.

Задачей лабораторного регламента является определение оптимального метода промышленного производства антибиотического вещества.

В соответствии с «Отраслевым стандартом промышленного

<sup>1</sup> Слугина М. Д., Горская С. В. Антибиотики, 1973. М. 18, 8, 699.

регламента производства химико-фармацевтического препарата» ОСТ 59.01.002.40—85 лабораторный регламент получения антибиотика должен включать следующие разделы.

1. *Характеристика антибиотика.* Сюда входит название антибиотика, основное назначение, краткое описание свойств препарата, описание организма, образующего антибиотик, методы определения биологической активности, условия хранения.

2. *Технологическая схема производства.* Отражает последовательность работ по производству антибиотика с подразделением на стадии. Технологическая схема служит основой будущей технологии промышленного получения препарата.

3. *Сырье и материалы.* Сообщаются требования, предъявляемые к качеству сырья и материалам, которые используются при получении антибиотика с целью его максимальных выходов и обеспечения повторяемости результатов. При этом необходимо ориентироваться на сырье и материалы, выпускаемые отечественной промышленностью.

4. *Аппаратурная схема производства антибиотика.* Представляют схему процесса получения антибиотика с указанием аппаратов и приборов, их конструкции, размера и других характеристик, которые могут иметь значение при производстве антибиотика.

5. *Изложение технологического процесса.* Отражает описание процесса получения антибиотика на основе завершенных экспериментальных результатов, выполненных в лабораторных условиях. Процесс включается в регламент в том случае, если удастся получить воспроизводимые результаты как по качеству антибиотика, так и по его выходам.

Технологический процесс описывают по стадиям. Подробно указываются объемы, концентрации веществ, входящих в среду, рН среды, степень аэрации, растворители, пеногасители, условия перемешивания, продолжительность процесса развития продукта, температура и другие показатели.

6. *Отходы производства, технологические и вентиляционные выбросы в атмосферу, их использование и обезвреживание.* Приводится перечень возможных отходов и выбросов в атмосферу, наличие в отходах ценных веществ и рекомендации к их использованию, наличие вредных с точки зрения загрязнения окружающей среды веществ и способы их обезвреживания.

7. *Контроль производства.* Указываются особые требования к оборудованию (герметичность ферментера и всех коммуникаций, исправность и надежность работы мешалки и др.). Анализ качества сырья, соответствующего определенным стандартам. Режимы стерилизации сред и отдельных веществ, воздуха, Методы анализа за ходом процесса биосинтеза антибиотика и готовой продукции.

8. *Техника безопасности, пожарная безопасность и производственная санитария.* Приводится перечень веществ, способных воспламеняться и взрываться. Все вещества, применяемые в

процессе получения антибиотика, должны быть изучены с позиций техники безопасности, пожарной опасности и производственной санитарии.

9. *Перечень производственных инструкций.* Приводятся все инструкции, которые должны быть разработаны на основе лабораторного регламента.

10. *Технико-экономические нормативы.* Выходы конечного продукта и промежуточных продуктов; удельные нормы расхода сырья и материалов, удельные нормы расхода технологических энергозатрат (пара, воды, электроэнергии, сжатого воздуха).

11. *«Информационные материалы».* В этом разделе должны быть указаны биологические и физико-химические свойства вещества, степень очистки. Фармакологические свойства (преимущества и особенности), сравнение с показателями идентичных зарубежных препаратов, сведения о патентной чистоте антибиотика и принятого метода его получения с перечислением охраняющих авторских свидетельств (патентов), сведения о вредности применяемых при получении препарата веществ и мерах предосторожности при работе с ними.

#### **11.5. ПРОМЫШЛЕННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ**

Широкое применение антибиотиков в медицине, сельском хозяйстве и других отраслях народного хозяйства поставило задачу получения этих биологически активных веществ в массовых масштабах. Решение этой задачи стало возможным благодаря созданию мощной антибиотической промышленности.

В основе промышленного производства антибиотиков лежит ряд последовательных этапов: получение высокопродуктивных штаммов-продуцентов, разработка наиболее благоприятных условий культивирования продуцента антибиотика с максимальным биосинтезом этого вещества, подбор и внедрение в практику соответствующих методов выделения и очистки антибиотика, создание готовых препаратов и контроль их качества. Каждый из этих этапов должен обеспечиваться соответствующими специалистами (генетиками, микробиологами, технологами и др.).

Производство антибиотиков представляет ныне мощную, хорошо развитую отрасль, входящую в фармацевтическую (в нашей стране в медицинскую и микробиологическую) промышленность. Она занимает одно из ведущих мест в производстве лекарственных препаратов. Особенно широко она развита в США, Англии, Японии, Франции, Италии и других странах. Например, в США ежегодно выпускается антибиотиков и их производных на сотни миллионов долларов. По общему производству антибиотиков Советский Союз занимает ведущее место в мире. По данным Лове и Эландера, только  $\beta$ -лактамы антибиотиков (пенициллин и цефалоспорин) составляют половину общего объема производимых антибиотиков. В 1979 г., отмечают названные авторы, путем биосинтеза только пенициллина было



получено около 14 800 т на общую сумму 240 млн. долларов.

Промышленный способ получения антибиотиков — сложный многоступенчатый процесс, включающий ряд технологических стадий. Ниже мы рассмотрим из них основные.

### **11.5.1 Подготовка среды для культивирования продуцента антибиотика и посевного материала (1-я стадия)**

**Подготовка среды.** Для каждого продуцента антибиотика, для каждого вновь полученного штамма разрабатывается своя оптимальная среда, которая должна отвечать следующим основным требованиям: а) обеспечивать хороший рост продуцента и максимально возможное образование антибиотика, б) содержать доступные и дешевые компоненты, в) обладать хорошей фильтрующей способностью, г) обеспечивать применение наиболее экономичных и эффективных приемов выделения и очистки антибиотика. Стерилизация питательных сред в промышленных условиях осуществляется двумя основными методами: периодическим и непрерывным.

*Периодический метод* стерилизации применяется при использовании небольших объемов среды и состоит в том, что среда нагревается до определенной температуры (120—130°C) непосредственно в ферментерах или в специальных котлах-стерилизаторах, выдерживается при этой температуре в течение 30—60 мин (в зависимости от объема среды и ее состава), после чего среда охлаждается до 27—30°C.

*Непрерывный метод* стерилизации целесообразно применять при использовании больших объемов среды. Приготовленная среда из специального сосуда с помощью насоса подается в стерилизационную колонку, через которую пропускается острый пар (давление пара около 5 атм.). Пар подается сверху по внутренней трубе, имеющей щелевидные прорези, благодаря чему пар поступает в среду и быстро ее нагревает. Среда в колонку подается снизу и движется по спирали вокруг внутренней трубы.

Нагретая в колонке до необходимой для стерилизации температуры (около 130°C) среда поступает в специальный аппарат — выдерживатель, где она при температуре 125—130°C выдерживается определенное время. Время выдержки зависит от состава среды и составляет 5—10 мин. Из выдерживателя стерильная среда поступает в змеевиковый холодильник. Здесь она охлаждается до 30—35°C (на выходе) и поступает в ферментер.

Непрерывный метод стерилизации имеет ряд преимуществ перед периодическим методом: возможность автоматического регулирования процесса, быстрый и равномерный нагрев среды, обеспечение более полной стерильности среды и другие факторы.

При применении в качестве отдельных компонентов субстрата термолabileльных веществ их, как правило, следует стерилизовать отдельно в условиях более мягкого режима.

**Подготовка посевного материала** — одна из ответственных операций в цикле биологического метода получения антибиотиков. Количество и качество посевного материала определяют развитие культуры в ферментере и биосинтез антибиотика. Продуцент антибиотика обычно выращивается на богатых по составу средах, способных обеспечить наивысшую физиологическую активность микроорганизмов.

### 11.5.2. Биосинтез антибиотика (2-я стадия)

**Стадия биосинтеза** — основная биологическая стадия в процессе получения антибиотика. Ее призваны вести и контролировать высококвалифицированные микробиологи.

Задача этой стадии — обеспечение для продуцента антибиотика таких условий развития, которые бы способствовали максимальному уровню биосинтеза антибиотика.

Эффективность стадии биосинтеза зависит от уровня образования антибиотика организмом: определяется генетическими особенностями организма, составом питательной среды, режимом развития продуцента. Она также зависит от времени максимального образования антибиотического вещества, стоимости компонентов среды, включая стоимость предшественника, пенициллителей, энергетических затрат, связанных с процессом развития организма-продуцента антибиотика. В энергетические затраты включаются расходы энергии (и ее стоимость), связанные со стерилизацией среды, ферментера и коммуникаций, с перемешиванием культуральной жидкости, продуванием воздуха через нее, и другие процессы.

В современных условиях развития промышленной микробиологии наиболее перспективным методом выращивания микроорганизмов-продуцентов антибиотиков или других биологически активных соединений является метод глубинного культивирования. При производстве антибиотиков используют периодическое и непрерывное культивирование продуцентов этих биологически активных веществ.

**Ферментеры.** Для получения антибиотиков в промышленных масштабах применяются специальные герметически закрытые емкости или ферментеры, обеспечивающие глубинное выращивание продуцентов.

Ферментер — это довольно сложный аппарат, обеспечивающий хорошие условия для глубинного развития продуцента и биосинтеза им антибиотика: снабжен приспособлениями для достаточной аэрации и перемешивания культуры, поддержания необходимой температуры, а также контрольно-измерительными приборами (рис. 11.2). В последнее время выпускаются ферментеры с автоматизированной системой контроля.

Аэрирование культуры в ферментере происходит в результате подачи подогретого до необходимой температуры стерильного воздуха через специальные приспособления — барботеры, а также

благодаря перемешиванию культуральной жидкости различного типа мешалками (пропеллерными, турбинными и др.) и наличию отбойников.

В последнее время при производстве антибиотиков испытывают низкочастотное вибрационное перемещение культуральной жидкости как наиболее экономичный способ.

Поддержание температуры, оптимальной для хорошего роста продуцента антибиотика и проявления им повышенной физиолого-биохимической активности, обеспечивается рубашкой ферментера или системой змеевиков. Змеевики используются также для подачи пара в процессе стерилизации или воды для охлаждения.

Наблюдение за основными процессами жизнедеятельности организма осуществляется контрольно-измерительной аппаратурой, позволяющей регулировать скорость перемешивания культуральной среды, поддерживать на заданном уровне температуру внутри ферментера, pH среды, количество пропускаемого воздуха, давление внутри ферментера и другие параметры. Применяются установки, позволяющие автоматически определять содержание азота в среде по ходу развития организма. Ферментеры снабжены приспособлениями для переноса инокулята, внесения дополнительных питательных веществ, необходимых для лучшего развития культуры, пеногасителя и устройством для взятия проб.

В промышленных условиях получения антибиотиков применяют ферментеры различной емкости — от 500 л до 50, 100 м<sup>3</sup> и более. Стерилизацию производственных ферментеров, а также всех обслуживающих их коммуникаций проводят перегретым паром. Воздух, необходимый для аэрации, стерилизуется через специальные фильтры, заполненные стеклянной ватой или активированным древесным углем.

Использование волокнистых фильтров (типа стеклянной ваты) — широко распространенный и экономически наиболее вы-

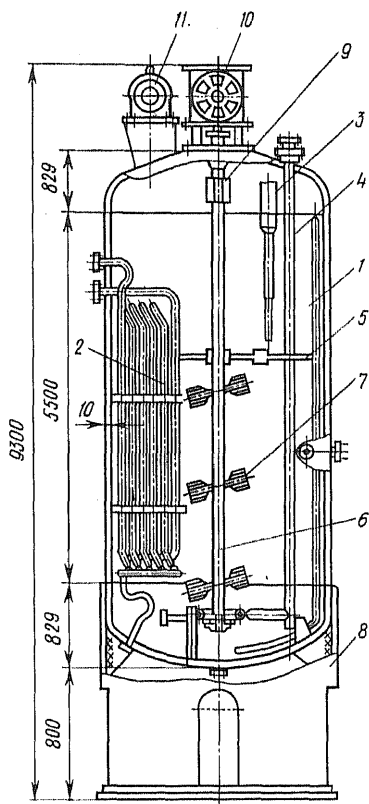


Рис. 11.2. Ферментер для глубинно-го выращивания продуцентов антибиотиков:

1 — корпус аппарата, 2 — теплообменник, 3 — гильза для термометра, 4 — барботер, 5 — растяжки для центровки вала, 6 — вал мешалки, 7 — лопасть мешалки, 8 — стойка ферментера, 9 — соединительная муфта вала, 10 — привод мешалки, 11 — мотор

годный механический способ стерилизации воздуха (чем меньше диаметр волокна, тем лучше их фильтрующая способность).

Проникновение в фильтр бактериальных клеток или спор, перемещающихся с воздушным потоком, зависит от скорости движения воздуха. Проникновение увеличивается с увеличением скорости воздуха. В зависимости от плотности упаковки фильтра скорость движения воздуха не должна превышать 1,5 м/с.

**Подготовка посевного материала** — процесс многоступенчатый. Микроорганизм предварительно выращивают на агаризированной среде в пробирке, затем из пробирки высевают в колбы с жидкой питательной средой и проводят две генерации при глубинной выращивании на качалках в течение 2—3 сут для каждой генерации. Из второй генерации культуры (в колбе) делают посев в небольшой (10 л) инокулятор, а затем хорошо развившуюся культуру переносят в более крупный инокулятор (100—500 л), откуда и производят посев в основной ферментер. Для посева в основной ферментер используют от 5 до 10 объемных процентов посевного материала (инокулята).

**Развитие организма-продуцента антибиотика в ферментерах.** Процесс развития микроорганизма в ферментерах проходит при строгом контроле всех стадий, очень точном выполнении разработанного регламента условий развития организма-продуцента антибиотика. Большое внимание уделяется поддержанию заданной температуры культивирования, активной кислотности среды pH, степени аэрации и скорости работы мешалки. Учитывается потребление организмом основных питательных компонентов субстрата (источников углерода, азота, фосфора), внимательно контролируется образование антибиотика.

Особое внимание при развитии продуцента в ферментерах обращают на процесс пеногашения. При продувании воздуха через культуру микроорганизма часто происходит обильное образование пены, которая существенно нарушает протекание всего процесса развития продуцента антибиотика в ферментере. Основная причина появления большого количества пены — наличие белковых веществ в среде и ее высокая вязкость, обусловленная обильным накоплением биомассы.

Для борьбы с пеной в ферментерах при антибиотикообразовании используют различные поверхностно-активные вещества: растительные масла (соевое, подсолнечное), животный жир (лярд, кашалотовый жир), а иногда минеральные масла (вазелиновое, парафиновое), спирты и высшие жирные кислоты. Нередко в качестве пеногасителей используют специально синтезированные вещества (силиконы, диазобуталкарбомил и другие соединения).

Многие вещества (масла, жиры, спирты и др.) — пеногасители, потребляются продуцентами антибиотиков как дополнительные источники углеродного питания. При этом часто наблюдается повышение выхода антибиотика. Однако внесение пеногасителя

снижает скорость растворения кислорода, что в свою очередь может отрицательно сказаться на развитии микроорганизма и его биосинтетической активности.

Иногда используются механические способы пеногашения (отсасывание пены через специальные трубы, разрушение пузырьков пены сильными струями жидкости, пара или газа) и аэродинамические.

### **11.5.3. Предварительная обработка культуральной жидкости (3-я стадия)**

В процессе развития микроорганизмов-продуцентов антибиотиков эти вещества в большинстве случаев почти полностью выделяются из клеток в окружающую среду. Однако в некоторых случаях лишь часть антибиотика выделяется в культуральную жидкость, а другая часть сохраняется внутри клеток. У ряда продуцентов антибиотик почти полностью содержится в клетках организма.

В зависимости от того, где антибиотическое вещество сосредоточено, применяют соответствующие методы его извлечения. Так, если антибиотик находится в культуральной жидкости, его выделяют методами экстракции растворителями, не смешивающимися с жидкой фазой, или осаждают в виде нерастворимого соединения, или сорбируют ионообменными смолами.

Выделение антибиотика из клеток микроорганизмов осуществляют с помощью экстракции органическими растворителями. Если антибиотик содержится в культуральной жидкости и в клетках продуцента, первичной операцией его выделения является перевод антибиотика в фазу, из которой наиболее целесообразно его изолировать. Для этого антибиотик, содержащийся в культуральной жидкости, и клетки с антибиотическим веществом переводят в осадок, а затем антибиотик экстрагируют.

Отделение нативного раствора от биомассы и взвешенных частиц проводят методами фильтрации или центрифугирования. При этом применяют меры для обеспечения лучшей фильтруемости культуральной жидкости (кислотную или тепловую коагуляцию, обработку электролитами, внесение различных добавок и т. п.). Для процесса фильтрации применяют различные фильтрующие аппараты: фильтр-пресс, нутч-фильтр, друк-фильтр, центрифуги, сепараторы.

Фильтр-прессы применяются для обработки больших объемов культуральной жидкости. Эти аппараты состоят из ряда чередующихся плит и рам и фильтрующих перегородок между ними. Процесс фильтрации осуществляется под давлением.

Для фильтрации небольших объемов культуральной жидкости обычно используют нутч-фильтры или друк-фильтры. Первый аппарат работает под вакуумом, второй — в условиях повышенного давления над фильтрующейся жидкостью.

Для получения жидкости, освобожденной от взвешенных

частиц, широкое распространение нашел способ центрифугирования. Хорошие результаты достигаются при правильной вы­боре скорости подачи жидкости (лучший вариант — 15000 об/мин).

Отделение мицелия или других взвешенных частиц может также происходить в сепараторах. При скорости вращения барабана сепаратора, равной 7000—7500 об/мин, благодаря центробежной силе твердые частицы устремляются к стенкам барабана и осаждаются там, а отсепарированная жидкость стремится к центру барабана и поднимается в специальную камеру.

#### **11.5.4. Выделение и очистка антибиотика (4-я стадия)**

В процессе образования антибиотика в культуральную жидкость наряду с присутствием в ней различных неиспользованных компонентов среды выделяются и разнообразные продукты обмена, она обогащается продуктами автолиза клеток. Удаление примесей — первая и весьма важная стадия химической очистки антибиотика.

Стадия выделения и химической очистки включает ряд процессов: от обработки нативного раствора до сушки готового очищенного препарата. На этой стадии в зависимости от свойств антибиотика, его химического строения и места основного накопления применяют различные методы выделения и очистки. В качестве основных методов используют экстракцию, осаждение, сорбцию на ионообменных материалах, упаривание, сушку.

Одной из особенностей стадии выделения и химической очистки является то, что при выделении антибиотиков приходится работать с весьма невысокими концентрациями выделяемого вещества (не превышающими одного процента). В конце стадии химической очистки уже имеют дело с более высокими концентрациями антибиотика, достигающими 20—30%.

Цель химической очистки — извлечение антибиотика из нативной жидкости или из клеток продуцента, концентрация его и освобождение (собственно очистка) от сопутствующих примесей и в конечном счете получение высоко очищенного препарата, пригодного для соответствующего применения.

Антибиотические вещества под влиянием жестких внешних факторов (повышенная температура, высокая кислотность или щелочность и др.) в ряде случаев теряют свои свойства, инактивируются. Поэтому при их выделении и очистке необходимо соблюдать максимум осторожности.

**Метод экстракции.** Нередко в целях очистки антибиотика от различных примесей его многократно переводят из одного растворителя в другой с предварительным осаждением (кристаллизацией). Такой прием носит название перекристаллизации.

**Ионообменная сорбция.** Метод состоит в том, что при пропускании водных растворов антибиотиков, являющихся по химической природе кислотами, основаниями или амфотерными со-

единениями, через колонки с соответствующими ионообменными смолами они сорбируются на них, а раствор с частью примесей, имеющих противоположный антибиотику заряд, проходит через колонку. Смолы в зависимости от положительного или отрицательного заряда иона в них называют катионидами или анионидами. Антибиотик в виде отрицательно заряженного иона будет сорбироваться на катионидной смоле, и наоборот. Адсорбированный на смоле антибиотик элюируют (десорбируют), в результате чего получают значительно очищенный и сконцентрированный препарат. Затем раствор препарата можно вновь пропустить через ионообменную смолу, но имеющую противоположный заряд. При этом примеси осядут на смоле, а раствор более очищенного антибиотика пройдет через колонку.

**Метод осаждения** основан на том, что антибиотик связывают с органическими или неорганическими веществами с целью получения соединения, выпадающего в осадок. Полученный осадок с помощью фильтров или центрифугирования отделяют от нативного раствора, промывают и в ряде случаев высушивают, после чего образовавшееся соединение разлагают и антибиотик экстрагируют или вновь осаждают (кристаллизуют).

Одной из стадий химической очистки антибиотиков является концентрирование полученных растворов путем отгонки большей части растворителя, как правило, в высоком вакууме.

Применяемые методы выделения и химической очистки, а также качество оборудования и используемых реактивов имеют большое значение прежде всего для улучшения качества получаемого антибиотика и для увеличения его выхода.

### **11.5.5. Получение готовой продукции, приготовление лекарственных форм, расфасовка (5-я стадия)**

Известно, что к антибиотикам, используемым в медицинской практике, предъявляются очень высокие требования (высокая степень очистки, стерильность препарата и др.). Поэтому на указанной стадии работы, а также при химической очистке препарата необходимо соблюдать высокую степень чистоты на всех операциях. Для этого поддерживают в исключительной чистоте не только используемое оборудование, но и помещение, где производят работу.

Антибиотики, предназначенные для инъекций, должны быть стерильными. Поэтому получение таких препаратов, приготовление различных лекарственных форм, расфасовка и упаковка осуществляются в асептических условиях.

После выделения и химической очистки антибиотика его необходимо высушить — удалить из полученного препарата свободную и связанную воду. Поскольку большинство антибиотиков в той или иной степени термолабильны, для их высушивания необходимо применять методы, не приводящие к потере биологической активности и не изменяющие цвета препарата.

На современном этапе промышленного получения антибиотиков используют различные методы обезвоживания препаратов.

Широкое распространение получила лиофильная сушка антибиотиков, которая проводится при сравнительно низких температурах ( $-8, -12^{\circ}\text{C}$ ).

Прогрессивным методом при работе с большими количествами антибиотика является высушивание с применением распылительной сушилки. Раствор антибиотика пневматически распыляется до мельчайших капель в камере потоком нагретого воздуха. Процесс высушивания антибиотиков протекает в течение нескольких секунд. При этом даже термолабильные препараты не меняют своих свойств.

Сушка зернистых и пастообразных антибиотических препаратов производится в вакуум-сушильных шкафах или методом взвешенного слоя.

Готовый антибиотик подвергается тщательному биологическому и фармакологическому контролю.

**Биологический контроль** позволяет определить стерильность готового препарата. Для этого используют, как правило, два метода.

Первый связан с инактивацией антибиотика и высевом его в соответствующую питательную среду. Например, биологический контроль бензилпенициллина и полусинтетических препаратов, полученных на его основе, производится следующим образом. В пробирки, содержащие тиогликолевую среду, вносят фермент пенициллиназу в количестве, способном полностью инактивировать пенициллин. Пробирки с пенициллиназой выдерживают 2—3 сут при  $37^{\circ}\text{C}$  для контроля стерильности фермента, затем в них вносят раствор пенициллина. Пробирки разделяют на две группы, одну группу выдерживают при  $37^{\circ}$ , а другую при  $24^{\circ}$  в течение 5 сут. Ежедневно наблюдают за возможным ростом микроорганизмов.

Второй метод выяснения стерильности антибиотиков определяется тем, что для большинства этих соединений не имеется биологических инактиваторов их биологической активности. Поэтому у контролируемых препаратов выявляют наличие устойчивых к ним форм микроорганизмов, а также определяют возможное присутствие чувствительной микрофлоры. Для определения возможного присутствия в препаратах чувствительных к ним бактерий раствор антибиотиков пропускают через мембранные фильтры (диаметр пор не более  $0,75\ \mu\text{м}$ ).

Необходимо подчеркнуть, что стерильность готового антибиотика обеспечивается соблюдением стерильных условий работы на всех стадиях процесса развития продуцента, выделения и очистки препарата.

**Фармакологический контроль.** К антибиотическим веществам, используемым в медицинской практике, в соответствии с Государственной фармакопеей СССР предъявляются очень строгие требования. Каждый новый лекарственный препарат, прежде чем



он будет разрешен к практическому применению, должен пройти всесторонние испытания на токсичность, пирогенность и другие жизненно важные функции организма. Препарат изучают на разных видах животных в отношении его острой и хронической токсичности (влияние на состав крови, центральную нервную систему, дыхание и т. д.). Показатели острой токсичности — один из критериев качества антибиотического вещества. Устанавливают максимально переносимую дозу (МПД) антибиотика, дозу, вызывающую гибель 50 % подопытных животных ( $LD_{50}$ ) и дозу, смертельную для всех животных ( $LD_{100}$ ). Только после всестороннего и тщательного изучения препарата он может быть рекомендован к практическому применению. Затем производят расфасовку и упаковку. Упакованный антибиотик с указанием биологической активности и даты выпуска поступает в продажу.

#### **11.6. ПРОМЫШЛЕННЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИБИОТИКОВ**

Большое значение для получения разнообразных модификаций уже известных антибиотических веществ, обладающих более ценными свойствами по сравнению с исходными препаратами, имеет так называемый полусинтетический способ производства антибиотиков. Этой проблеме стали уделять заметное внимание с начала 60-х годов.

В основе полусинтетического способа получения антибиотиков лежит следующий принцип. В результате биосинтеза получают исходные антибиотики (пенициллин, цефалоспорин, тетрациклины, рифамицин), которые затем подвергаются химической модификации. В ряде случаев основным исходным полуфабрикатом служит не вся молекула антибиотика, а лишь ее основное ядро. Так, при получении полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов используют соответственно 6-аминопенициллановую кислоту и 7-аминоцефалоспоровую и 7-аминодезацетоксицефалоспоровую кислоты, которые подвергаются затем химическому воздействию.

**Получение 6-аминопенициллановой кислоты.** 6-Аминопенициллановую кислоту (6-АПК) получают тремя способами: 1) в результате развития продуцента пенициллина в среде, не содержащей предшественника; 2) химической обработкой (гидролизом) бензилпенициллина и 3) ферментативным гидролизом бензилпенициллина.

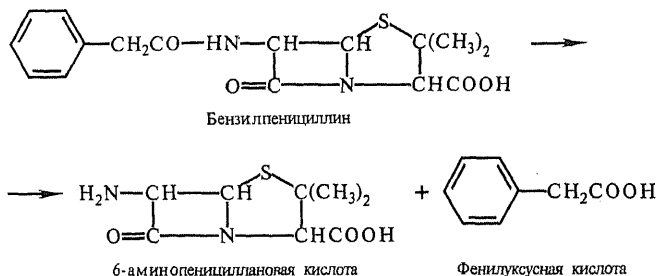
На возможность получения 6-АПК в результате изменения условий культивирования продуцента пенициллина впервые указал Като в 1953 г. Бетчел и др. в 1959 г. установили, что пенициллинообразующие штаммы гриба способны при развитии в среде, не содержащей предшественника, образовывать 6-АПК. Однако практического, тем более промышленного значения такое получение 6-аминопенициллановой кислоты не имеет. Связано это с тем, что, во-первых, при развитии продуцента пенициллина

в средах без предшественника образуется относительно небольшое количество 6-АПК. Во-вторых, довольно трудно выделять из культуральной жидкости эту кислоту и очищать ее от сопутствующих веществ.

Более эффективным способом получения 6-АПК является химический метод, в основе которого лежит обработка бензилпенициллина пятихлористым фосфором с получением легкогидролизуемого соединения, из последнего затем и получают 6-АПК. В данном случае выход 6-АПК составляет до 95%.

Наиболее рациональным способом получения 6-аминопенициллановой кислоты следует назвать ферментативный гидролиз молекулы пенициллина.

Фермент пенициллинацилаза осуществляет гидролиз молекулы бензилпенициллина с образованием 6-АПК и фенилуксусной кислоты:



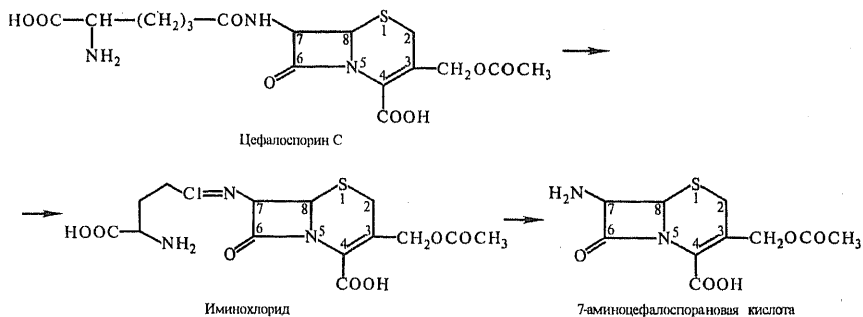
6-Аминопенициллановая кислота практически лишена антибиотической активности.

Пенициллинацилазу способны образовывать различные виды микроорганизмов, в том числе и грибы, продуцирующие пенициллин. Фермент, образуемый бактериями и проактиномицетами, осуществляет гидролиз бензилпенициллина более быстро, чем другие типы пенициллинов.

В настоящее время получение 6-аминопенициллановой кислоты проводят с помощью иммобилизованной пенициллинацилазы, что обеспечивает большой выход продукта и его высокую степень чистоты.

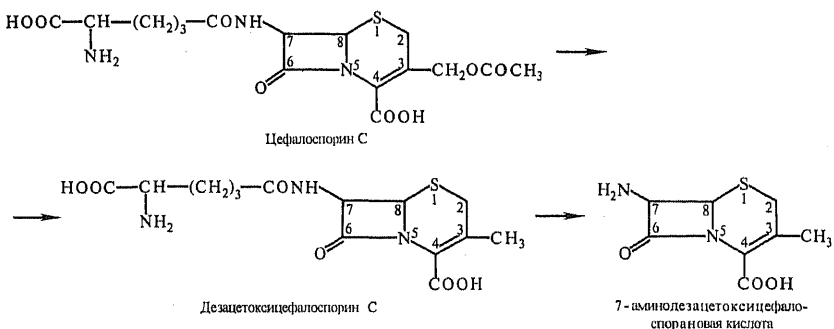
**Получение 7-аминоцефалоспоровановой и 7-аминодезацетоксицефалоспоровановой кислот.** Исходными ядрами для получения полусинтетических цефалоспоринов, из которых лишь ряд имеет большую практическую ценность, являются 7-аминоцефалоспоровановая кислота (7-АЦК) и 7-аминодезацетоксицефалоспоровановая кислота (7-АДЦК), получаемые в результате изменения двух боковых цепей цефалоспориноса С: при С-7 и при С-3.

Основным путем получения 7-АЦК является способ химической обработки исходного антибиотика (цефалоспориноса С) пятихлористым фосфором при пониженной температуре с получением легко гидролизуемого соединения иминохлорида по следующей схеме:



В последнее время советскими учеными разработан эффективный способ получения 7-аминоцефалоспоровой кислоты под действием фермента ацилазы.

Получение 7-АЦДК связано с отщеплением ацетоксигруппы цефалоспориина С в положении С-3 в результате гидрогенизации молекулы антибиотика в присутствии палладия с получением дезацетоксицефалоспориина С, из которого затем путем удаления аминокадипиального радикала (при С-7) получают 7-аминодезацетоксицефалоспоровую кислоту (7-АЦДК). 7-АЦДК можно получать и биокаталитическим путем с помощью фермента эстеразы. Схематически этот процесс можно изобразить следующим образом:



Итак, химическая модификация молекулы цефалоспориина может происходить по двум боковым цепям: при С-7 и при С-3, что делает возможным получение большого числа производных.

Наиболее ценными полусинтетическими препаратами, нашедшими широкое применение в медицинской практике, можно назвать следующие:

Название препарата	Антибиотик, на основе которого получен препарат
Метациклин (рондомицин), доксициклин	Окситетрациклин
Миноциклин (подробнее см, на с. 247)	6-Деметилтетрациклин
Рифампицин, рифамид (см. с. 250)	Рифамицин

Ампициллин, оксациллин, диклоксациллин, карбенициллин, нафциллин, метициллин (их строение см. на с. 253)	Бензилпенициллин
Цефалотин, цефалоридин, цефалоглицин, цефалексин, цефрадин, цефатризин, цефамандол, цефакситин и др. (см. с. 255)	Цефалоспорин С

Таким образом, в результате смешанного синтеза (биологического и химического) получен ряд весьма ценных в практическом отношении препаратов. Исследования по получению полусинтетических антибиотиков продолжаются.

### 11.7. ПОТЕРЯ СПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К ОБРАЗОВАНИЮ АНТИБИОТИКОВ В ПРОМЫШЛЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Микроорганизмы — продуценты антибиотиков в процессе развития в промышленных условиях, а также при систематических перeseвах для поддержания культур нередко теряют способность к антибиотикообразованию или же резко снижают ее. Такое нежелательное явление связано с двумя основными факторами: спонтанной диссоциацией штаммов и фаголизисом.

**Спонтанная диссоциация.** Культуры микроорганизмов по своей сути гетерогенны и состоят из множества вариантов, отличающихся рядом морфологических, физиологических и биохимических свойств, в том числе и по уровню биосинтеза антибиотика. В результате спонтанных мутаций могут возникнуть и возникают малоактивные варианты. В период развития микроорганизма-продуцента антибиотика в промышленных условиях или в процессе его хранения он может спонтанно диссоциировать на ряд вариантов, из которых некоторые не способны к образованию антибиотика. Так, при получении грамицидина С культура *Bacillus brevis* var. G. В. довольно легко диссоциирует на варианты R, S, P<sup>+</sup> и P<sup>-</sup>. Каждый из образовавшихся вариантов диссоциации (R, S, P<sup>+</sup> и P<sup>-</sup>) может превращаться частично или полностью в любой другой вариант. Однако, способностью к образованию грамицидина С обладают лишь два варианта: R и P<sup>+</sup>.

Процесс диссоциации исходного штамма (R-вариант) идет постоянно, в результате в культуре накапливаются наряду с P<sup>+</sup> и R-вариантами варианты S и P<sup>-</sup>, не способные к биосинтезу грамицидина С. При неумелом хранении исходного штамма происходит «вырождение» культуры и резкое снижение выхода антибиотика.

**Фаголизис.** При промышленном получении антибиотиков и прежде всего антибиотиков, образуемых актиномицетами, иногда происходит лизис клеток продуцента антибиотика под действием актинофага (фаголизис). Это приводит к полному прекращению

роста культуры и остановке процесса образования антибиотического вещества.

Фаголизис наблюдается при производстве стрептомицина, новобиоцина, тетрациклинов, эритромицина и других антибиотиков.

Заражение фагом может происходить при использовании в процессе биосинтеза антибиотика лизогенной культуры, путем проникновения фага извне на определенных этапах производственного получения антибиотика.

В промышленных условиях получения антибиотиков рекомендуются следующие меры борьбы с фаговой инфекцией.

1. Использование в производстве антибиотиков специально отобранных фагоустойчивых культур. Метод отбора фагоустойчивых штаммов основан на том, что под действием фагов у микроорганизмов появляются варианты, в том числе и фагоустойчивые.

2. Систематическая борьба с распространением фага в производственных цехах и лабораториях. Обычно в этих целях помещения и оборудование регулярно обрабатывают дезинфицирующими средствами, убивающими фаг (гипохлориды, соли хлорноватистой кислоты и др.).

3. Защита производственной культуры продуцента антибиотика от фаговой инфекции. Это достигается тщательной стерилизацией сред, аппаратуры, оборудования, коммуникаций, строгим соблюдением стерильности на всех этапах получения антибиотика.

Соблюдение указанных мер позволяет осуществлять промышленный процесс получения антибиотических веществ на должном уровне, без опасения лизиса культуры продуцента.

## 11.8. ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ

Антибиотические вещества находят применение в различных отраслях народного хозяйства, в научных исследованиях. Они широко используются в медицине, в сельском хозяйстве, в пищевой и консервной промышленности, как специфические ингибиторы в биологических исследованиях.

**Антибиотики в медицине.** Открытие антибиотиков вызвало переворот в медицине. Многие антибиотические вещества оказались незаменимыми лечебными препаратами. Они нашли широкое применение при лечении многих инфекционных заболеваний, которые ранее считались неизлечимыми или сопровождалась высоким летальным исходом. К числу таких заболеваний необходимо отнести некоторые формы туберкулеза и прежде всего туберкулез менингитный, который до применения антибиотиков вызывал 100%-ный летальный исход, чуму, азиатскую холеру, брюшной тиф, бруцеллез, пневмонию, различные септические процессы и др.

Некоторые антибиотики способны подавлять развитие злокачественных опухолей и проявлять активность в отношении ряда вирусов.

К настоящему времени в медицинской практике нашло применение около ста антибиотиков. Поиски новых антибиотических веществ, получение ценных полусинтетических препаратов антибиотиков расширяют возможность их практического применения в медицине.

**Антибиотики в сельском хозяйстве.** Наряду с медицинским использованием антибиотики находят широкое применение в сельском хозяйстве. Прежде всего антибиотики используются в качестве препаратов в ветеринарии для лечения различных заболеваний сельскохозяйственных животных. В этом случае они, как и в медицине, оказались весьма эффективными средствами.

Антибиотические вещества находят все возрастающее применение в борьбе с фитопатогенными организмами — возбудителями заболеваний растений, наносящими ощутимый урон сельскохозяйственному производству.

При выборе антибиотиков, используемых в растениеводстве, необходимо руководствоваться следующими основными требованиями к препарату:

- 1) антибиотик должен обладать специфической биологической активностью к возбудителю заболевания растений;
- 2) он должен легко проникать в ткани растений и проявлять внутри них биологическую активность;
- 3) лечебные дозы антибиотика должны быть безвредными для растения;
- 4) антибиотик, находясь на поверхности и внутри тканей растения, должен относительно длительное время проявлять биологическую активность, но должен также легко и быстро инактивироваться, попадая в почву.

Одним из самых главных требований к антибиотикам, используемым в сельском хозяйстве, должно быть то, чтобы эти препараты не применялись в медицинской практике. Это принципиальное условие обеспечивает снижение уровня появления резистентных форм микроорганизмов, патогенных для человека.

Для борьбы с фитопатогенными организмами могут применяться различные антибиотики.

*Гризеофульвин* — образуется плесневыми грибами из рода *Penicillium* (*P. urticae*, *P. nigricans*, *P. rustriichi*). Строение антибиотика см. с. 257.

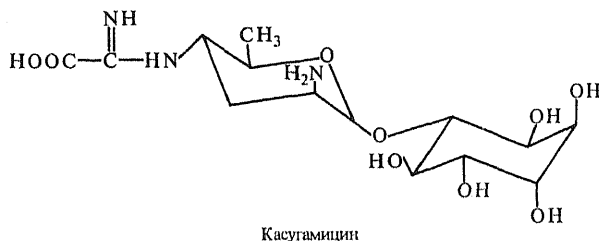
Гризеофульвин применяют против фитопатогенных грибов и прежде всего грибов, относящихся к роду *Botrytis*. Он активен в отношении возбудителя ржавчины, мучнистой росы, килы капусты.

*Трихотецин* — продуцируется плесневым грибом *Trichothecium roseum* (см. с. 257).

Антибиотик подавляет развитие ряда фитопатогенных грибов, в том числе *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium*. Попадая в почву, трихотецин инактивируется ферментом трихотециназой, образу-

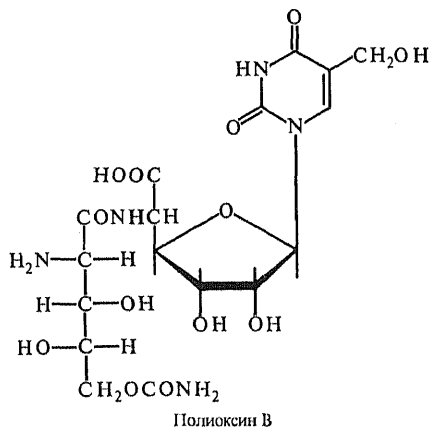
емой почвенными грибами из рода *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

*Касугамицин*, продуцируемый *Streptomyces kasugaensis*, имеет следующее строение:



Активен против грибного заболевания риса пирикулярриоза, широко распространенного в Японии. Заболевание вызывается грибом *Pericularia oryzae*.

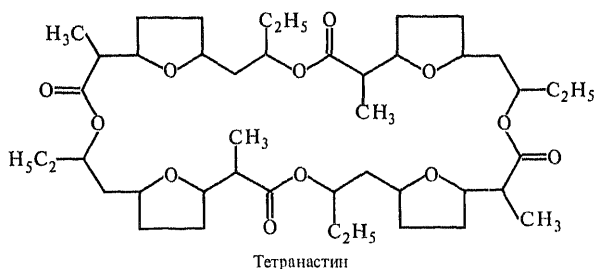
*Полиоксины* — антибиотики, относящиеся к своеобразным соединениям пептидил-пиримидин-нуклеозидам, обладают противогрибковой активностью. Образуются культурой *Streptomyces sacaoi* и имеют следующее строение:



Антибиотики подавляют рост фитопатогенных грибов из рода *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Pirularia*.

*Валидамицин А*, образуемый *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus*, обладает биологической активностью против фитопатогенного гриба *Rizoctonia solani* — возбудителя заболевания риса. Известна суммарная формула валидамицина А:  $C_{20}H_{35}NO_{13} \cdot H_2O$ . Антибиотик легко разлагается почвенными микроорганизмами.

*Тетранастин* — антибиотическое вещество актиномицетного происхождения. Его продуцентом является *Streptomyces aureus*.

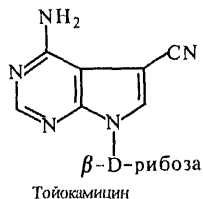


Обладает специфической активностью против паразитарных паучков и клещей плодовых деревьев.

Гербицидины А и В, синтезируемые *Streptomyces saganensis*, подавляют развитие возбудителя заболевания риса, вызываемое *Xanthomonas oryzae*.

Гербицидин А задерживает прорастание семян риса и китайской капусты, обладает избирательной гербицидной активностью против двудольных растений.

Гербицидины А и В по химическому строению и биологической активности близки к *тойокамицину*, образуемому культурой *Str. toyocaensis*.



**Антибиотики в пищевой и консервной промышленности.** При борьбе с микроорганизмами, вызывающими порчу продуктов питания, наряду с физическими и химическими методами применяются и антибиотики. Однако для этих целей не могут быть использованы антибиотики, применяемые в медицине. Это правило введено в нашей стране и ряде других государств и связано оно с предупреждением процесса возникновения и распространения устойчивых к антибиотикам форм микробов.

Среди антибиотиков, применяемых в пищевой и консервной промышленности, можно назвать субтилин, низин и некоторые другие.

*Субтилин* образуется культурой *Bacillus subtilis* и представляет собой полипептид. Активен в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, в том числе и кислотоустойчивых бацилл.

Применяя субтилин при консервировании овощей, можно значительно смягчить их термическую обработку, что имеет большое значение для сохранения витаминов, вкусовых качеств и консистенции продукта.



*Низин* — высокомолекулярный пептид, а может быть даже низкомолекулярный белок, образуемый *Streptococcus lactis*.

Низин не используется в медицинской практике. Его применяют при консервировании томатов, зеленого горошка, цветной капусты и других продуктов. Хорошие результаты получены при сохранении сыров.

Антибиотик подавляет развитие ряда термофильных спорообразующих бактерий, не токсичен для человека.

Применение антибиотиков в растениеводстве, пищевой и консервной промышленности должно происходить под постоянным и строгим контролем специалистов и соответствующих компетентных органов.

### **11.9. АНТИБИОТИКИ — СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ РЯДА РЕАКЦИЙ МЕТАБОЛИЗМА**

Антибиотики, обладая специфическим ингибирующим воздействием на отдельные реакции метаболизма разных организмов, нашли широкое применение в научных исследованиях при изучении механизмов биосинтеза белка, функционирования мембран, энергетических процессов и других сторон метаболизма. Так, одни антибиотики (хлорамфеникол, тетрациклины, пуромицин) специфически подавляют определенные этапы синтеза белка на рибосомах, другие — синтез на разных уровнях нуклеиновых кислот (азасерин и азотомидин ингибируют образование предшественников нуклеиновых кислот, саркомицин подавляет активность полимераз, актиномицин, блеомицин, рубомицин, кардиомицин и другие нарушают функцию ДНК); третьи (пенициллины, цефалоспорины, ванкомицин) — образование клеточных стенок; четвертые (антимидины, олигомицины и др.) — ингибируют процессы дыхания; такие антибиотики, как валиномицин, грамицидины, колицины и некоторые другие, подавляют окислительное фосфорилирование.

Таким образом, к изучению антибиотиков, их практическому использованию проявляют интерес специалисты многих направлений науки и практики.

## **Глава 12 ВИТАМИНЫ**

*Витамины* — группа низкомолекулярных органических веществ, которые в очень низких концентрациях оказывают сильное и разнообразное биологическое действие. В природе источником витаминов являются главным образом растения и микроорганизмы. Менахиноны и кобаламины синтезируются исключительно микроорганизмами. И хотя химический синтез в производстве большей части витаминов занимает ведущее положение, микробиологические методы также имеют большое практическое значение.

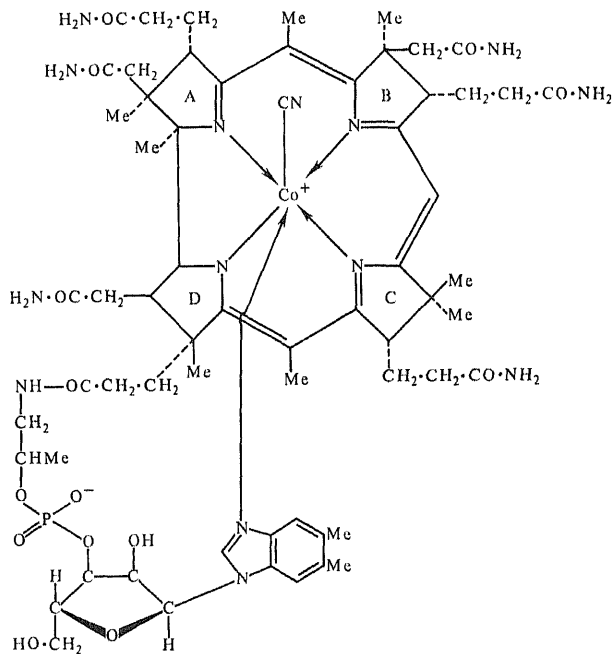
Микробиологическим путем получают эргостерин, витамин В<sub>12</sub>. Кроме того, микроорганизмы используются как селективные окислители сорбита в сорбозу (при получении витамина С), а также для производства витаминных концентратов (витамина В<sub>2</sub>, каротиноидов).

Перспективно микробиологическое получение биотина, используемого в рационе кур и свиней. В настоящее время на Западе в большую часть комбикормов для свиней включают биотин, получаемый путем химического синтеза. В результате химического синтеза образуется рацемическая смесь, а биологической активностью обладает лишь D-форма витамина, которую синтезируют микроорганизмы.

В мире существует 40 крупных промышленных производителей витаминов; 18 из них в США, 8 — в Японии, 14 — в Западной Европе. Ведущее место в производстве витаминов занимает швейцарский концерн Hoffman La Roche, выпускающий 50—70% всех витаминов.

### 12.1. ВИТАМИН В<sub>12</sub>

Среди неполимерных соединений витамин В<sub>12</sub> имеет самое сложное строение. Это α (5,6-диметилбензимидазол) — кобамидцианид:



Витамин В<sub>12</sub>

В молекуле витамина  $V_{12}$  различают:

1. Порфириноподобное, хромофорное, или корриновое, кольцо, связанное с атомом кобальта четырьмя координационными связями через атомы азота.

2. Верхним координационным лигандом кобальта в витамине  $V_{12}$  является цианогруппа. Ее место могут занимать другие неорганические или органические заместители, например  $NO_2^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O$ ,  $CH_3OH$ , аденозил; заместители определяют название производных витамина  $V_{12}$ .

3. Шестая позиция кобальта занята нуклеотидным ядром (нижним лигандом кобальта), состоящим из азотистого основания, рибозы и остатка фосфорной кислоты. Нуклеотидное ядро связано с кобальтом через азот основания, а с корриновым кольцом через аминопропаноловый мостик.

В составе витамина  $V_{12}$  или цианкобаламина азотистое основание представлено 5,6-диметилбензимидазолом (5,6-ДМБ). Наличие 5,6-ДМБ определяет активность молекулы корриноидов (синоним названия витаминов группы  $V_{12}$ ) для высших животных. Вместо 5,6-ДМБ микроорганизмы могут включать в молекулу другие бензимидазольные и пуриновые основания. Нуклеотидное ядро вообще может отсутствовать, как в случае фактора В.

Через 25 лет после открытия витамина  $V_{12}$  в 1972 г. в результате многолетних исследований был осуществлен полный химический синтез корриноидной структуры. Корриноид синтезирован в результате тридцати семи последовательных ступеней, но в силу сложности такого синтеза микробиологический метод остается пока единственным промышленным способом получения витамина  $V_{12}$ .

### 12.1.1. Продуценты витамина $V_{12}$

В природе витамин  $V_{12}$  и родственные корриноидные соединения находят в клетках микроорганизмов, в тканях животных и некоторых высших растениях (горох, лотос, побеги бамбука, листья и стручки фасоли). Однако происхождение витамина  $V_{12}$  в высших растениях окончательно не установлено. Такие низшие эукариоты, как дрожжи и мицелиальные грибы, корриноиды, по видимому, не образуют. Организм животных не способен к самостоятельному синтезу витамина. Среди прокариот способность к биосинтезу корриноидов широко распространена. Активно продуцируют витамин  $V_{12}$  представители рода *Propionibacterium*. Природные штаммы пропионовокислых бактерий образуют 1,0—8,5 мг/л корриноидов, но получен мутант *P. shermanii* М-82, с помощью которого получают до 58 мг/л витамина.

В семействе *Propionibacteriaceae* есть и другие представители, способные к высокому накоплению витамина  $V_{12}$  в клетках. Это прежде всего *Eubacterium limosum* (*Butyribacterium rettgerii*). Как продуценты витамина практический интерес имеют многие

представители актиномицетов и родственных микроорганизмов. Истинный витамин В<sub>12</sub> в значительных количествах синтезирует *Nocardia rugosa*. Путем мутаций и отбора получен штамм *N. rugosa*, накапливающий до 18 мг/л витамина В<sub>12</sub>. Активные продуценты витамина обнаружены среди представителей рода *Micromonospora*: *M. purpureae*, *M. echinospora*, *M. halophitica*, *M. fusca*, *M. chalconeae*. Высокой кобаламинсинтезирующей активностью обладают метаногенные бактерии, например *Methanosarcina barkeri*, *M. vacuolata* и отдельные штаммы галофильного вида *Methanococcus halophilus*. Последний организм синтезирует более 16 мг корриноидов на грамм биомассы. Столь высокого содержания корриноидов не отмечено ни у одного другого из изученных микроорганизмов. Причина высокого содержания корриноидов у метаногенных бактерий не установлена. Корриноиды синтезируют строго анаэробные бактерии из рода клостридий. У *Clostridium tetanomorphum* и *Cl. sticklandii* аденозилкобаламин входит в состав ферментных систем, катализирующих специфические реакции изомеризации таких аминокислот, как глутаминовая, лизин и орнитин. В значительных количествах образуют витамин В<sub>12</sub> ацетогенные клостридии *Cl. thermoaceticum*, *Cl. formicoaceticum* и *Acetobacter woodii*, синтезирующие ацетат из СО<sub>2</sub>.

Известны активные продуценты витамина В<sub>12</sub> у псевдомонад, среди которых лучше других изучен штамм *Pseudomonas denitrificans*. МВ-2436 — мутант, дающий на оптимизированной среде до 59 мг/л корриноидов. Штамм применяют для промышленного получения витамина В<sub>12</sub> на фирме Мерк в США. Интерес представляют термофильные бациллы, а именно *Bacillus circulans* и *Bac. stearothermophilus*, которые растут соответственно при 60 и 75 °С и за 18 ч культивирования без соблюдения стерильных условий дают высокие (2,0—6,0 мг/л) выходы витамина. Корриноиды синтезируют *Rhodopseudomonas palustris*, фототрофные пурпурные бактерии *Rhodobacter sphaericus*, *Rh. capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum*, *Chromatium vinosum* и ряд других видов. Наряду с витамином В<sub>12</sub> они образуют бескобальтовые корриноиды, роль которых для продуцентов не установлена. Значительные количества витамина В<sub>12</sub> образует цианобактерия *Anabaena cylindrica*, одноклеточные зеленые водоросли *Chlorella pyrenoidosa* и красные водоросли *Rhodosorus marinus*.

Продуценты витамина В<sub>12</sub> культивируют в средах, приготовленных на основе пищевого сырья: соевой муки, рыбной муки, мясного и кукурузного экстракта. В последние годы выявлены микроорганизмы, образующие высокие качества корриноидов при утилизации непищевого сырья. *Achromobacter* sp., используя изопропиловый спирт как источник углерода и энергии, накапливает до 1,1 мг/л провитамина, *Pseudomonas* sp. синтезирует витамин В<sub>12</sub> в среде с метанолом или пропандиолом (до 160 мкг/л), факультативный метилотроф (FM = O2T) образует в среде с метанолом до 2,6 мг/л витамина. Выделен штамм *Klebsiella* 101,

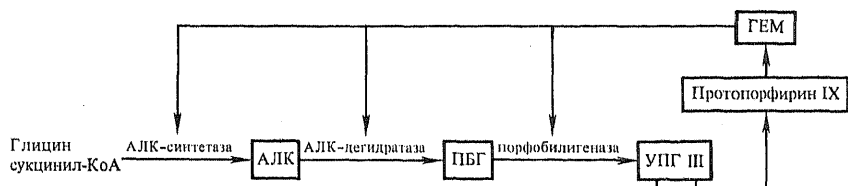


Рис. 12.1. Путь биосинтеза корриновой структуры витамина В<sub>12</sub>

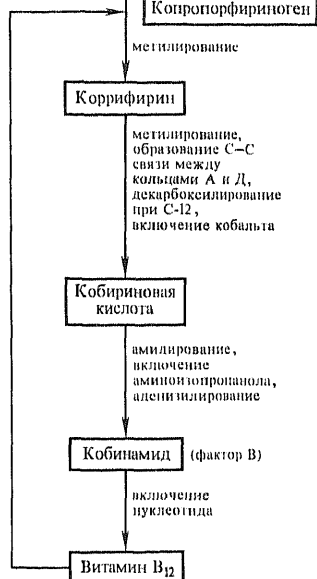
образующий большое количество корриноидов в клетках только при росте на среде с метанолом как единственном источнике углерода и энергии.

### 12.1.2. Биосинтез витамина В<sub>12</sub>

Каждая различаемая в молекуле витамина структура: корриноидное кольцо, нуклеотидное ядро и аминопропаноловый мостик — имеют свое происхождение. Механизм их возникновения — предмет интенсивных, но еще незавершенных исследований. Первые этапы биогенеза корриноидов те же, что и первые этапы синтеза других тетрапиррольных соединений (рис. 12.1). Общим

интермедиатом тетрапирролов является δ-аминолевулиновая кислота (δ-АЛК), образующаяся у большинства организмов в результате конденсации глицина и сукцинил-КоА. Однако *E. litomusum* и *S. tetanomorphum* не включают 2-<sup>14</sup>С-глицин в корриновое кольцо, что следовало бы ожидать, если бы глицин был предшественником δ-АЛК. Следовательно, уже на этом этапе путь синтеза витамина у бактерий может различаться.

Далее образуется порфобилиноген, возникающий при конденсации двух молекул δ-АЛК, а при конденсации четырех молекул порфобилиногена — уропорфириноген III (УПГ III). Последовательность реакций между УПГ III и кобировой кислотой получила экспериментальное подтверждение лишь в последние годы. Показано, что при нарушении процесса амидирования клетки *Propionibacterium shermanii* выделяют в среду соединения, названные коррифиринами — метилированные восстановленные производные уропорфирина III. К настоящему времени выделено и охарактеризовано три соединения: коррифин-1 (метилкоррифин), коррифин-2, или сирогидрохлорин (диметилкоррифин), и коррифин-3 или, изобактериохлорин (три-



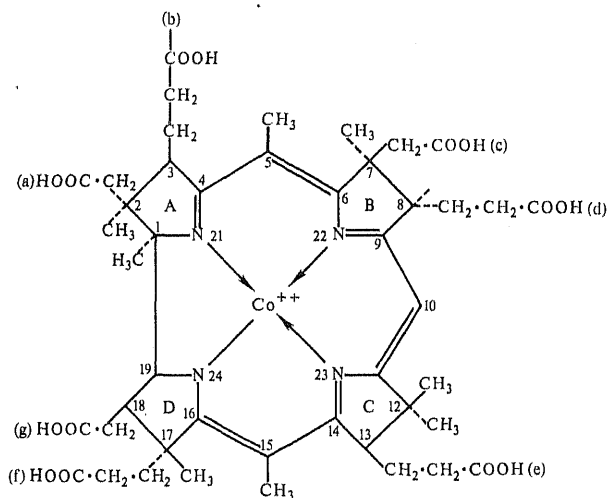
метилкоррифин). Меченая  $\delta$ -АЛК и метионин включаются в коррифирины, а последние — в витамин В<sub>12</sub>.

Метилирование УПГ III с одновременным декарбоксилированием боковой цепочки уксусной кислоты при С<sub>12</sub> кольца С приводит к расхождению путей биогенеза витамина В<sub>12</sub> и других тетрапирролов. В результате дальнейшего метилирования и образования С — С связи между кольцами А и Д синтезируется кобириновая кислота.

Донором семи метильных групп, включаемых в УПГ III, является S-аденозилметионин. Характер включения атома Со и образования непосредственной связи между кольцами А и Д неизвестен. На следующем этапе биосинтетического пути кобириновая кислота превращается в кобинамид (фактор В), при этом остатки карбоновых кислот кобириновой кислоты амидируются, а к остатку пропионовой кислоты кольца Д присоединяется аминпропанол. На этой же стадии происходит присоединение к корриновому кольцу 5-дезоксаденозилной группы и кобириновая кислота становится 5-дезоксаденозилкобинамидом (коферментная форма фактора В). Аминопропанол, видимо, образуется при декарбоксилировании L-треонина.

Далее кобинамид фосфорилируется с образованием кобинамидфосфата и, реагируя с гуанозинтрифосфатом (ГТФ), дает кобинамидгуанозиндифосфат. В коферментную форму кобинамидгуанозиндифосфата происходит включение нуклеотида и образование кобаламин-5'-фосфата.

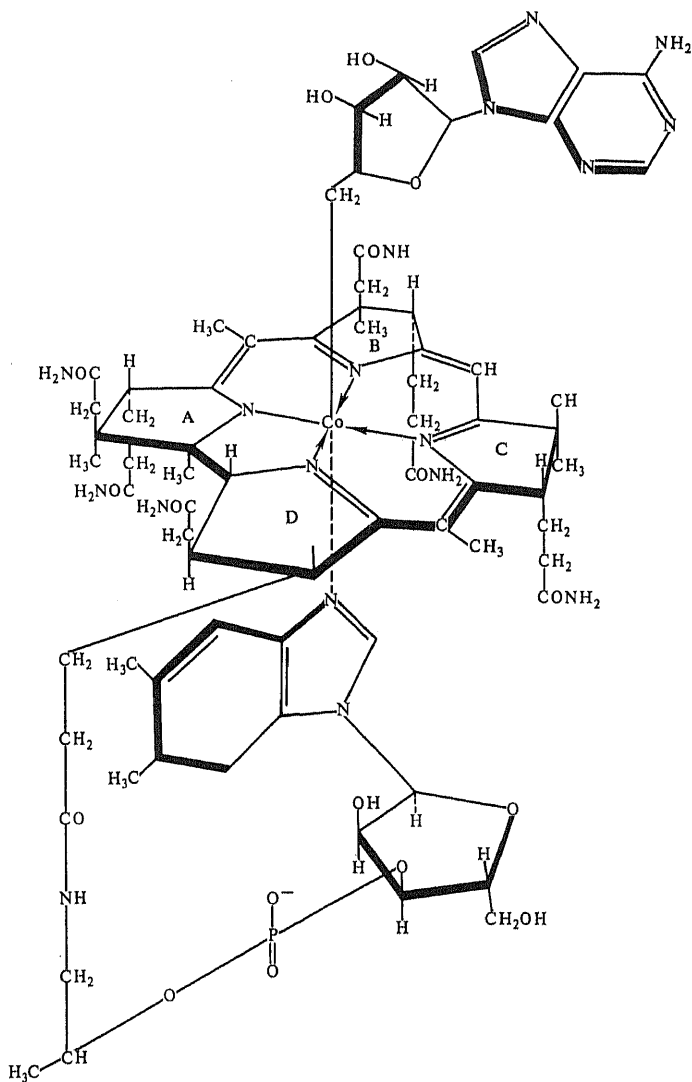
Витамин В<sub>12</sub>, как уже отмечалось выше, содержит специфическое азотистое основание — 5,6-ДМБ, которое в природе встречается только в этом соединении. Непосредственным предшественником 5,6-ДМБ служит рибофлавин. В молекулу витамина В<sub>12</sub> 5,6-ДМБ включается в виде  $\alpha$ -рибазол-5'-фосфата. При фер-



Кобириновая кислота

ментативном дефосфорилировании кобаламин-5'-фосфата образуется кобаламин. Последовательность реакций при синтезе кобаламина из кобинамида выглядит следующим образом:

- 1) кобинамид + АТФ → кобинамид-Ф + АДФ;
- 2) кобинамид-Ф + ГТФ → ГДФ-кобинамид + ФФ<sub>н</sub>;
- 3) кобинамид-ГДФ + α-рибазол-5'-фосфат → кобаламин-5'-фосфат + ГМФ;
- 4) кобаламин-5'-фосфат → кобаламин + Ф<sub>н</sub>.



Кофермент В<sub>12</sub>  
Коферментная форма I

Известны две коферментные формы витамина В<sub>12</sub>: аденозилкобаламин (коферментная форма I) и метилкобаламин (коферментная форма II). Более 80% всех синтезированных пропионовокислыми бактериями корриноидов находится в коферментной форме I, которая, как уже указывалось, в качестве лиганда содержит 5-дезоксаденозил.

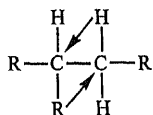
Источником аденозила служит АТФ. Коферментная форма содержит Со—С-связь и является первым кобальторганическим соединением, обнаруженным в живых системах. Метилкобаламин обычно содержится в клетках в незначительных количествах, но у *M. barkeri* метил-фактор III, который содержит в нуклеотидной части 5-оксибензимидазол, составляет до 80% от суммы всех корриноидов.

Регуляция биосинтеза витамина В<sub>12</sub> осуществляется по принципу репрессии. Витамин В<sub>12</sub> угнетает только свой собственный синтез, не оказывая влияния на образование других тетрапирролов и, как полагают, действует на стадии метилирования УПГ III. В качестве регулятора выступает лишь полная нуклеотидсодержащая молекула витамина. Гем оказывает координированную репрессию синтеза ферментов начальных стадий биогенеза тетрапирролов.

Функциональной формой витамина является аденозилкобаламин α-(5,6-диметилбензимидазолил)-Со-5-дезоксаденозилкобамид) и метилкобаламин (α(5,6-диметилбензимидазолил)-Со-метилкобамид).

### 12.1.3. Функции витамина В<sub>12</sub>

Описано пятнадцать биохимических реакций, катализируемых коферментными формами витамина — 5-дезоксаденозил-В<sub>12</sub> и СН<sub>3</sub>-В<sub>12</sub>. Все реакции, кроме рибонуклеотидредуктазной, катализируемые 5'-дезоксаденозил-В<sub>12</sub> (табл. 1), связаны с переносом водорода. При этом имеет место 1,2-гидридный сдвиг с одновременным перемещением группы в противоположном направлении:



В случае рибонуклеотидредуктазы роль донора и акцептора водорода выполняют различные молекулы.

Реакции, происходящие при участии СН<sub>3</sub>-В<sub>12</sub>, включают перенос метильных групп, и СН<sub>3</sub>-В<sub>12</sub> выступает в качестве интермедиата в реакциях трансметилирования. В организме животных и человека витамин В<sub>12</sub> участвует в образовании метионина из гомоцистеина и в изомеризации метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА.



**Т а б л и ц а 12.1. Ферментативные реакции, катализируемые аденозилкобаламином**

Ферменты	Реакции	Переносимая группа
Глутаматмутаза	L-трео-β-метиласпарат ↔ L-глутамат	—CH(NH <sub>2</sub> )COOH
Метилмалонил-КоА-мутаза	сукцинил КоА ↔ L <sub>R</sub> -метилмалонил-КоА	—COS-КоА
2-Метилэнглутаратмутаза	метилитаконат ↔ 2-Метилэнглутарат	—C(=CH <sub>2</sub> )COOH
L-β-Лизинмутаза	3,5-диаминогексаноат ↔ L-β-лизин	—NH <sub>2</sub>
D-α-Лизинмутаза	2,5-диаминогексаноат ↔ D-α-лизин	—NH <sub>2</sub>
D-α-Орнитинмутаза	2,4-диаминогексаноат ↔ D-α орнитин	—NH <sub>2</sub>
L-α-Лейцинмутаза	3-аминоизокапронат ↔ L-α лейцин	—NH <sub>2</sub>
1,2-Диолдегидратаза	этиленгликоль → ацетальдегид + H <sub>2</sub> O	—OH
Глицериндегидрогеназа	1,2-пропандиол → пропионовый альдегид + H <sub>2</sub> O	—OH
	Глицерин → 3-оксипропионовый альдегид + H <sub>2</sub> O	—OH
	Этиленгликоль → ацетальдегид + H <sub>2</sub> O	—OH
	1,2-Пропандиол → пропионовый альдегид + H <sub>2</sub> O	—OH
Этаноламиндезаминаза	Этаноламин → ацетальдегид + NH <sub>4</sub>	—NH <sub>2</sub>
	2-аминопропанол ↔ пропионовый альдегид + NH <sub>4</sub>	—NH <sub>2</sub>
Рибонуклеотидредуктаза	D-рибонуклеотид → D-2-дезоксирибонуклеотид + H <sub>2</sub> O	Нет

### 12.1.4. Получение и применение витамина В<sub>12</sub>

Мировая продукция витамина В<sub>12</sub> составляет 9—11 тыс. кг в год; из них 6500 кг используют на медицинские цели, а остальную часть — для животноводства. Производство витамина В<sub>12</sub> основано главным образом на культивировании пропионовокислых бактерий (в СССР, Великобритании, Венгрии), мезофильных и термофильных меганогенных бактерий (СССР, Венгрия), а также актиномицетов и родственных форм (Италия).

В нашей стране в качестве продуцента витамина В<sub>12</sub> используют *Propionibacterium freudenreichii* var. *shermanii*.

Для получения витамина В<sub>12</sub> бактерии культивируют периодическим методом в анаэробных условиях в среде, содержащей кукурузный экстракт, глюкозу, соли кобальта и сульфат аммония. Образующиеся в процессе брожения кислоты нейтрализуют раствором щелочи, которая непрерывно поступает в ферментер. Через 72 ч в среду вносят предшественник — 5,6-ДМБ. Без

искусственного введения 5,6-ДМБ бактерии синтезируют фактор В и псевдовитамин В<sub>12</sub> (азотистым основанием служит аденин), не имеющие клинического значения.

Ферментацию заканчивают через 72 ч. Витамин В<sub>12</sub> сохраняется в клетках бактерий. Поэтому после окончания брожения биомассу сепарируют и экстрагируют из нее витамин водой, подкисленной до рН 4,5—5,0 при 85—90 °С в течение 60 мин с добавлением в качестве стабилизатора 0,25 %-ной NaNO<sub>2</sub>. При получении Ко-В<sub>12</sub> стабилизатор не добавляют.

Водный раствор витамина В<sub>12</sub> охлаждают, доводят рН до 6,8—7,0 50 %-ным раствором NaOH. К раствору добавляют Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·18H<sub>2</sub>O и безводный FeCl<sub>3</sub> для коагуляции белков и фильтруют через фильтр-пресс.

Очистку раствора проводят на ионообменной смоле СГ-1, с которой кобаламины элюируют раствором аммиака. Далее проводят дополнительную очистку водного раствора витамина органическими растворителями, упаривание и очистку на колонке с Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. С окиси алюминия кобаламины элюируют водным уксетом. При этом Ко-В<sub>12</sub> может быть отделен от CN- и оксикобаламина.

К водно-уксетоному раствору витамина добавляют ацетон и выдерживают при 3—4 °С 24—48 ч. Выпадающие кристаллы витамина отфильтровывают, промывают сухим ацетоном и серным эфиром и сушат в вакуум-эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Для предотвращения разложения Ко-В<sub>12</sub> все операции необходимо проводить в сильно затемненных помещениях или при красном свете. Таким образом, можно получить не только смесь CN- и оксикобаламинов, но и коферментную форму, которая обладает высоким терапевтическим эффектом.

Для химической очистки витамина В<sub>12</sub> используется его способность образовывать аддукты с фенолом и резорцином. При этом способе отделение витамина В<sub>12</sub> от сопутствующих ему факторов упрощается. Промышленный концентрат цианкобаламина обрабатывают водным раствором резорцина (или фенола), выделяют комплекс витамина В<sub>12</sub> с резорцином (или фенолом), далее разлагают его и получают кристаллический препарат.

Промышленность СССР выпускает различные формы лечебных препаратов кобаламинов: ампулы со стерильным раствором CN-В<sub>12</sub>, приготовленного на 0,9 %-ном растворе NaCl, таблетки CN-В<sub>12</sub> в смеси с фолиевой кислотой, таблетки (муковита), содержащие CN-В<sub>12</sub> и мукопротенд (внутренний фактор).

Лечебные препараты в ампулах: камполон, антианемин и гепавит — содержат водный экстракт печени крупного рогатого скота.

Перспективны исследования по мутагенезу пропанонокислых бактерий как один из способов повышения продуктивности штамма, а также проверки и внедрения в производственные условия других продуцентов, растущих на дешевом непищевом сырье.

Промышленное получение в СССР витамина В<sub>12</sub> с помощью пропионовокислых бактерий позволяет полностью удовлетворить потребности медицины в нашей стране.

Для обогащения кисломолочных продуктов витамином В<sub>12</sub> используют пропионовокислые бактерии как в чистом виде, так и в виде концентрата, приготовленного на молочной сыворотке.

Для нужд животноводства витамин В<sub>12</sub> получают, используя смешанную культуру, содержащую термофильные метанообразующие бактерии. Установлено образование корриноидов не только в смешанной, но и в чистой культуре метанообразующих бактерий *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium formicum*, *Mb. thermoautotrophicum* при росте в присутствии Н<sub>2</sub> и СО<sub>2</sub>. Содержание корриноидов у метанообразующих бактерий составляет 1,0—6,5 мг/г сухой биомассы.

С помощью смешанной культуры метанообразующих бактерий в СССР разработан метод получения кормового препарата витамина В<sub>12</sub>-КМБ<sub>12</sub>.

Субстратом для метанового брожения служит ацетоно-бутиловая и спиртовая барда.

Ацетоно-бутиловую барду получают в результате удаления растворителей из культуральной жидкости *Clostridium acetobutylicum*, сбрасывающей паточно-мучные заторы. Для метанового брожения используют декантат барды, содержащий 2,0—2,5 % сухих веществ. К декантированной барде добавляют 4 г/м<sup>3</sup> СоСl<sub>2</sub> и 0,5% метанола как стимуляторы синтеза кобаламинов. В качестве биостимуляторов вносят также карбамид и диаммонийфосфат, 5,6-ДМБ не вносят, поскольку CN=В<sub>12</sub> и фактор III, обладающие биологической активностью, составляют до 80 % от суммы всех корриноидов.

Исходная барда имеет температуру около 100 °С и практически стерильна. Перед поступлением в ферментеры барда охлаждается до 55—57 °С. В качестве исходной культуры используют смешанную культуру метанообразующих бактерий, осуществляющих термофильное «метановое брожение» сточных вод.

Получение концентрата витамина В<sub>12</sub> включает следующие технологические стадии: непрерывное сбрасывание барды комплексом бактерий, сгущение метановой бражки и сушку сгущенной массы на распылительной сушилке. Брожение проводят в железобетонных ферментерах непрерывным способом в течение года.

Важное условие нормального процесса брожения — контроль уровня жирных кислот и аммонийного азота. Витамин В<sub>12</sub> неустойчив при тепловой обработке, особенно в щелочной среде. Поэтому перед выпариванием к метановой бражке добавляют HCl до оптимального значения pH 5,0—5,3 и сульфит Na (оптимальное содержание 0,07—0,1 %).

Перед поступлением на установку выпаривания метановая бражка дегазируется путем нагревания до 90—95 °С при атмосферном давлении. Бражку сгущают до 20 % сухих веществ в

четырекорпусных выпарных аппаратах. Сгущенная метановая бражка высушивается на распылительной сушилке.

Технологическая схема представлена на рис. 12.2. Ацетонобутиловая барда из нижней части бражной колонны поступает в сборник барды 1 и насосом подается в декантатор 3. Отстой барды собирается в сборнике 4 и используется на корм скоту. Декантат, охлажденный до температуры 55—57 °С, метанол и хлористый кобальт поступают в ферментер 12. Сброженную массу из верхней части ферментера отбирают и направляют в реактор 19, где осуществляют стабилизацию витамина В<sub>12</sub> путем добавления сульфита натрия и соляной кислоты, смешанных в смесителе 18. Из стабилизированной бражки удаляют газы в сепараторе газов 22, бражку упаривают в выпарной установке 24 и собирают в сборниках 26. Сгущенная метановая бражка перекачивается насосом 27 в сборник метановой бражки 28, а оттуда насосом 29 в распылительную сушилку 31.

В качестве теплоносителя для сушки используют газы брожения, сжигаемые в печи 39. Сухой порошок поступает в бункер 33 и расфасовывается в полиэтиленовые мешки, вложенные в крафт-пакеты.

Отсутствие промышленных отходов, доступность сырья, непрерывность метода, не требующего стерильных условий, делают его экономичным.

Кормовой витамин В<sub>12</sub> получают в Советском Союзе на Грозненском ацетоновом и Ефремовском биохимическом заводах. Для производства витамина В<sub>12</sub> предусмотрены и за последнее время внедрены системы автоматизации основных стадий технологического процесса.

Сухой концентрат КМБ-12, помимо витамина В<sub>12</sub> (100 мг/кг препарата), содержит ряд других ростстимулирующих веществ. Особенно хорошие результаты в животноводстве получают при сочетании витамина В<sub>12</sub> с малыми дозами антибиотиков, в частности с биомцином. Реализация в нашей стране описанного способа и получение концентрата витамина В<sub>12</sub> позволили полностью обеспечить животноводство этим витамином.

В США почти все вырабатываемые комбикорма для свиней и птиц обогащают витамином В<sub>12</sub>. Показано, что белок животного происхождения можно заменить растительным белком при условии обогащения кормосмесей витаминов В<sub>12</sub> в дозе 60 мкг/кг.

Украинским научно-исследовательским институтом спиртовой и ликеро-водочной промышленности разработана технология получения кормового концентрата витамина В<sub>12</sub> путем сбраживания меласно-спиртовой барды смешанной культурой метанообразующих бактерий. Предварительно на меласно-спиртовой барде выращивают кормовые дрожжи. После сепарирования дрожжей получают культуральную жидкость, содержащую 7—8 % сухих веществ. На этой жидкости выращивают метанообразующие бактерии и получают с 1 м<sup>3</sup> исходной барды 1,5—2 г витамина В<sub>12</sub>.

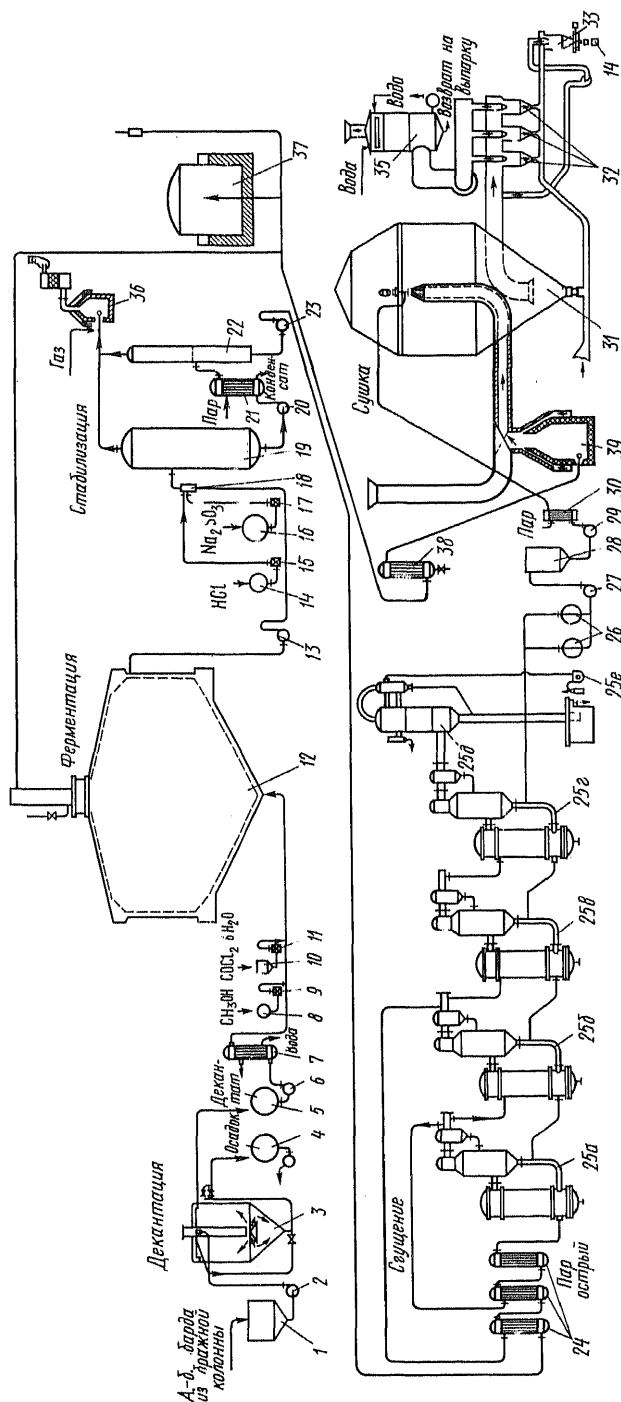


Рис. 12.2. Технологическая схема получения концентрата витамина В<sub>12</sub> с помощью смешанной культуры метанообразующих бактерий:

1 — сборник барды; 2 — насос для барды; 3 — декантатор барды; 4 — сборник стуженой барды; 5 — сборник декантата барды; 6 — насос для декантата барды; 7 — холодильник для охлаждения декантата барды; 8 — сборник-мерник метанола; 9 — насос-дозатор метанола; 10 — сборник-мерник раствора хлористого кобальта; 11 — насос-дозатор раствора хлористого кобальта; 12 — ферментатор для метанола брожения; 13 — насос-дозатор метанола брожения; 14 — сборник-мерник соляной кислоты; 15 — насос-дозатор соляной кислоты; 16 — сборник-мерник раствора сульфата натрия; 17 — насос-дозатор раствора сульфата натрия; 18 — смеситель метановой бражки; 19 — реактор для стабилизации витамина В<sub>12</sub> в метановой бражке; 20 — насос для стабилизированной метановой бражки; 21 — подогреватель стабилизированной метановой бражки; 22 — сепаратор газов, выделяющихся из метановой бражки; 23 — насос для подачи стабилизированной метановой бражки на вылазную установку; 24 — подогреватель установочной вакуум-насос; 25 — выпарная установка для стужения метановой бражки; (а — I корпус, б — II корпус, в — III корпус, г — IV корпус, д — барометрический конденсатор, е — вакуум-насос); 26 — насос для стуженой метановой бражки; 27 — насос для стуженой метановой бражки; 28 — подогреватель стуженой метановой бражки; 29 — насос для стуженой метановой бражки (передаточный); 30 — насос для стуженой метановой бражки; 31 — насос для стуженой метановой бражки; 32 — насос для стуженой метановой бражки; 33 — бункер сухого концентрата; 34 — расфасовка в мешки; 35 — скруббер для очистки воздуха; 36 — центробежный пылесос; 37 — газгольдер для газов брожения; 38 — холодильник для отделения воды из газов брожения; 39 — газовая печь, распылительной сушки.

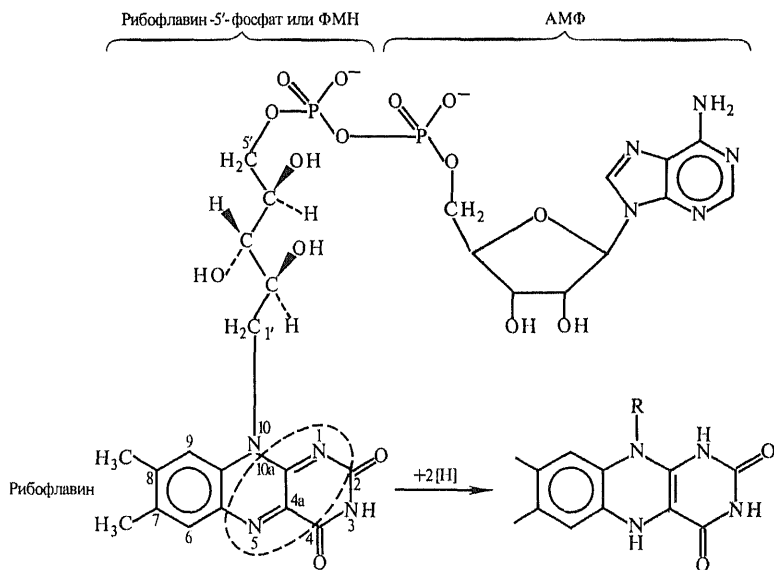
Культуральную жидкость упаривают до содержания 60—70 % сухих веществ, смешивают с наполнителем и высушивают. В качестве наполнителя используют кукурузную муку, отруби и т. п. Сухой концентрат размалывают и расфасовывают в мешки. В 1 кг кормового концентрата содержится: витамина В<sub>12</sub> 18—20 мг, В<sub>2</sub> 41 мг, РР 146 мг и другие витамины. Срок хранения 12 мес.

Испытания препарата многими научно-исследовательскими учреждениями и хозяйствами показали эффективность его применения в свиноводстве и птицеводстве.

В последние годы в Японии продемонстрирована возможность получения витамина В<sub>12</sub> с использованием иммобилизованных клеток пропионовокислых бактерий, которые в результате мутаций выделяют витамин в среду. Разрабатываются принципиально новые методы биосинтеза витамина В<sub>12</sub> путем трансформации химически близких ему соединений, например уропорфирина III клетками пропионовокислых бактерий и артробактера, а также получение новых аналогов витамина В<sub>12</sub>.

## 12.2. РИБОФЛАВИН

Рибофлавин (витамин В<sub>2</sub>, 7,8-диметил-10-(1'-D-рибитил-изоаллоксазин) был выделен в кристаллическом виде в 1933 г. В основе строения флавинов, к которым относится рибофлавин, лежит гетероциклическая изоаллоксазиновая система, представленная тремя конденсированными циклами: ароматическим (А), пиазиновым (В) и пиримидиновым (С). К азоту пиазинового кольца присоединен спирт рибит.



Рибофлавин функционирует в коэнзимных формах, представляющих собой его фосфорные эфиры: флавиномононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД). В последние десятилетия открыты новые биокаталитические факторы изоаллоксазиновой структуры, функциональные группы которых представлены модифицированными молекулами РФ, ФМН, ФАД.

Новые природные аналоги РФ входят в состав простетических групп многих флавопротеидов.

### 12.2.1. Продуценты рибофлавина

Продуцентами рибофлавина в природе являются высшие растения, дрожжи, мицелиальные грибы и бактерии. Большинство микроорганизмов образует свободный рибофлавин и две его коферментные формы — ФМН и ФАД. Из многих бактерий и плесневых грибов выделены аналоги РФ и их коферментные формы. Основной формой флавинов, выделяемых микроорганизмами в среду, является РФ.

Изучение особенностей биосинтеза РФ различными группами микроорганизмов показало, что он, как правило, образуется в больших количествах, чем нужно для удовлетворения потребности клетки в этом витамине.

Среди прокариот флавиногенной группой считают микобактерии и ацетонабутиловые бактерии. Из актиномицетов значительные количества РФ синтезируют *Nocardia eritropolis*. Среди плесневых грибов наиболее активные продуценты рибофлавина — грибы рода *Aspergillus* и вид *A. niger*.

Использование мицелия грибов как препарата флавинов экономично — мицелий является отходом антибиотической промышленности.

Активные продуценты рибофлавина *Eremothecium ashbyii*, *Ashbyii gossypii*, образующие игольчатые аскоспоры, дрожже-

Т а б л и ц а 12.2. Микроорганизмы, образующие значительные количества рибофлавина и влияние железа на выход витамина\*

Микроорганизм	Выход рибофлавина, мг/л	Оптимальная концентрация железа, мг/л
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	97	1—3
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	58	Не существенна
<i>Mycocandida riboflavina</i>	200	» »
<i>Candida flaveri</i>	567	0,04—0,06
<i>Eremothecium ashbyii</i>	2480	Не существенна
<i>Ashbyii gossypii</i>	6420	» »

\* Из книги Economic microbiology, 1978, V. 2, п. 312.

подобные грибы, входящие в класс Ascomycetes, порядок Endomycetales, семейства Spermophytogaceae. Описан ряд способов получения кормовых и кристаллических препаратов РФ с использованием указанных микроорганизмов.

Активные продуценты рибофлавина, которые имели ранее или имеют в настоящее время практическое применение, представлены в табл. 12.2. Там же приведены концентрации железа, оптимальные для образования витамина.

### 12.2.2. Биосинтез рибофлавина

Путь синтеза рибофлавина (рис. 12.3) установлен в результате исследований, выполненных с грибом *Eremothecium ashbyii*, на мутантах *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia guilliermondii* и мутантах бактерий *Bac. subtilis*. Расшифровке пути способствовали исследования с мечеными соединениями и осуществление ранних реакций биосинтеза *in vitro*. Предшественником РФ служит гуанозинтрифосфат (ГТФ). Пуриновое кольцо ГТФ локализуется в гетероциклическом ядре РФ, а рибозное ядро включает в рибитильную цепь РФ.

На 1-й ступени под действием фермента ГТФ-циклогидролазы II из имидазольного кольца ГТФ удаляется С-8. Продуктами первой ступени являются формиат, пирофосфат и 2,5-диамино-4-гидрокси-6-рибозиламинопиримидин-5'-фосфат. Рибозное ядро ГТФ восстанавливается. На втором этапе биогенеза при участии соответствующей редуктазы происходит восстановление рибозы последнего соединения (II) с образованием 2,5-диамино-4-гидрокси-6-рибитиламинопиримидин-5'-фосфата (III), которое при дезаминировании дает 2,4-дигидрокси-5-амино-6-рибитиламинопиримидин-5'-фосфат (IV).

На следующей ступени происходит включение четырех углеродных атомов с образованием птеридина — 6,7-диметил-8-рибитиллюмазина (V). Это соединение выделено из *E. ashbyii*, *A. gossypii*, *Cl. acetobutylicum*, представителей видов *Candida*. Показано, что донором четырех углеродных атомов может быть рибозо-5-фосфат или его метаболит. Перед включением в птеридин (V) пиримидиновый интермедиат (IV) подвергается дефосфорилированию. На последнем этапе две молекулы 6,7-диметил-8-рибитиллюмазина при участии рибофлавинсинтазы реагируют между собой с образованием рибофлавина (VI) и 2,6-дигидрокси-5-амино-6-рибитиламинопиримидина (VII). Последнее соединение (VII), видимо, вновь включается в реакцию синтеза 6,7-диметил-8-рибитиллюмазина (рис. 12.3).

В соответствии с рассмотренными ступенями биосинтеза РФ имеется пять групп биохимических мутантов (*Sacch. cerevisiae* и *P. guilliermondii*). Первая группа мутантов (rib 1) не накапливала в среде пиримидинов и птеридинов, по-видимому, вследствие блокирования 1-й реакции флавиногенеза. Мутанты второй



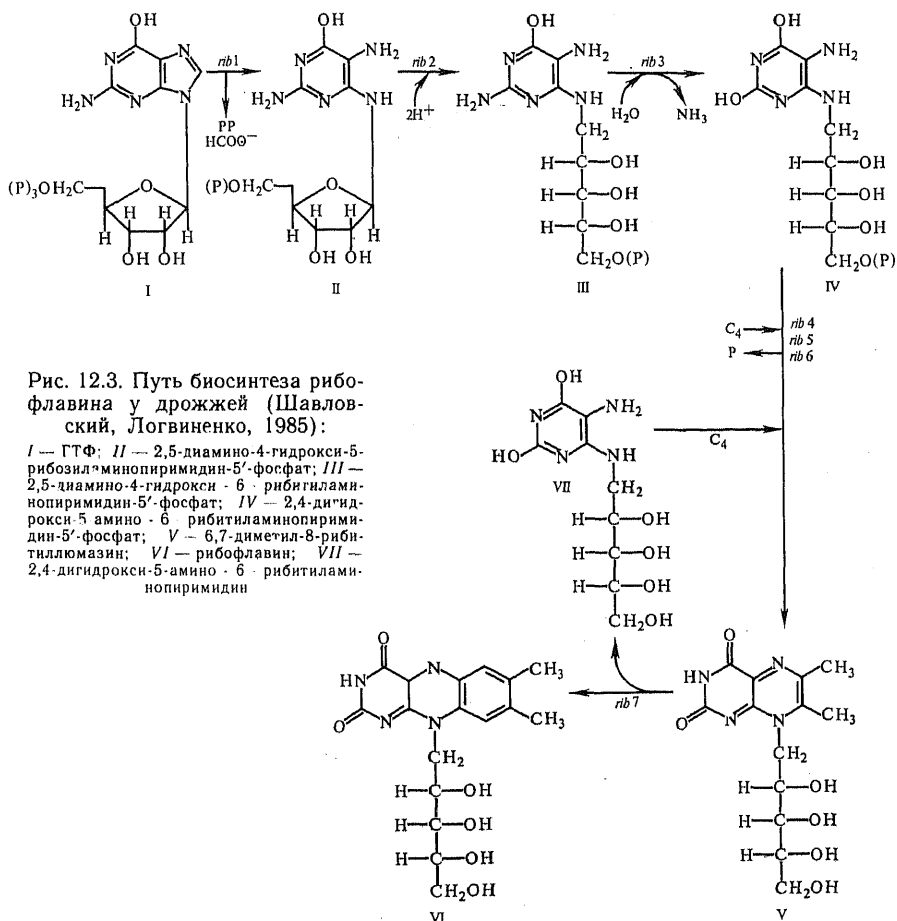


Рис. 12.3. Путь биосинтеза рибофлавина у дрожжей (Шавловский, Логвиненко, 1985):

I — ГТФ; II — 2,5-диамино-4-гидрокси-5-рибозил-аминопиримидин-5'-фосфат; III — 2,5-диамино-4-гидрокси-6-рибитиламинопиримидин-5'-фосфат; IV — 2,4-дигидрокси-5-амино-6-рибитиламинопиримидин-5'-фосфат; V — 6,7-диметил-8-рибитиллюмазин; VI — рибофлавин; VII — 2,4-дигидрокси-5-амино-6-рибитиламинопиримидин

группы (rib 2) накапливали 2,5,6-триамино-4-гидроксипиримидин или его рибозилированное производное. После взаимодействия с диацетилом эти соединения превращаются в 6,7-диметилптерин.

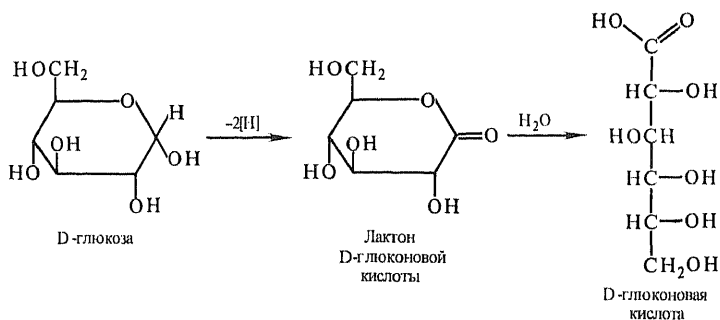
Мутанты третьей группы (rib 3) аккумулировали 2,5-диамино-4-гидрокси-6-рибитиламинопиримидин, дающий в результате взаимодействия с диацетилом 6,7-диметил-8-рибитиллюмазин, флуоресцирующий зеленым цветом. Мутанты четвертой группы (rib 4, rib 5, rib 6) накапливали 2,4-дигидрокси-5-амино-6-рибитиламинопиримидин, так как не синтезировали люмазиновый интермедиат (V), а мутанты пятой группы (rib 7) выделяли в среду 6,7-диметил-8-рибитиллюмазин.

Образование ФМН происходит в реакции: рибофлавин + АТФ → ФМН + АДФ. ФАД образуется из ФМН по схеме: ФМН + АТФ ↔ ФАД + рибофлавин.

### 12.2.3. Реакции, катализируемые флавопротеидами

Флавиносодержащие ферменты катализируют окисление:

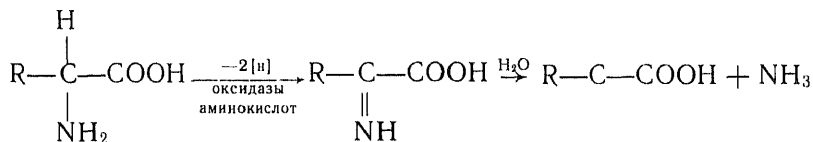
1) полуацеталей в лактоны:



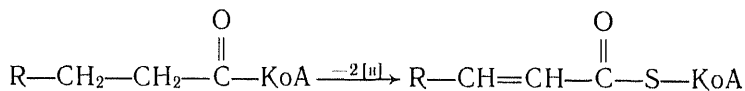
2) спиртов в альдегиды;



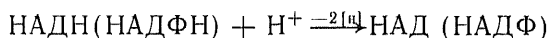
3) аминов в имины:



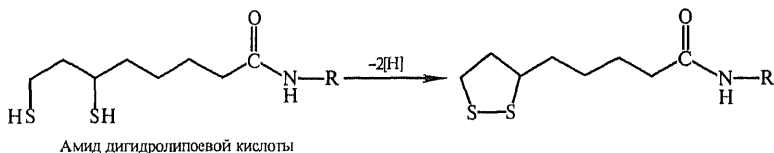
4) карбонильных соединений или карбоновых кислот в  $\alpha$ -,  $\beta$ -ненасыщенные карбонильные соединения:



5) НАДН и НАДФН в цепи переноса электронов:



6) дитиолов в дисульфиды:



Первые три типа реакции сопровождаются восстановлением флавинов, которые реокисляются молекулярным кислородом. АТФ в этих реакциях не образуется.

Четвертый тип реакций имеет важное значение в энергетическом метаболизме клеток и реализуется при функционировании сукцинатдегидрогеназы и дегидрогеназ ацил-КоА-производных жирных кислот.

Пятую реакцию катализируют НАДН<sub>2</sub> и НАДФН<sub>2</sub> дегидрогеназы электронтранспортной цепи.

Реакции шестого типа катализируют три фермента: дегидролипондегидрогеназа, глутатионредуктаза и тиоредоксинредуктаза. Эти ферменты катализируют превращение сульфгидрильных групп субстрата в дисульфидные (первый фермент) и обратную реакцию (два других фермента).

Из микробиологических объектов выделен ряд модифицированных форм РФ, входящих в состав ферментов. Так, из электрон-переносящего флавопротеина *Peptostreptococcus elsdonii* выделили 6-окси-ФАД.

8 $\alpha$ -(N-3-гистидил)-РФ, как было недавно установлено, входит в состав сукцинатдегидрогеназы *Vibrio succinogenes*, D-6-оксиникотиноксидазы, выделенной из *Arthrobacter oxidans*.

В НАДН дегидрогеназе *P. elsdonii* обнаружена новая оранжевая флавиновая простетическая группа — 8-окси(нор)-ФАД.

6-S-цистеинил-ФМН является коферментом бактериальной триметиламинодегидрогеназы, катализирующей окислительное деметилирование триметиламина с образованием диметиламина и формальдегида.

8-Диметиламино(нор)-РФ — розеофлавин — антибиотик, образуемый *Streptomyces davawensis*. Показано, что розеофлавин оказывает ингибирующее действие на синтез 6,7-диметил-8-рибитиллюмазина и рибофлавинсинтетазу *Bac. subtilis*. Выделены мутанты, устойчивые к розеофлавинолу и синтезирующие высокие количества РФ. Поэтому полагают, что розеофлавин в виде своих фосфорилированных форм входит в состав соответствующих флавопротеидов микробной клетки.

Из грибов *Shizophyllum commune* выделены шизофлавины, представляющие собой 5-формил (дезоксиметил)-РФ и 5'-карбокси (дезоксиметил)-РФ. Предполагают участие шизофлавинов в синтезе малата у продуцента.

У метаногенных бактерий и *Str. griseus* обнаружен фактор F<sub>420</sub>, в состав которого входит 8-гидрокси-5-дезафлавин. Он участвует в транспорте электронов в процессе метаногенеза. Предшественник рибофлавина 6,7-диметил-8-рибитиллюмазин входит в состав фактора КоМ F<sub>430</sub>, также обнаруженного у метаногенных бактерий, а также у фотобактерий, у последних он принимает участие в биолюминесценции.

#### 12.2.4. Получение и применение рибофлавина

В Советском Союзе кормовой концентрат РФ получают с помощью гриба *Eremothecium ashbyii*.

Недостаток культуры *E. ashbyii* — ее нестабильность. При

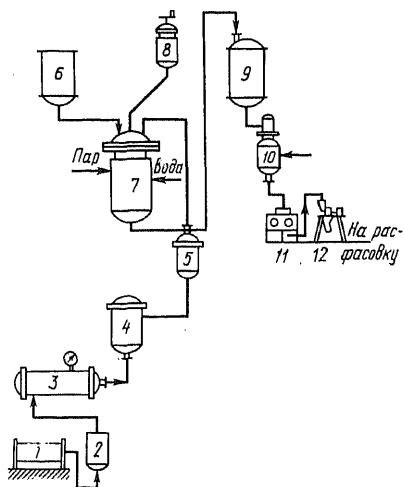


Рис. 12.4. Технологическая схема получения кормового концентрата рибофлавина с помощью *Eremothecium ashbyii*: 1 — компрессор воздуха, 2 — маслоотделитель, 3 — ресервуар, 4 — фильтр головной, 5 — инокулятор, 6 — смеситель, 7 — ферментер, 8 — инокулятор, 9 — сборник культуральной жидкости, 10 — выпарной аппарат, 11 — распылительная сушилка, 12 — дробилка

хранении на твердых средах при комнатной, низкой температуре и даже в процессе лиофилизации гриб легко теряет способность к сверхсинтезу РФ.

Для сохранения штамма *E. ashbyii* в активном состоянии в течение длительного времени (8—10 месяцев) рекомендуется производить систематический рассев на твердые питательные среды и отбирать наиболее интенсивно окрашенные в оранжевый цвет колонии. Яркая окраска колоний коррелирует с высокой рибофлавинсинтетической способностью.

При подготовке инокулята гриб пересевают последовательно по схеме: посев на скошенную агаризованную среду в пробирке → в жидкую среду → в колбы → в бутылки → в инокулятор.

Среда для пробирок содержит соевую муку, свеклович-

ный сахар, агар, pH 6,8 (1-й вариант) или дрожжевой экстракт, пептон, глюкозу, агар, pH 6,8 (2-й вариант). Время выращивания 5—7 сут.

Среда для колб и бутылей содержит: соевую муку, свекловичный сахар (1-й вариант) или пептон, свекловичный сахар, кукурузный экстракт,  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , подсолнечное масло (2-й вариант). Время выращивания 48 ч.

Среда в инокуляторе содержит кукурузный экстракт, свекловичный сахар,  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , технический жир.

Технологическая схема получения кормового препарата РФ представлена на рис. 12.4. В инокуляторе 8 культуру выращивают в течение 21—26 ч, затем переводят ее в ферментер 7 с питательной средой, содержащей: кукурузную муку, соевую муку, кукурузный экстракт, свекловичный сахар,  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  и технический жир. Среду стерилизуют в смесителе 6 при 120—122 °С в течение часа.

Культивирование в ферментере ведут до начала лизиса клеток и появления спор (определяют микроскопически). Температура культивирования 28—30 °С, давление воздуха в ферментере  $(1—2) \cdot 10^4$  Па, расход воздуха 1,5—2,0 л в минуту на 1 л культуральной жидкости. Выход РФ около 1200 мкг/мл.

Для получения кормового препарата РФ культуральную жидкость упаривают под вакуумом 10 до содержания 30—40% сухих

веществ. Сироп высушивают в распылительной сушилке 11, сухую пленку дробят в дробилке 12 до состояния порошка, который расфасовывают.

Усовершенствование процесса производства РФ осуществляется в направлениях: 1) селекции мутантных штаммов, 2) оптимизации состава и удешевления сред, 3) оптимизации условий культивирования продуцента.

Препарат кормового витамина В<sub>2</sub> — смесь биомассы мицелия *E. ashbyii* и сухих веществ среды — содержит не менее 15 мг рибофлавина в одном грамме, а также витамины В<sub>1</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, никотиновую кислоту и 20% белка. Содержание влаги не более 8%.

В Советском Союзе путем амплификации генов рибофлавинового оперона в клетках *Bac. subtilis* получен штамм, синтезирующий в среде, содержащей мелассу, белково-витаминный концентрат и его гидролизат, либо дрожжевой экстракт, около 6 г/л рибофлавина.

Наиболее богатым источником ФАД служит гриб *E. ashbyii*. В Японии запатентован способ, позволяющий получить более 600 мг/л ФАД из его биомассы.

Участие флавинов в многообразных биохимических реакциях позволяет понять важную роль этих соединений в обмене веществ высших и низших организмов.

Потребность человека в витамине В<sub>2</sub> 2—2,5 мг/сут. Витамин В<sub>2</sub> поступает в организм с пищей (рибофлавином богато молоко, яичный желток, печень, дрожжи) и в результате жизнедеятельности кишечной микрофлоры.

В медицине применяют витамин В<sub>2</sub> в виде витаминных препаратов при недостаточном содержании его в рационе, а также путем инъекций ФМН и ФАД при патологических явлениях, связанных с нарушением обмена флавиновых нуклеотидов.

ФМН и ФАД (флавинат) применяют при лечении дистрофии сетчатки глаза, а также при заболеваниях печени и поджелудочной железы.

В качестве препаратов пролонгированного действия используют сложные эфиры РФ. Они имеют стимулирующее влияние на углеводный и липидный обмен.

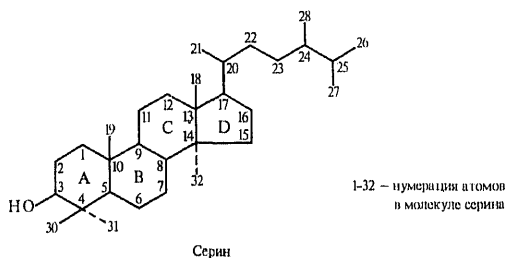
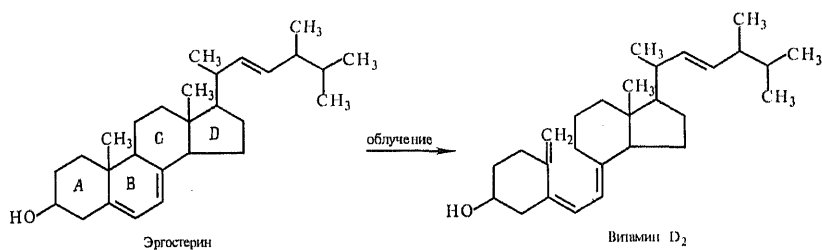
Витамином В<sub>2</sub> витаминизируют некоторые сорта белого хлеба. Его используют также для окраски в оранжево-желтый цвет пищевых продуктов. Среди производных изоаллоксазинов имеются соединения, обладающие противоопухолевым и противовоспалительным действием.

Очень важна хорошая обеспеченность флавинами кормов животных и птиц. Комбикорма должны содержать 5—6 г РФ на тонну. Добавки витамина В<sub>2</sub> в корма обеспечивают нормальный рост животных, высокую яйценоскость кур и выживаемость цыплят.

### 12.3. ЭРГОСТЕРИН

Эргостерин — эргоста-5,7,22-триен-3 $\beta$ -ол\* — исходный продукт производства жирорастворимого витамина D<sub>2</sub> и кормовых препаратов, обогащенных витамином D<sub>2</sub>. В группу витаминов D объединяют родственные соединения, важнейшими из которых являются витамины D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub>, обладающие антирахитическим действием. Витамин D<sub>2</sub> (эргокальциферол) образуется при облучении ультрафиолетовым излучением эргостерина, витамин D<sub>3</sub> (холекальциферол) образуется из 7-дегидрохолестерина. В организме человека и животных эти соединения регулируют усвоение кальция и фосфора из пищи и отложение их в костной ткани.

В основе структуры эргостерина и витамина D лежит четыре углеродных цикла (A, B, C, D). В случае витамина D кольцо B



разомкнуто. Углеводородная структура эргостерина и витамина D определяет их липофильные свойства.

#### 12.3.1. Продуценты эргостерина

Источником эргостерина являются фитопланктон, бурые и зеленые водоросли, но особенно богаты эргостерином дрожжи и плесневые грибы, которые и служат сырьем для его промышленного получения. Эргостерин — основной стерин дрожжей, на который приходится 60—90% от других стерина: содержание эргостерина составляет 0,2—0,5%, но в некоторых случаях достигает 10% от сухой биомассы дрожжей.

Культурные расы дрожжей всегда богаче стеринами, чем дикие; наибольшее количество стеринов содержат пекарские и пивные дрожжи. В отношении эргостеролсинтезирующей способности (% эргостерола в абсолютно сухих дрожжах) дрожжи при поверхностном культивировании располагаются в следующем порядке: *Saccharomyces carlsbergensis* (0,49—4,3), *S. ellipsoideus* (1,2—1,5), *Rhodotorula glutinis* (0,7—0,9), *Candida utilis* (0,4—0,6), *C. tropicalis* (0,2—0,3). В мицелии грибов *Aspergillus* и *Penicillium* содержание стеринов может достигать 1,2—1,4 % (*P. westlingii* около 2,20 %) в расчете на сухой мицелий.

Бактерии, как правило, синтезируют ничтожные количества стеринов. Обычно содержание стеринов (и сквалена) в их клетках составляет 0,001—0,1 мг/г сухой биомассы. Стерины обнаружены у *Lactobacillus arabinosus*, *L. pentosus*, *Escherichia coli*, *Azotobacter chroococcum*, *Micromonospora* sp., *Streptomyces griseus*, *Sphaerotillis natans*, *Rhodospirillum rubrum*. Но известны два представителя бактерий: *Halobacterium cutirubrum* и *Methylococcus capsulatus*, синтезирующих высокие количества сквалена (1,0 и 5,5 мг соответственно на грамм сухих клеток). Сквален и его четыре гидроформы выделены из метанообразующей бактерии *Methanobacillus kuznetsovii*.

В клетках *Mycobacterium rubrum* обнаружен холестерин (7—8 % от общего количества липидов).

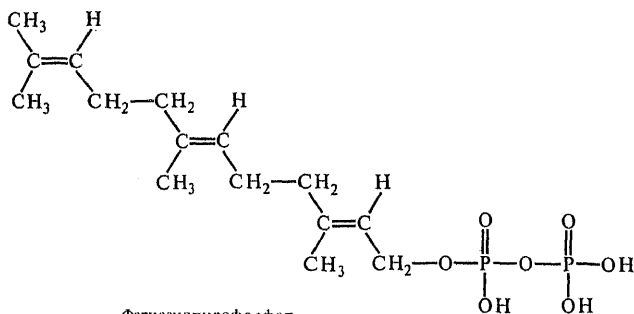
### 12.3.2. Биосинтез эргостерина

Стерины, каротиноиды, соединения групп Q-коферментов относятся к терпенам, имеют общий путь биосинтеза, подчиняющийся «изопреновому правилу». В соответствии с этим правилом каротиноиды (политерпены), стерины (тритерпены), а также убихиноны и гиббереллиновая кислота синтезируются из изопреновых единиц в результате прохождения четырех стадий: 1) образование мевалоната из ацетил-КоА или лейцина; 2) дегидратирование и декарбоксилирование мевалонилпирофосфата с образованием «активного изопрена» — изопентенилпирофосфата и конденсация изопреновых звеньев с образованием ациклических терпенов разной длины; 3) циклизация ациклических структур; 4) дальнейшая модификация циклической структуры.

Интермедиатами синтеза стеринов являются ацетат, мевалоновая кислота, сквален, ланостерин. Сквален — общий предшественник стеринов растительного и животного происхождения, накапливается в дрожжах и при аэрации превращается в стерин.

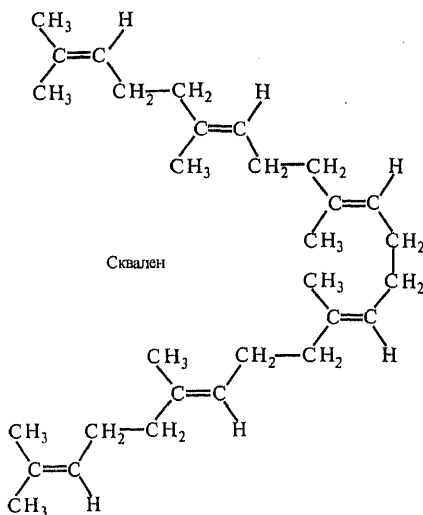
Первые две стадии синтеза стеринов описаны при изложении пути биосинтеза каротиноидов (см. гл. 13).

Расхождение путей происходит на уровне фарнезилпирофосфата:



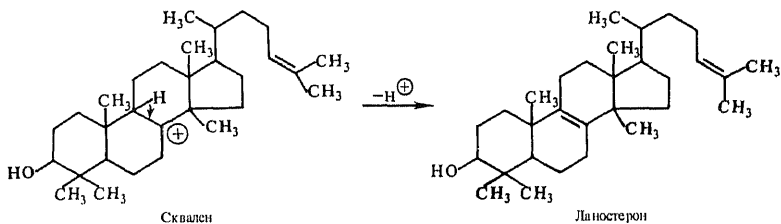
Фарнезилпирофосфат  
(транс-двойные связи)

В случае стерина он димеризуется с образованием сквалена  
 $C_{15}^+C_{15} \rightarrow C_{30}$ :



Сквален

При циклизации и отщеплении протона образуется ланостерин, предшественник холестерина и эргостерина:



Сквален

Ланостерин

Превращение ланостерина в эргостерин происходит в результате следующих стадий: 1) деметилирования ланостерина, 2) трансалкилирования с образованием 24(28)-метиленовой



группы и одновременным восстановлением С-24 (25) двойной связи, 3) десатурации боковой цепи с образованием С-22 (23) двойной связи (предполагается участие монооксигеназной системы, содержащей цитохром Р-450); 4) изомеризации  $\Delta^8 \Delta^7$ , 5) дегидрогенирование с образованием  $\Delta^5$ ; 6) восстановления 24 (28) метиленовой группы до метильной.

Последовательность реакций точно не установлена, но выделен ряд веществ, которые рассматривают как интермедиаты на пути от ланостерина к эргостерину. Предполагают, что ферменты, участвующие в поздних стадиях синтеза эргостерина, локализуются в микросомах дрожжей.

### 12.3.3. Условия образования эргостерина дрожжами

Наиболее высокие количества стерина синтезируют штаммы *Saccharomyces carlsbergensis* ИНМИ-101 и *Sacch. carlsbergensis*. Биомасса *Sacch. carlsbergensis* может содержать более 10 % эргостерина.

Важное условие синтеза эргостерина дрожжами — хорошая аэрация. В анаэробных условиях в клетках дрожжей накапливается предшественник эргостерина — сквален. Показано, что кислород индуцирует синтез стерина, оказывая активирующее влияние на эпоксидазу сквалена — первого фермента биосинтетического пути. Индукция синтеза эргостерина начинается при 0,03 %-ном содержании  $O_2$  в газовой фазе и достигает максимума при 2 %-ной концентрации.

Для биосинтеза стерина дрожжами важно, чтобы среда держала большой избыток углеводов и мало азота. Дрожжи, богатые белком, как правило, содержат мало стерина. Эти данные касаются главным образом пекарских дрожжей. В случае дрожжей рода *Candida* высокое С/Н в среде приводит к накоплению липидов, а не эргостерина.

Для дрожжей, использующих n-алканы, последние являются лучшим источником углерода для синтеза эргостерина, чем углеводы. Вероятно, это связано с образованием из алканов ацетата (предшественника эргостерина) в результате  $\beta$ -окисления парафинов. И для пекарских дрожжей ацетат является хорошим источником углерода в биосинтезе стерина.

Стимулирующее действие на образование стерина дрожжами оказывают ингибиторы гликолиза и разобщители окислительного фосфорилирования и дыхания, а также обеспеченность дрожжей витаминами, и прежде всего пантотеновой кислотой, которая в составе КоА участвует в построении молекулы эргостерина.

При действии на дрожжи рентгеновского излучения содержание эргостерина увеличивается в 2—3 раза, что объясняют угнетением процесса аминирования, сопровождающегося повышением синтеза липидов. Подобно ионизирующим облучениям действуют радиомиметические вещества, нарушающие метаболизм клетки и стимулирующие липидный обмен. Например, при комбиниро-

ванном воздействии на клетки дрожжей радиомиметического вещества (эмбихина) и рентгеновского излучения выход стерина *Sacch. cerevisiae* увеличивается на 109 % по сравнению с контролем.

Полиеновые антибиотики нистатин и филипин, взаимодействующие с мембраной дрожжей, повышают уровень стерина у последних на 50—60 % по сравнению с контролем.

Синтез стерина не связан с ростом дрожжей. Содержание стерина повышается по мере старения культуры и стеринобразование происходит после остановки роста дрожжей.

Роль стерина в метаболизме продуцентов не совсем ясна. Наблюдается связь между дыхательной активностью дрожжей и образованием эргостерина. В анаэробных условиях дрожжи содержат много сквалена и мало эргостерина. Роль эргостерина как структурного компонента мембран связывают с проницаемостью клеточных мембран дрожжей.

Наиболее богата стеринами у дрожжей фракция митохондрий. Полагают, что митохондрии принимают участие в биосинтезе стерина, а последние в свою очередь участвуют в образовании митохондриальных структур и оказывают влияние на их функциональную активность.

Стерины содержат в молекуле ОН-группу и в клетке присутствуют в значительной степени как эфиры жирной кислоты. Поэтому существует предположение о том, что образование стерина — это реакция детоксикации, защищающая организм от перепродукции жирных кислот. Стерины используются для транспорта непредельных кислот и, возможно, других соединений в клетке. Микоплазмы включают стерины в клеточные мембраны. Дрожжи *Sacch. cerevisiae* в условиях пониженного содержания растворенного кислорода в среде поглощают экзогенные стерины, при этом часть их подвергается трансформации с образованием коммерчески ценных стероидов. Например, десмостерин они превращают в 24 β-метилхолестерин, а 24,25-дигидроланостерин — в 7-дегидрохолестерин, который служит интермедиатом при биосинтезе витамина D<sub>3</sub>.

#### 12.3.4. Получение и применение эргостерина

В промышленности эргостерин получают, используя дрожжи *Sacch. cerevisiae*, *Sacch. carlsbergensis*, а также мицелиальные грибы. Засев производят большим количеством инокулята. Культивирование ведут при высокой температуре и сильной аэрации в среде, содержащей большой избыток источников углерода по отношению к источникам азота.

Дрожжи, а также грибы рода *Aspergillus* и *Penicillium* используют для получения кристаллического витамина D<sub>2</sub> или концентрата. В качестве концентрата в животноводстве применяют облученные сухие дрожжи.

Максимум поглощения эргостерина отмечен при 280 нм.

Именно это излучение возбуждает отдельные связи колец А и В в молекуле эргостерина и вызывает его превращение в витамин D<sub>2</sub>. Облучение производят ультрафиолетовыми лампами с длиной волны 280—300 нм (сухие дрожжи) или в тонком слое 5 %-ной суспензии дрожжей. При более коротковолновом и длинноволновом излучении повышается выход других соединений стериновой природы.

На выход витамина D<sub>2</sub> (и образование других соединений) оказывают влияние длительность облучения, температура, наличие примесей. Поэтому облучение эргостерина, используемого в качестве пищевых добавок, производят с большой осторожностью.

Промышленность СССР выпускает препарат под названием «Кормовые гидролизные дрожжи, обогащенные витамином D<sub>2</sub>». В 1 г абсолютно сухих дрожжей содержится 5000 ИЕ витамина D<sub>2</sub>, не менее 46 % сырого белка и незаменимые аминокислоты, в том числе лизин, метионин, триптофан.

Для получения кристаллического витамина D<sub>2</sub> дрожжи или мицелий грибов подвергают гидролизу раствором соляной кислоты при 110 °С. Гидролизованную массу обрабатывают спиртом при 75—78 °С и после охлаждения до 10—15 °С фильтруют. Фильтрат упаривают до содержания в нем 50 % сухих веществ и используют как концентрат витаминов группы В.

Витамин D<sub>2</sub> получают из массы, оставшейся после фильтрации. Массу промывают, сушат, размельчают и дважды обрабатывают при 78 °С трехкратным объемом спирта.

Спиртовые экстракты сгущают до 70 %-ного содержания сухих веществ. Таким образом получают липидный концентрат. Его омыляют раствором NaOH, а стерины остаются в неомыленной фракции. Кристаллы эргостерина выпадают из раствора при 0°. Очистку кристаллов проводят путем перекристаллизации, последовательным промыванием 69 %-ным спиртом, смесью спирта и бензола (80:20) и повторной перекристаллизацией. Полученные кристаллы эргостерина сушат, растворяют в эфире, облучают, после чего эфир отгоняют, а раствор витамина концентрируют и кристаллизуют.

Для получения масляного концентрата раствор витамина после фильтрации разбавляют маслом до стандартного уровня.

Источником получения эргостерина может служить мицелий грибов, остающийся как отход антибиотической промышленности и производства лимонной кислоты.

В Советском Союзе планируется промышленное получение эргостерина из липидной фракции *Candida guilliermondii*, использующей n-алканы. Сухую массу дрожжей для извлечения остаточных углеводов экстрагируют петролейным эфиром. Получаемая при этом липидная фракция (микробный жир) является побочным продуктом микробиологической промышленности. Из микробного жира выделяют эргостерин, убихинон-9 и другие жирорастворимые соединения.

Обогащенные эргостерином, облученные ультрафиолетовым излучением дрожжи используют в животноводстве как кормовую добавку.

Эргостерин — исходный продукт для получения некоторых стероидных гормонов, лечебных и пищевых препаратов. Количество производимого пока эргостерина недостаточно для нужд народного хозяйства и внедрение новых производственных мощностей — задача ближайшего будущего.

### Глава 13 КАРОТИНОИДЫ

Каротиноиды — наиболее многочисленная и широко распространенная группа природных пигментов. Их образуют высшие растения, водоросли, фототрофные бактерии и ряд хемотрофных бактерий. Кроме того, каротиноиды синтезируют некоторые микелиальные грибы и дрожжи.

Присутствуют каротиноиды также в организме некоторых членистоногих, рыб, птиц и млекопитающих, но самостоятельно эти пигменты не образуются, а поступают с пищей и служат источником обогащения организма витамином А.

Каротиноиды находятся у растений и микроорганизмов в свободной форме, могут образовывать гликозиды, каротино-белковые комплексы, но значительно чаще встречаются в виде эфиров длинноцепочечных жирных кислот.

Обычно каротиноиды состоят из восьми изопреновых остатков, соединенных таким образом, что две ближайшие к центру молекулы метильные группы находятся в положении 1 : 6, а другие метильные группы — в положении 1 : 5. Все каротиноиды можно представить образующимися из структуры, имеющей длинную центральную цепь конъюгированных двойных связей (рис. 13. 1).

Одно из отличий каротиноидов от других природных соединений — наличие хромофора, содержащего сопряженные двойные связи, число которых у наиболее распространенных каротиноидов ( $\beta$ -каротин,  $\gamma$ -каротин и др.) составляет 10—11, а может достигать пятнадцати. От числа сопряженных двойных связей в молекуле полиенов зависят наличие окраски и ее интенсивность. Алифатические полиены, содержащие до пяти сопряженных двойных связей, — соединения неокрашенные. Среди них наибольший интерес представляют предшественники каротиноидов — фитонин

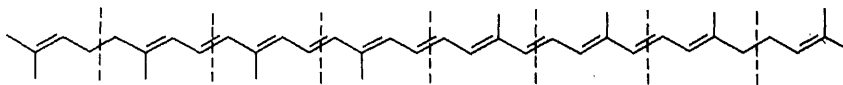


Рис. 13.1. Полиен, из которого путем гидрирования, дегидрирования, окисления, циклизации и других реакций возможен синтез различных каротиноидов

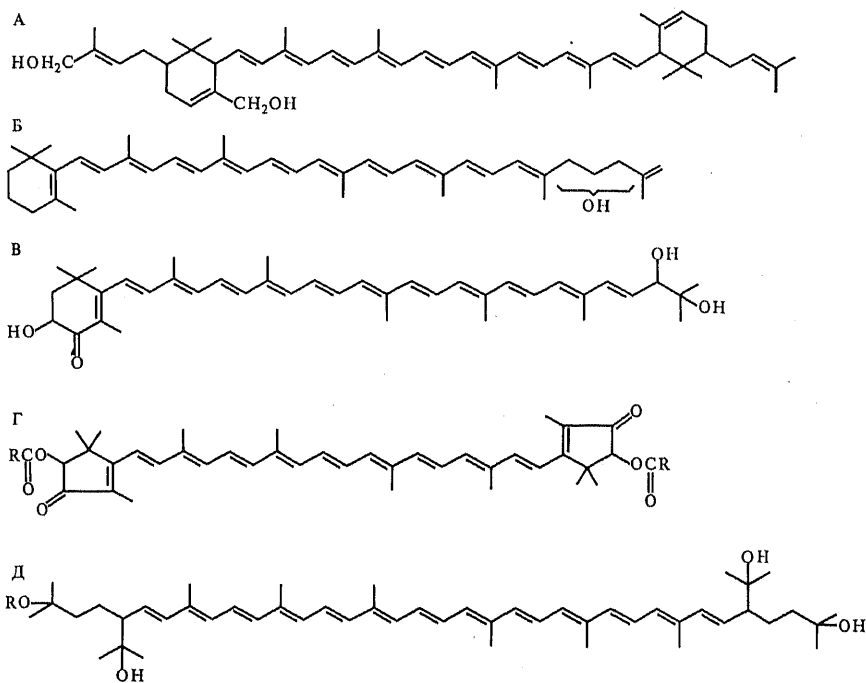


Рис. 13.2. Структурные формулы некоторых каротиноидов. А — сарцинаксантин; В — алеуреаксантин; В — 2-гидроксифлеиксантин; Г — актиноэритрин; Д — бактериоруберин моногликозид; R — глюкоза или манноза

и фитофлуин. Эти соединения представляют собой масла, содержащие соответственно три и пять сопряженных двойных связей. В нейроспорине присутствуют девять сопряженных двойных связей, и он уже имеет выраженную желтую окраску. С увеличением числа двойных связей в молекуле каротиноидов происходит углубление окраски от желтой к оранжевой, красной и фиолетовой.

В последнее десятилетие из различных природных источников выделен ряд каротиноидов, которые по химической структуре отличаются от описанных ранее. Это так называемые высшие каротиноиды, состоящие из 45 или 50 атомов углерода. В их молекуле содержатся дополнительные  $C_5$ -единицы, занимающие 2- или 2,2'-положение.  $C_{50}$ -Каротиноиды широко распространены у микроорганизмов, в основном у нефотосинтезирующих; к таким каротиноидам относится, например, сарцинаксантин (рис. 13.2, А), образуемый *Sarcina lutea*.

Другим примером каротиноидов, имеющих необычную структуру, являются пигменты, содержащие терминальную метиленовую группу, например алеуреаксантин гриба *Aleuria aurantia* (рис. 13.2, В). Выделены также  $\alpha$ -гидроксикаротиноиды, среди

которых наиболее распространен  $\alpha$ -гидроксифлексантин (рис. 13.2, В). Обнаружены каротиноиды, имеющие в своей молекуле пятичленное кольцо и кетогруппы, например актиноэритрин (рис. 13.2, Г), а также арилкаротиноиды, содержащие триметилфенильные концевые группы, и каротиноиды гликозиды (рис. 13.2, Д).

Недавно открыта еще одна группа каротиноидов — это  $\omega$ -фенилзамещенные полиеновые карбоксилловые кислоты, этерифицированные 2,5-диалкилированным резорцином (флексирубин, хлорофлексирубин), образуемые *Flexibacter elegans* и *Cytophaga johnsonae*.

В природе встречаются также каротиноиды, содержащие менее 40 атомов углерода. Они получили название апокаротиноидов — это, например,  $\beta$ -цитраурин (3-гидроокси-8-апо-каротин-8'-ал), свойственный некоторым растениям, триспоровые кислоты грибов, витамин А и др.

Известна классификация каротиноидов, основанная на различиях химического строения этих пигментов. Каротиноиды делят, например, на каротины (содержат только углерод и водород) и гидроксикаротиноиды, в молекулу которых входит также кислород. Последние называют иногда общим термином ксантофиллы. Другая химическая классификация делит каротиноиды на ациклические, моноциклические и бициклические. Имеется также классификация каротиноидов, в основу которой положены отличия в функциональном значении этих пигментов.

В настоящее время изучено химическое строение более 500 каротиноидов. Благодаря совершенствованию физико-химических методов исследования число известных нам пигментов, постоянно увеличивается.

Традиционные методы извлечения каротиноидов из природных объектов состоят в гомогенизировании биомассы при охлаждении (процесс проводят обычно в присутствии антиоксидантов в темноте), извлечении пигментов полярными растворителями, например ацетоном или метанолом. Далее каротиноиды переводят в неполярные растворители — гексан или петролейный эфир. Индивидуальные пигменты получают путем хроматографирования в тонком слое адсорбента (силикагель, алюминий). При использовании последнего сорбента разделение каротиноидов целесообразнее проводить в системе растворителей, содержащей различное количество гексана и ацетона. При разделении ксантофиллов перед тонкослойной хроматографией на силикагеле проводят предварительный щелочной метанолиз. Если каротиноиды связаны с белками, то для их извлечения используют детергенты, например тритон X-100 (2 %) или додецилсульфат натрия (1 %).

Первоначальную информацию о строении выделенного каротиноида дает исследование спектров поглощения пигмента в видимой области. Эти данные наряду с принятыми химическими методами исследования каротиноидов (озонолиз, восстановление

NaBH<sub>4</sub> и др.) позволяют составить представление о возможной структуре пигмента. Далее определяют сравнительную полярность изучаемого пигмента в разных хроматографических системах.

Масс-спектрометрия используется для установления молекулярной массы каротиноида и особенностей строения. Информацию о наличии определенных функциональных групп в пигменте могут дать ИК- и ЯМР-спектры. Стереохимия каротиноида является конечным этапом его изучения. Наиболее полные данные о стереохимии каротиноида можно получить, используя спектры кругового дихроизма и низкотемпературные спектры поглощения (при температуре жидкого азота). Окончательное заключение о строении изучаемого каротиноида дают рентгеноструктурный анализ и тотальный синтез полиена. Следует отметить, что все перечисленные выше анализы могут быть проведены с небольшим количеством образца (около 10—20 мг), что в значительной степени содействовало развитию в последние годы химии каротиноидов.

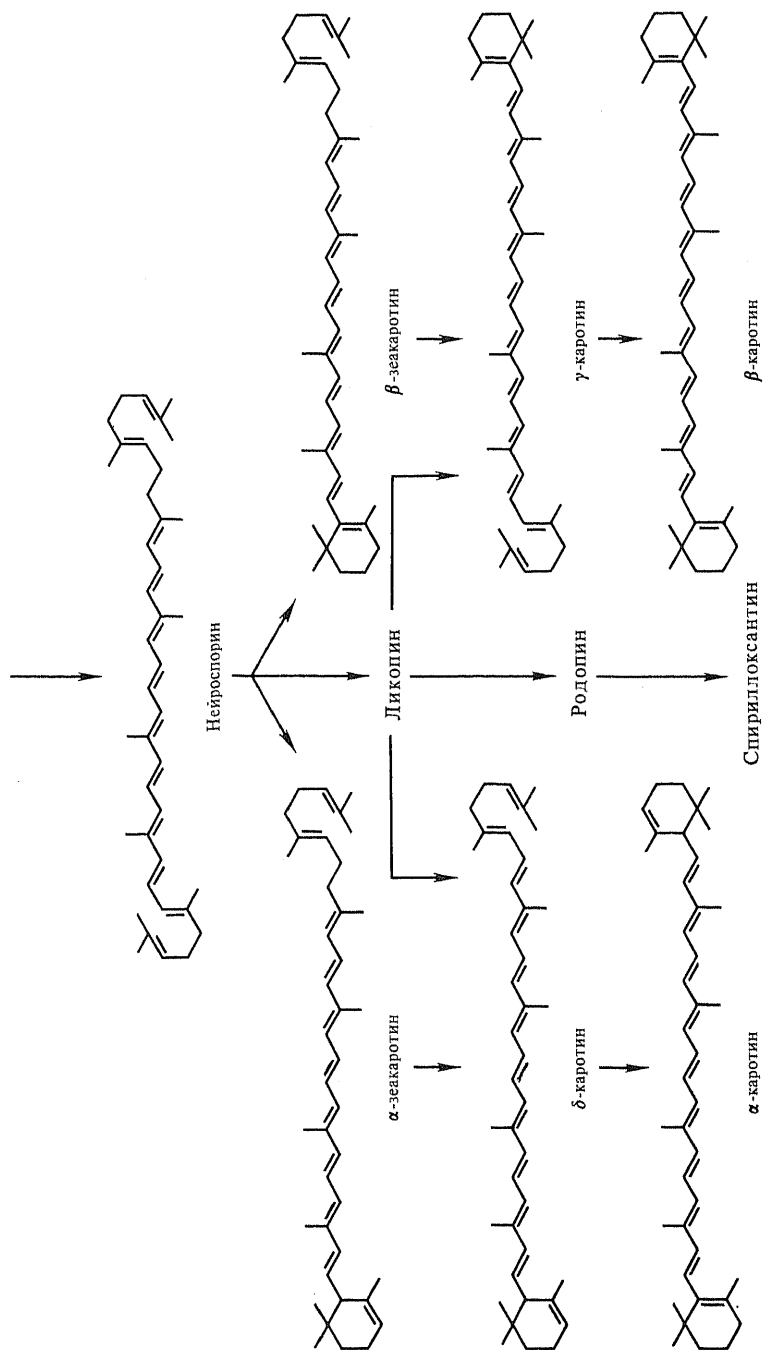
### 13.1. БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ

Исследования, в которых применялась радиоактивная метка (<sup>14</sup>C), а также изучалось образование каротиноидов в присутствии специфических ингибиторов и мутантами микроорганизмов, позволили установить, что биосинтез этих пигментов проходит в несколько этапов.

**1. Образование первичного С<sub>5</sub>-предшественника.** Стартовым соединением в биосинтезе каротиноидов является ацетат. Две молекулы ацетил-КоА конденсируются с образованием ацетоацетил-КоА, который в свою очередь конденсируется еще с одной молекулой ацетил-КоА, образуя β-гидрокси-β-метилглутарил-КоА. При восстановлении этого соединения образуется мевалоновая кислота (МВК), последняя в присутствии АТФ фосфорилируется с образованием пирофосфата МВК. В присутствии АТФ путем декарбоксилирования и дегидрирования пирофосфат МВК превращается в 5-углеродную изопреновую единицу — изопентенилпирофосфат (рис. 13.3).

**2. Биосинтез бесцветных С<sub>40</sub>-полиенов из С<sub>5</sub>-предшественника.** Изопентенилпирофосфат (ИПФ) изомеризуется до стадии диметилаллилпирофосфата (ДМАПФ). Затем происходит конденсация ИПФ и ДМАПФ с образованием геранилпирофосфата. Эти соединения, содержащие 10 атомов углерода, конденсируются с ИПФ и образуют фарнезилпирофосфат, из которого путем последующей конденсации возникает 20-углеродная единица — геранилгеранилпирофосфат. Последний димеризуется, образуя фитонин (7,8,11,12,7',8',11',12'-октагидро-ψ-ψ-каротин) — первый С<sub>40</sub>-предшественник каротиноидов.

Центральный хромофол фитонина, состоящий из трех сопряженных двойных связей, предполагает существование несколь-





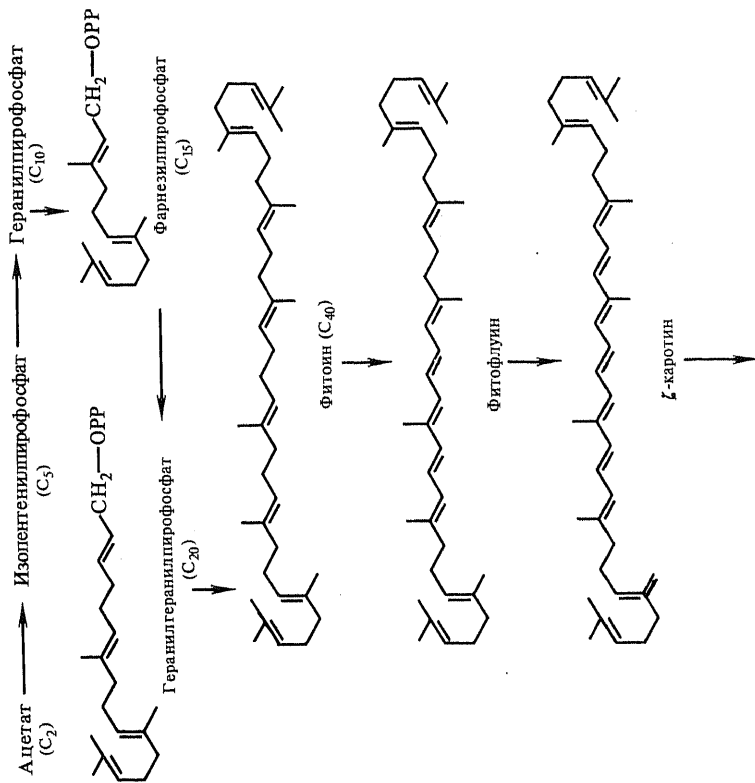


Рис. 13.3. Биосинтез каротиноидов микроорганизмами

ких стереохимических изомеров. В природных объектах фитонин представлен двумя изомерами: 15-цис- и 15-транс-фитонин. Как правило, первый изомер преобладающий, второй — встречается в виде следов. Однако у некоторых микроорганизмов весь фитонин может быть представлен 15-транс-изомером. Характер изомера фитонина определяет конфигурацию последующих предшественников биосинтеза каротиноидов, в частности фитофлуина.

**3. Конечные стадии синтеза каротиноидов (дегидрирование, циклизация, введение кислородсодержащих групп и C<sub>5</sub>-единиц).** Образование каротиноидов из фитонина происходит при последовательном дегидрировании последнего. Первым продуктом этой реакции является C<sub>40</sub>-полиен — фитофлуин. При дальнейшем дегидрировании фитофлуина образуются уже окрашенные каротиноиды — нейроспорин и ликопин (рис. 13.3). Эти соединения подвергаются затем последовательной циклизации с образованием полиенов, содержащих α- или β-иононовые кольца (например, α- или β-каротинов). Использование нейроспорина или ликопина как промежуточного продукта при биосинтезе каротиноидов зависит от условий выращивания и особенностей ферментной системы организма.

Установлено, что α- и β-иононовые кольца каротиноидов образуются из общего ациклического предшественника (рис. 13.4), механизм циклизации которого отличается в случае синтеза α- и β-иононовых колец. Из нейроспорина (или L-каротина) возникают α- и β-зеакаротины — предшественники α- и β-каротинов соответственно. Введение кислородсодержащих групп в молекулу каротиноидов происходит обычно после окончания процесса циклизации, т. е. синтез ксантофиллов осуществляется после образования каротинов.

Образование C<sub>50</sub>-каротиноидов также происходит после синтеза C<sub>40</sub>-каротиноидов (каротинов). Установлено, что C<sub>50</sub>-бактериоруберин образуется путем присоединения C<sub>5</sub>-изопреновых единиц к концевым частям молекулы ликопина с последующим введением гидроксильных групп после этапа циклизации. Предполагают, что в данном случае дополнительные C<sub>5</sub>-единицы могут инициировать циклизацию каротиноидов (этапы циклизации и присоединения C<sub>5</sub>-единиц могут происходить одновременно). Нециклическим предшественником C<sub>50</sub>-каротиноидов является ликопин. Следовательно, при циклизации этих полиенов не проис-

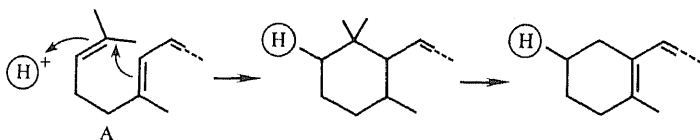


Рис. 13.4. Механизм реакции циклизации при образовании β-иононового кольца. А — общий ациклический предшественник при образовании α- и β-иононовых колец

ходит интерконверсии  $\beta$ -,  $\epsilon$ - и  $\gamma$ -колец. Для образования некоторых  $C_{50}$ -каротиноидов, например дегидрогена-Р434 *Flavobacterium denitrogenans*, необходимым условием является наличие света.

### 13.2. ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФУНКЦИЯ

У фототрофных организмов каротиноиды расположены в фотосинтезирующем аппарате. У большинства хемотрофных микроорганизмов каротиноиды ассоциированы с клеточной мембраной, в которой они находятся в форме гликозидов и сложных эфиров. У некоторых микроорганизмов, например *Micrococcus radiodurans*, каротиноиды локализованы в клеточной стенке. У грибов основной пул этих пигментов сосредоточен в липидных глобулах цитоплазмы.

Каротиноиды фототрофных организмов осуществляют две основные функции. Они являются дополнительными светособирающими пигментами и служат протекторами, защищающими клетки от окисления молекулярным кислородом.

В последние годы проведены исследования по изучению роли каротиноидов у экстремальных галофильных бактерий. Показано, что эти микроорганизмы способны осуществлять процесс «бесхлорофильного» фотосинтеза. Этому заключению способствовала расшифровка функционального значения «пурпурных мембран» *Halobacterium halobium* и других экстремально галофильных бактерий. В «пурпурных мембранах» присутствует пигментбелковый комплекс (бактериородопсин), хромофором которого является апокаротиноид ретиналь (рис. 13.5). Свое название этот комплекс получил в связи с тем, что родопсин — зрительный пигмент животных, также содержит ретиналь. Однако роль бактериородопсина у галобактерий иная. Он функционирует как светозависимая протонная помпа, что обеспечивает генерацию трансмембранного потенциала и синтез АТФ. В результате галобактерии, содержащие бактериородопсин, могут расти при наличии света в отсутствие других источников энергии.

Интересно отметить, что родопсин недавно обнаружен у одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas sp.*, у которой он, видимо, участвует в фототаксисе.

У некоторых хемотрофных микроорганизмов каротиноиды могут выполнять протекторную функцию. Они защищают клетки от

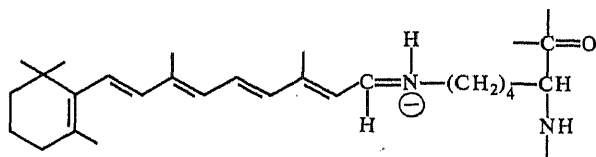


Рис. 13.5. Ретиналь, связанный с остатком лизина, входящего в состав опсиноподобного белка

разрушения в результате поглощения света порфиринами, флави-нами или другими соединениями. Низкая чувствительность ряда дрожжей к радиации, видимо, связана с присутствием каротиноидов. У мицелиальных грибов также наблюдается различная чувствительность к лучам видимого света, зависящая от интенсивности синтеза каротиноидов. В связи с этими данными интересны результаты опытов с растениями, показавшие, что в ответ на действие ряда неблагоприятных факторов (УФ-излучение, ионизирующая радиация, интенсивное облучение видимым светом) наблюдается усиленное образование каротиноидов.

Каротиноиды хемотрофных микроорганизмов способны также предохранять их от вредного действия озона. Высказано предположение, что при высоком содержании перекиси в среде каротиноиды действуют как антиоксиданты, при низком — выполняют функции переносчиков кислорода. Предполагают, что каротиноиды, содержащие двойные связи, могут быть потенциальными оксигеназами. Показано, что мутант *Corynebacterium glutamicus*, содержащий ксантофилл, обладает более высокой дыхательной активностью, чем исходный штамм. У гриба *Blakeslea trispora* интенсивность дыхания возрастает при добавлении в среду выращивания апокаротиноидов (триспорových кислот).

Высказано предположение, что каротиноиды участвуют в процессе фототропизма. Например, движение спорангиофор *Phycomyces blakesleeanus* в сторону света связывают с наличием у них  $\beta$ -каротина.

Показана существенная роль этих пигментов в цитодифференцировке грибов, приводящей к образованию спор, зигот, аскоспор, т. е. клеток, возникающих в результате бесполой и половой репродукции. О важном значении каротиноидов в этих процессах свидетельствуют следующие факты. Продукт окислительной полимеризации  $\beta$ -каротина — спорополленин — входит в состав зигот и аскоспор грибов, способных синтезировать каротиноиды. Спорополленин участвует также в бесполой репродукции мукоровых грибов и входит в состав клеточных стенок спорангиоспор и спорангиофор. Мутанты *P. blakesleeanus*, не синтезирующие  $\beta$ -каротина, не способны образовывать зиготы.

Роль каротиноидов в репродукции мукоровых грибов была окончательно доказана в 50—60-х годах, когда из культуральной жидкости совместно растущих разнополюх штаммов *B. trispora* выделили  $C_{18}$ -терпеноиды (апокаротиноиды), получившие название триспорových кислот А, В и С. Предшественником в синтезе этих соединений служит  $\beta$ -каротин и образование триспорových кислот происходит через ретиналь (рис. 13.6).

Триспорových кислоты — гормоноподобные факторы. Они способствуют образованию зигофор у (+) и (—) штаммов мукоровых грибов, т. е. регулируют одну из стадий полового процесса. Поэтому триспорových кислоты называют также зигогеническим половым гормоном мукоровых грибов.

Апокаротиноиды также выполняют роль регуляторов ряда

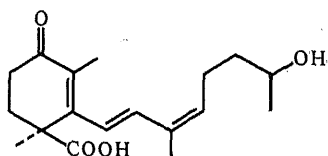
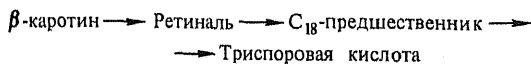
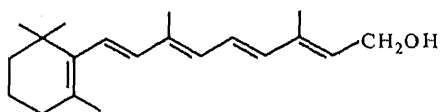


Рис. 13.6. Образование триспоровой кислоты C  
*Blakeslea trispora*

важнейших процессов у растений (например, гормон, контролирующий процесс сбрасывания листьев, абсцизин — апокаротиноид). Не менее существенно значение апокаротиноидов у млекопитающих, для нормальной жизнедеятельности которых необходим витамин А.

Природный витамин А<sub>1</sub>-спирт (ретинол<sub>1</sub>) включает β-иононовое кольцо и боковую изопреноидную цепь, состоящую из двух остатков метилбутадиена. Предшественником витамина А яв-



Ретинол

ляется β-каротин. Окисление этого полиена при образовании витамина А происходит в организме животных двумя путями.

1. β-Каротин расщепляется по центральной двойной связи и при участии каротиндиоксигеназы образуются две молекулы ретиналя (альдегидной формы витамина А). Последний восстанавливается НАДН<sub>2</sub> в ретинол под действием алкогольдегидрогеназы. Далее ретинол ферментативно этерифицируется в ретинилпальмитат, депонирующийся в печени.

2. В кишечнике β-каротин расщепляется по центральной двойной связи при участии НАДФН<sub>2</sub>-зависимой каротиноксигеназы. При этом образуются апокаротинали и низкомолекулярные продукты окисления. Апокаротинали далее при участии фермента, локализованного в митохондриях и микросомах, превращаются в апокаротиновые кислоты, обладающие биологической активностью витамина А в функции роста.

Усвоение витамина А происходит в кишечнике млекопитающих, где протекают процессы эмульгирования и мицеллообразования, а также ряд биохимических реакций (гидролиз, этерификация, образование белковых комплексов).

Субстратами при образовании витамина А могут быть также другие каротиноиды, например α-каротин и ксантофиллы. Однако при этом витамина А образуется значительно меньше по сравнению с β-каротином.

Витамин А в организме человека и животных выполняет ряд очень важных функций. Прежде всего он участвует в процессе зрения. При недостатке в организме витамина А не происходит образования светочувствительного пигмента родопсина в палочках сетчатки глаза. В восприятии света участвуют также такие пигменты, как иодопсин и порфиросин, в состав которых входят ретинен<sub>1</sub> и ретинен<sub>2</sub> соответственно. Родопсин состоит из липопротеина опсина и изомера витамина А альдегида 11-цис-ретинала.

Помимо участия в процессе сумеречного зрения и адаптации глаза в темноте, витамин А необходим для нормального роста, развития и дифференцирования тканей, выполняет роль радиопротектора при рентгеновском облучении, регулирует процессы размножения, обладает антиинфекционными свойствами, усиливает антивирусную резистентность. Отсутствие витамина А является причиной керотинизации эпителия клеток слизистых оболочек, желез, кожи. Одна из основных функций витамина А — регуляция прохождения метаболитов через мембраны.

### **13.3. УСЛОВИЯ ОБРАЗОВАНИЯ КАРОТИНОИДОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ**

У фототрофных микроорганизмов синтез каротиноидов часто зависит от интенсивности света, наличия некоторых органических соединений и содержания кислорода. Например, у пурпурных бактерий образование каротиноидов обычно увеличивается при низких интенсивностях света и в присутствии таких соединений, как ацетат или малат.

У хемотрофных микроорганизмов в отличие от фототрофов каротиноиды, как правило, являются продуктами вторичного метаболизма. В конце первой фазы роста наблюдается накопление бесцветных предшественников каротиноидов, синтез окрашенных полиенов протекает в основном во вторую фазу развития культур. Поэтому для обеспечения высокого выхода пигментов необходимо в первую очередь создать условия, способствующие образованию биомассы. При затухании роста начинается более интенсивный синтез каротиноидов, успешное протекание которого требует принципиально иных условий культивирования, чем для образования биомассы.

У многих эукариотных микроорганизмов образование каротиноидов связано с определенными изменениями в морфологии и интенсивности ряда обменных процессов. У грибов синтез каротиноидов сопровождается утолщением клеточных стенок и появлением в цитоплазме большого числа включений, состоящих главным образом из нейтральных липидов. Морфологические изменения представляют практический интерес, так как служат определенным показателем того, что культура грибов находится в стадии интенсивного каротинообразования.

Для многих микроорганизмов переход к каротинообразова-

нию осуществляется при изменении в среде отношения C : N в сторону значительного уменьшения содержания азота. У ряда хемотрофов синтез каротиноидов протекает наиболее интенсивно, если источником углерода является глюкоза. Источник углерода определяет не только выход каротиноидов, но и состав этих пигментов. Так, для некоторых дрожжей показано, что при использовании гексоз в пигментном комплексе преобладает  $\beta$ -каротин, а если источником углерода становится глюкуроновая кислота, то основным пигментом является торуляродин.

Наиболее благоприятным источником азота, способствующим интенсивному синтезу каротиноидов у мицелиальных грибов, дрожжей и ряда бактерий, служат некоторые аминокислоты (аспарагин, лейцин, глицин и др.). У дрожжей и актиномицетов значительные количества каротиноидов образуются также в присутствии аммонийного азота. Стимулируют синтез каротиноидов из неорганических элементов железо и марганец, калий ингибирует этот процесс. Каротинообразование значительно интенсифицируется у ряда микроорганизмов при добавлении в среду витаминов, в частности тиамина и рибофлавина. Обычно потребность в микроэлементах и витаминах, необходимых для синтеза каротиноидов, у микроорганизмов полностью удовлетворяется при введении в среду дрожжевого экстракта. Стимуляторами каротинообразования являются также некоторые поверхностно-активные соединения, среди которых наиболее эффективен твин 40.

Свет стимулирует образование каротиноидов не только у фототрофов, но и у многих хемотрофов, причем у последних свет может влиять не только на выход пигментов, но и на их состав. У некоторых грибов (*Neurospora crassa*, *Fusarium aquaeductuum*) и хемотрофных бактерий (*Mycobacterium* sp.) образование каротиноидов облигатно зависит от наличия света. В темноте синтезируются только бесцветные предшественники каротиноидов, в частности фитоин.

У многих микроорганизмов для образования каротиноидов необходим молекулярный кислород. Он участвует в образовании ксантофиллов и предшественников синтеза каротинов.

У многих микроорганизмов интенсивный синтез каротиноидов происходит при температуре, оптимальной для роста, хотя у некоторых (например, *Sarcina flava*, *Micrococcus radiodurans*) активное накопление пигментов наблюдается при более низкой температуре.

#### **13.4. ПРОДУЦЕНТЫ И ПРОМЫШЛЕННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ**

Каротиноиды получают с помощью химического синтеза и путем выделения из природных источников — растений и микроорганизмов. Химическим путем получают  $\beta$ -каротин, витамин А,  $\beta$ -апо-8-каротиналь, этиловый эфир  $\beta$ -апо-8-каротиновой кислоты, кантоксантин и ряд других каротиноидов, синтез которых осу-

ществляется в заводских масштабах. Традиционными источниками получения каротиноидов служат также некоторые растения (морковь, тыква, трава, шиповник, облепиха и др.).

Наряду с этим все шире в тех же целях используют мицелиальные грибы и дрожжи. Как продуценты каротиноидов представляют также интерес бактерии и водоросли.

Перспективными в данном отношении являются некоторые фототрофные бактерии, у которых в зависимости от интенсивности света можно регулировать выход каротиноидов. Биомассу пурпурных бактерий, богатую каротиноидами, в Японии используют в качестве добавок в рацион кур, что способствует более интенсивному окрашиванию желтка. Каротиноиды могут быть получены также в значительном количестве из некоторых водорослей (например, *Spongiosoccus excentricum*, *Chlorella* sp.).

Среди хемотрофов для получения каротиноидов используют дрожжи *Rhodotorula gracilis*, *R. rubra*, *Rhodospiridium diobovatum*, а также актиномицеты (*Act. chrestomycetes* var. *aurantioideus*, *Act. chrysomallus* var. *carotinoideus*), микобактерии (*Mycobacterium phlei*, *M. carotenum*), грибы (Mucogaseae, Dactylospetaceae и др.). Интерес представляют некоторые штаммы *Flavobacterium*, синтезирующие пигмент зеаксантин, который пока еще не может быть получен с помощью химического синтеза.

Продуцентами  $\beta$ -каротина, широко применяемыми для промышленного получения этого пигмента, являются гетероталлические мукоровые грибы *Blakeslea trispora* и *Choanephora conjuncta*. При совместном культивировании разнополюх штаммов этих грибов на специально подобранных средах выход каротина составляет около 3—4 г/л среды.

Для получения  $\beta$ -каротина с помощью *B. trispora* используют сложные по составу среды, например кукурузно-соевую, содержащую растительные масла, керосин, поверхностно-активные вещества и некоторые специальные стимуляторы. В последние годы в целях экономии для получения  $\beta$ -каротина начинают применять вторичные продукты отхода — кукурузный экстракт и гидролі. В качестве стимуляторов синтеза каротина используют  $\beta$ -ионон, который можно заменить более дешевой цитрусовой пульпой и цитрусовой мелассой. Как заменители  $\beta$ -ионона используют также изопреновые димеры или тримеры, а также циклогексан, циклогексанон и их триметилпроизводные, среди которых наиболее эффективен 2,6,6<sup>1</sup>-триметил-1-ацетилциклогексан (ТАЦ). Активаторами каротиногенеза у *B. trispora* могут быть также  $\alpha$ -пирролидон, сукцинимид, нембутал и изониазид. Добавление этих активаторов, особенно последнего, на фоне действия  $\beta$ -ионона или ТАЦ позволяет значительно увеличить выход каротиноидов. Стимуляторы добавляются к культуре продуцента после окончания периода интенсивного роста биомассы.

Процесс получения  $\beta$ -каротина при использовании гриба *B. trispora* многостадийен. Согласно одному из способов сначала выращивают отдельно (+)- и (—)-штаммы гриба. Следующая



стадия — совместное выращивание разнополюх штаммов в ферментере при 26 °С и достаточно интенсивной аэрации. Третья стадия выращивания — внесение в большой ферментер смешанной культуры *B. trispora* и инкубация в течение 6—7 сут при той же температуре и аэрации.

Используя соответствующие стимуляторы, можно не только значительно увеличить выход  $\beta$ -каротина, но и изменить состав каротиноидов у *B. trispora*. Под влиянием некоторых производных пиридина (2-аминопиридина, 4-аминопиридина) вместо  $\beta$ -каротина преобладающим пигментом становится ликопин, выход которого может составлять более 60 % от всех каротиноидов, синтезированных *B. trispora*. При добавлении 4-аминопиридина наряду с ликопином образуется  $\gamma$ -каротин, причем оба каротиноида синтезируются почти в равных количествах. Таким образом, использование *B. trispora* интересно в практическом отношении не только потому, что это один из самых активных продуцентов  $\beta$ -каротина, но и потому, что с помощью этого организма можно получать и другие каротиноиды ( $\gamma$ -каротин, ликопин,  $\alpha$ -каротин,  $\beta$ -зеаксантин), также имеющие практическое применение.

Проводятся исследования, направленные на дальнейшее удешевление стоимости каротиноидов, получаемых микробиологическим способом. Показано, например, что синтез каротиноидов у *B. trispora* можно увеличить почти в семь раз, если источником углерода в среде будет целлобиоза. Для удешевления производства с этой целью можно использовать отходы, остающиеся при производстве целлюлозных материалов. На таких средах *B. trispora* синтезирует кроме  $\beta$ -каротина еще и такой практически важный фермент, как  $\beta$ -глюкозидаза. Получение одновременно двух ценных продуктов значительно удешевляет производство  $\beta$ -каротина.

Для практического использования предложен также высокопродуктивный мутант дрожжей *Rhodospiridium diobovatum*. На основе данного штамма получен каротинсодержащий белковый препарат. Разработан также метод получения каротинсодержащего препарата с помощью высокоактивного мутанта *Mycobacterium rubrum*; препарат содержит  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -каротины, ликопин и ксантофиллы (лютеин, торулин и др.). Для получения ксантофиллов используют гриб *Dacrymyces deliquescens*, культивируемый на среде, содержащей глюкозу, глицерин и кукурузный экстракт при интенсивном освещении. Выход ксантофиллов в этом случае может составлять около 40 мг на 1 л среды.

### 13.5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАРОТИНОИДОВ В НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Каротиноиды широко применяются в сельском хозяйстве, медицине и пищевой промышленности.  $\beta$ -Каротин используют главным образом в пищевой промышленности, а также при изготовлении лекарств и косметических средств.  $\beta$ -Каротин и ликопин

применяют при изготовлении пищевых продуктов как пигментные вещества и красители. Особенно велико значение этих каротиноидов, в частности ликопина, при изготовлении колбас и ветчинных изделий, где они могут заменить нитрит натрия. Как краситель используют также  $\beta$ -апо-8-каротиналь, придающий оранжевую окраску леденцам, пищевым пастам, кексам и другим кондитерским изделиям. Во многих странах  $\beta$ -каротин применяют для подкрашивания сливочного масла, которое в зимний сезон приобретает белый цвет. Масло нагревают до 30°C и добавляют вытяжку из моркови или  $\beta$ -каротин, который при такой температуре хорошо растворяется в масле. В Италии существует давняя традиция добавлять каротиноиды в макаронные изделия.  $\beta$ -Каротин и  $\beta$ -апо-8-каротиналь добавляют также в сыры и овощные пасты. Эти же каротиноиды используют для окраски яичного желтка ( $\beta$ -апо-8-каротиналь добавляют в пищевой рацион кур). Часто каротиноиды-красители используют в сочетании с аскорбиновой кислотой, что обеспечивает большую стабильность пигментов. Для лучшей сохранности каротиноидов при использовании их в качестве красителей применяют также особые препаративные формы пигментов. Каротиноиды растворяют в маслах или готовят вододисперсные формы: в такой форме пигменты заключают в микрокапсулы (наиболее удобная форма сохранения каротиноидов).

В последние годы наметились новые пути практического использования  $\beta$ -каротина и других каротиноидов. Так, добавки каротинсодержащей биомассы, полученной из *B. trispora*, в рацион кур повышают сохранность поголовья и улучшают товарные качества мяса. Получены также данные, что функция размножения у животных улучшалась при добавлении в корм  $\beta$ -каротина, даже если в корме присутствовал витамин А. Установлено, что на размножение молочного скота благоприятно влияет полная замена в пищевом рационе витамина А на соответствующее количество  $\beta$ -каротина.

Несомненный интерес представляют данные о том, что  $\beta$ -каротин оказывает терапевтический эффект на развитие рака кожи, индуцируемого УФ-излучением или диметилбенз(а)антраценом. Установлено, что и другой каротиноид — кантаксантин, а также полиен фитоин обладают антираковой активностью в отношении рака кожи, индуцированного УФ-излучением.

В связи с потребностями клинической практики в последние годы заинтересовались витамином А и его производными, получившими название ретиноидов. Оказалось, что ретиноиды можно использовать при нарушении процессов кератинизации, а также для профилактики и лечения некоторых раковых заболеваний. В основу этих рекомендаций положены данные о том, что ретиноиды способны влиять на рост опухолей путем воздействия на иммунную систему, на дифференциацию ткани (особенно эпителиальной), на адгезивные свойства клеток и клеточные взаимодействия. Витамин А и его производные оказались эффектив-

ным средством при лечении прелейкемического синдрома, канцеромы языка, меланомы. Особенно ценным в действии ретиноидов на опухоли является то, что эффект этих соединений основан на иных механизмах подавления роста злокачественных клеток, чем при использовании обычной цитотоксической химиотерапии.

Ведутся исследования по использованию апокаротиноидов в сельском хозяйстве. Получены положительные результаты по применению апокаротиноидов в качестве стимуляторов и аттрактантов. Показано, например, что триспоровые кислоты стимулируют прорастание семян некоторых бобовых растений.

Изложенные выше факты демонстрируют большую перспективность изучения апокаротиноидов и указывают на возможность широкого использования этих соединений в медицине и сельском хозяйстве.

## Глава 14 ГИББЕРЕЛЛИНЫ

Гиббереллины — группа физиологически активных соединений — регуляторов роста растений, гормональной природы. Они синтезируются как высшими растениями, так и микроорганизмами. Некоторые из гиббереллинов найдены только у микроорганизмов или только у высших растений. Однако описаны гиббереллины, присутствующие как у тех, так и других организмов (рис. 14.1).

Многосторонняя и очень высокая физиологическая активность гиббереллинов в отношении высших растений вызывает большой интерес к этим метаболитам. Удлинение обработанных гиббереллином растений — один из очевидных эффектов действия препарата гиббереллина. Цитологическая основа этого эффекта заключается в ускорении деления клеток растений или усилении их растяжения. Экзогенные гиббереллины стимулируют рост как травянистых, так и древесных растений, но у первых реакция выражена гораздо сильнее. Гиббереллины играют важную роль в метаболических процессах, обуславливающих переход растений к цветению. Многочисленные морфофизиологические реакции растений, наблюдаемые в ответ на действие гиббереллинов, как правило, не являются первичными и обусловлены взаимодействием гиббереллинов с большим числом других факторов, в том числе с эндогенными регуляторами растений.

Промышленное получение гиббереллинов осуществляют при культивировании грибов, относящихся к аскомицетам, в частности *Gibberella fujikuri* (в конидиальной стадии — *Fusarium moniliforme*). Выделяют гиббереллины из фильтрата культуральной жидкости.

В настоящее время описано более пятидесяти соединений, объединенных общим названием гиббереллины. По химической природе все они являются тетрациклическими карбоновыми кислотами, относящимися к дитерпенам (рис. 14.1). Гиббереллины

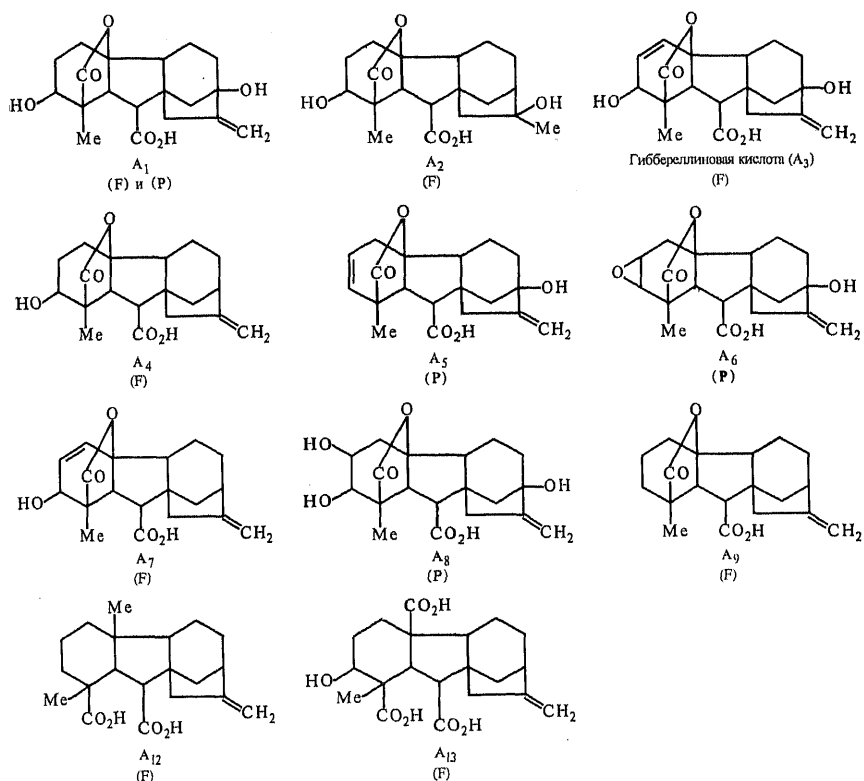
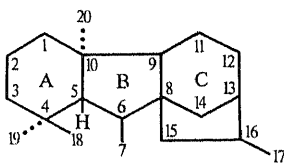


Рис. 14.1. Структура гиббереллинов грибного (F) и растительного (P) происхождения

обозначают символом А с цифрой справа внизу, порядковым номером, который присваивается каждому новому гиббереллину по мере выделения и идентификации. В зависимости от числа углеродных атомов гиббереллины делят на две группы. К одной из них относятся соединения, имеющие 20 атомов углерода. Это истинные дитерпены, число атомов углерода в их молекуле кратно пяти. К другой группе принадлежат C<sub>19</sub>-углеродные соединения, которые своим биосинтетическим происхождением обязаны C<sub>20</sub>-производным. Основные структурные различия между гиббереллинами определяются характером заместителей в кольце А. C<sub>19</sub>-гиббереллины содержат лактонную группировку в положении 19→10.

Структура гиббереллинов рассматривается как производное гипотетического углеводорода энт-гиббереллана, нумерация атомов в нем соответствует таковой у других циклических дитерпенов:



Наиболее распространенным и одним из самых физиологически активных гиббереллинов является соединение  $A_3$ , получившее название гибберелловой (гиббереллиновой) кислоты. Гиббереллин  $A_3$  — бесцветное, нелетучее вещество, хорошо растворимое во многих спиртах, кетонах и сложных эфирах, плохо растворимое в воде. Гиббереллин  $A_3$  — основная составная часть коммерческого препарата. При биосинтезе гиббереллинов культурой *Fusarium moniliforme* компонент  $A_3$  преобладает над другими производными. У большинства гиббереллинов тетрациклическое ядро несет ряд постоянных заместителей: в положении С-7 — карбоксильная группа; С-17 — обычно экзометиленовая связь; С-18 — чаще всего  $\text{CH}_3$ -группа, за исключением  $A_{21}$  и  $A_{22}$ ; при С-19 образуется  $19 \rightarrow 10$   $\delta$ -лактон или карбоксильная группа (рис. 14.1).

Получение гиббереллинов с помощью *F. moniliforme* рассматривается как типичный двухфазный процесс микробиологического синтеза, при котором вначале происходит интенсивное накопление биомассы, а затем образование продукта. Главным условием, обеспечивающим высокую продуктивность культуры, следует считать истощение источников азота в среде при сохранении высокого уровня соединений углерода.

При культивировании продуцента в глубинных условиях в качестве источника азота положительный эффект оказывают виннокислая соль аммония (0,7%) и особенно соевая мука (3%). Из других соединений — сахароза или глюкоза (4—6%). На средах, содержащих названные компоненты, концентрация гиббереллинов достигает 200 мг/л. Технологическим решением для обеспечения избытка углерода может быть выращивание продуцента на полноценной среде, а затем перенос биомассы на несбалансированную по составу среду с лимитом по азоту. Возможно также дробное добавление источника углевода по ходу культивирования, при этом его концентрация не должна превышать 1—4%. Этот прием используют как при периодическом, так и при непрерывном процессах. Такой метод исключает угнетение синтеза.

Кроме углеводов, в качестве источника углерода предложены различные жиры и масла, которые можно использовать при ведении одностадийного процесса. Благодаря их практической нерастворимости, жиры и масла медленно ассимилируются продуцентом и сохраняются в необходимом для синтеза гиббереллинов количестве в продуктивной фазе.

При лимите среды по азоту иногда наблюдается увеличение биомассы мицелия. Как показал анализ, происходит это путем синтеза и накопления в мицелии полисахаридов и жиров, име-

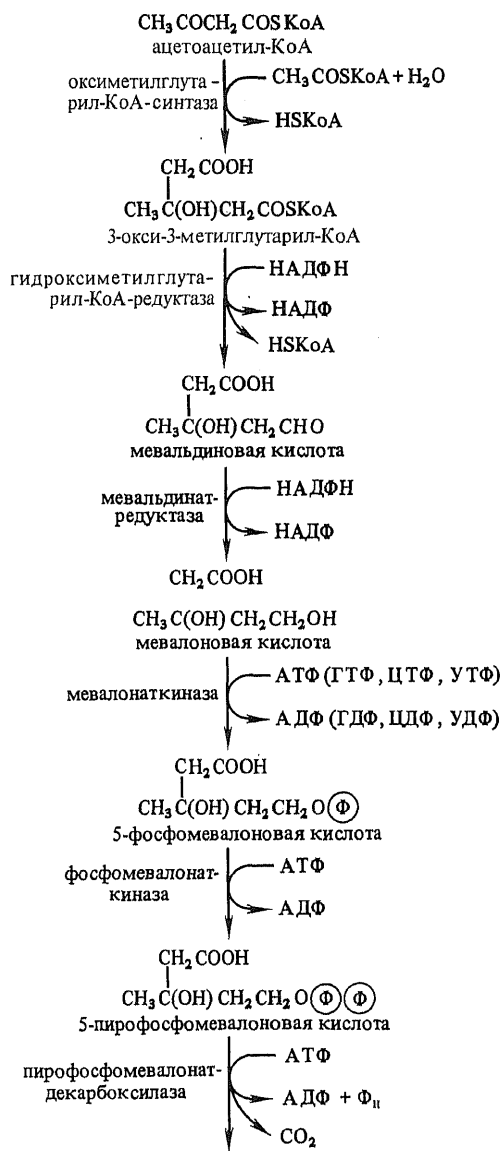
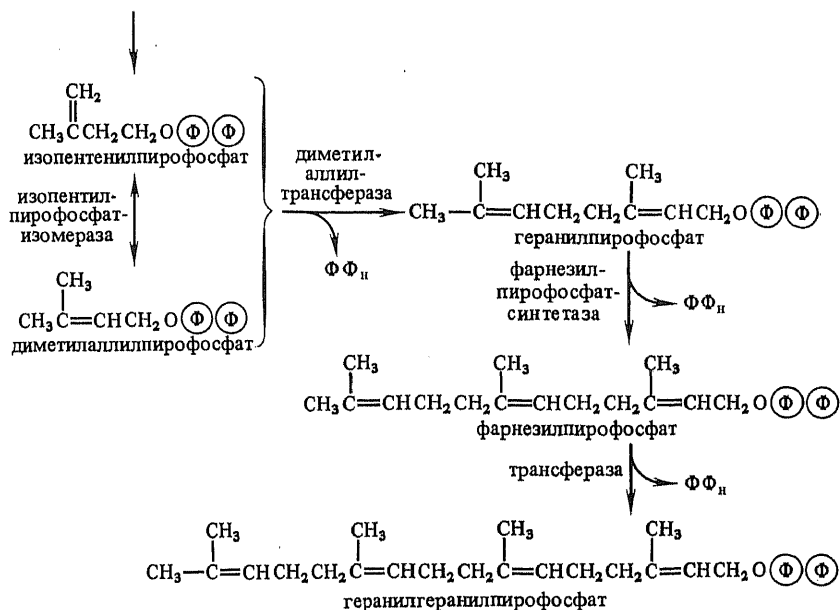


Рис. 14.2. Путь биосинтеза геранилгеранилпирофосфата из ацетоацетил-КоА  
Продолжение рис. 14.2 см. на с. 329.

ющих высокое содержание в клетках. Характерная особенность процесса биосинтеза гиббереллинов — низкое значение рН среды (3,0—4,5), при котором происходит их образование.

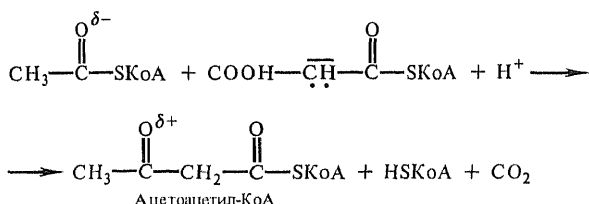


Продолжение рис. 14.2

Режим аэрации, перемешивания и другие существенные детали технологического процесса в значительной степени зависят от оборудования, конструкции аэрирующих и перемешивающих устройств, от состава среды, особенностей продуцента.

Биогенез молекул гиббереллинов в настоящее время достаточно хорошо изучен. Как и многие другие микробные метаболиты, гиббереллины, несмотря на кажущуюся сложность их структур, построены из нескольких относительно простых структурных или так называемых ацетатных единиц. Последние участвуют также в биосинтезе липидов, каротиноидов и ряда других продуктов, которые принято относить к вторичным метаболитам.

Образование гиббереллинов представляет собой частный случай синтеза терпенов. В литературе его часто именуют как синтез через мевалоновую кислоту. До определенного этапа пути биогенеза каротиноидов и терпенов идентичны. Исходным для синтеза является ацетил-КоА. Рост цепи начинается с карбоксильной группы ацетил-КоА путем последовательного ее увеличения на два углеродных атома. Каждые последующие два углеродных атома (или ацетильные остатки) происходят из малонил-КоА. В ходе реакций атом углерода, принадлежащий свободной карбоксильной группе, теряется в виде  $\text{CO}_2$ . Ацетил-КоА в этой реакции выступает в электрофильной форме, а малонил-КоА — в нуклеофильной, т. е. имеет место электрофильная атака:



Таким образом, свободная гидроксильная группа каждого нового остатка малонил-КоА замещается на карбоксил растущей цепи ацил-КоА. В результате декарбоксилирования происходит активация концевой группы вследствие возникновения отрицательного заряда. К ацетоацетил-КоА благодаря активности оксиметилглутарил-КоА-синтетазы присоединяется еще одна ацетатная единица, в результате чего образуется 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (рис. 14.2). Последний в результате НАД-зависимого ферментативного восстановления превращается в мевалоновую кислоту (3,5-диокси-3-метилвалериановая кислота).

Промежуточным продуктом, не выступающим в свободной форме, является мевальдиновая кислота. Восстановление — практически необратимая реакция. Мевалоновая кислота обычно рассматривается как прямой и специфический предшественник изопреновых производных.

Далее в цепи биогенеза мевалоновая кислота подвергается фосфорилированию АТФ, протекающему в три этапа. На первом из них образуется 5-фосфомевалоновая кислота, затем — 5-пирофосфомевалоновая кислота. Третья реакция фосфорилирования сопровождается декарбоксилированием, в результате образуется изопентенилпирофосфат. Последний подвергается изомеризации в 3', 3'-диметилаллилпирофосфат. При нуклеофильной атаке диметилаллилпирофосфата изопентенилпирофосфатом образуется геранилпирофосфат, имеющий в своем составе 10 углеродных атомов.

Дальнейшие трансферазные (синтетазные) реакции приводят к образованию фарнезилпирофосфата — соединения, содержащего 16 углеродных атомов и первого в данном ряду ациклического дитерпена геранилгеранилпирофосфата с 20 углеродными атомами (рис. 14.2).

Следующие этапы синтеза, ведущие в итоге к гиббереллинам, менее изучены, чем предыдущие. Неизвестны некоторые ферменты, ответственные за происходящие реакции. Возможно, что не все промежуточные соединения полностью идентифицированы. Тем не менее общий ход процесса понятен. Протон-иницированная циклизация геранилгеранилпирофосфата приводит к образованию бициклической структуры, имеющей энантиомер. Депротонизация последнего дает лабадиенолпирофосфат (лабадиен), циклизующийся затем до пимарадиена.



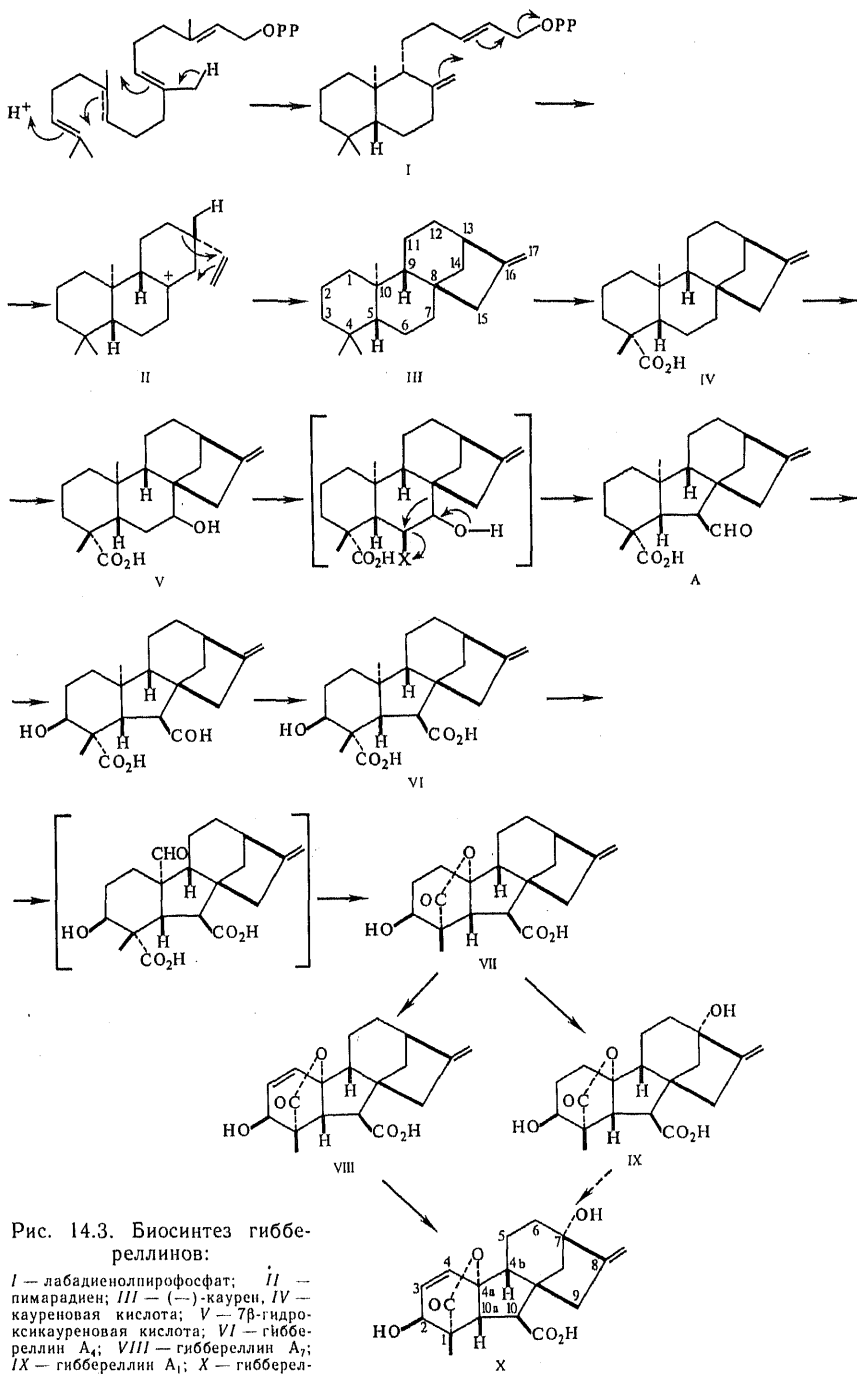


Рис. 14.3. Биосинтез гиббереллинов:

I — лабдиенолпирофосфат; II — пимарадиен; III — (-)-каурен; IV — кауреновая кислота; V — 7β-гидроксикауреновая кислота; VI — гиббереллин A<sub>4</sub>; VII — гиббереллин A<sub>7</sub>; VIII — гиббереллин A<sub>1</sub>; IX — гиббереллин A<sub>1</sub>; X — гибберелловая кислота (гиббереллин A<sub>3</sub>)

Пимарадиен служит исходным продуктом синтеза (—)-каурена. На уровне каурена происходит переход от кауреноидного скелета к гиббановому. Общая схема реакций показана на рис. 14.3. Следует обратить внимание на заключительные этапы биосинтеза, когда  $C_{20}$ -гиббановые гиббереллины превращаются в  $C_{19}$ -гиббановые. Это превращение происходит с образованием  $\gamma$ -лактонной структуры, двойной связи, а у некоторых гиббереллинов, в том числе гибберелловой кислоты, — гидроксированием молекулы в седьмом положении. Ферментативные характеристики процесса не получили до настоящего времени надежного описания.

Для определения количественного содержания гиббереллинов в культуре применяются биологические и физико-химические методы.

В основе биологических методов лежит способность гиббереллинов стимулировать различные физиологические процессы у высших растений.

Количественный анализ гиббереллинов в культуральной жидкости проводят фотометрическим методом, который в ряде случаев требует предварительного освобождения от сопутствующих соединений, искажающих результаты. Количественный анализ индивидуальных гиббереллинов проводят методом тонкослойной хроматографии.

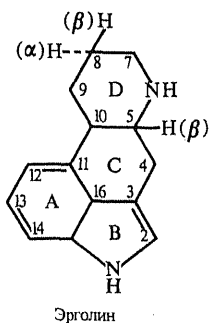
## Глава 15 АЛКАЛОИДЫ

Алкалоиды — большая группа азотсодержащих веществ, в большинстве своем довольно сложной структуры, имеющих основной характер и обладающих выраженным физиологическим действием на организм человека.

Большинство описанных алкалоидов выделено из высших растений. Изучение алкалоидов микроорганизмов только начинается. Однако давно известны алкалоиды спорыньи. Спорынья — одна из форм гриба *Claviceps*, паразитирующего на ржи и на некоторых других злаках. Полный цикл развития гриба включает три последовательные стадии: 1) конидиальная (сфецелия), 2) образование склероция и 3) прорастание склероция. Биосинтез алкалоидов происходит в стадии образования склероция.

Известно около 50 видов *Claviceps*, получивших видовые названия тех трав, на которых они растут. Из различных представителей *Claviceps* выделено около 40 алкалоидов.

Алкалоиды спорыньи являются индольными соединениями, в основе их строения лежит тетрациклическая система колец эрголина:

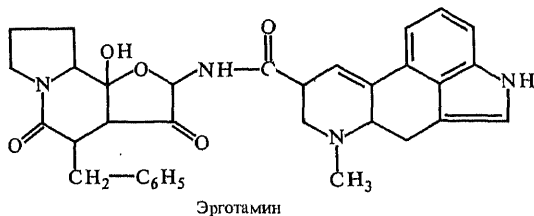
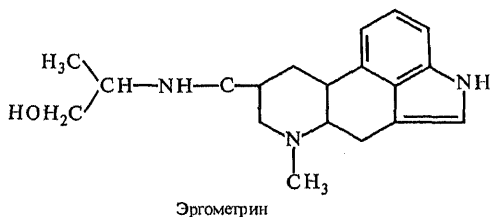


Алкалоиды спорыньи обычно делят на две группы. В первую входят соединения, производные лизергиновой и изолизергиновой кислоты, во вторую — алкалоиды клавинового типа.

Первую группу обычно подразделяют на пептидные алкалоиды и простые производные лизергиновой кислоты, такие, как амид лизергиновой кислоты, α-оксиэтиламид лизергиновой кислоты, эргометрин. Все известные эргоалкалоиды встречаются в двух формах: левовращающие и правовращающие. Физиологически активны лишь левовращающие алкалоиды, в основе которых лежит лизергиновая кислота.

Долгое время считали, что клавиновые и пептидные алкалоиды являются исключительно продуктами жизнедеятельности *Claviceps*. В настоящее время известны продуценты индольных алкалоидов среди грибов, относящихся к родам *Aspergillus*, *Penicillium* и ряда других.

Алкалоиды спорыньи обладают сильным фармакологическим действием. Благодаря способности вызывать сокращение гладкой мускулатуры такие эргоалкалоиды, как эргометрин и эрготамин, применяются в гинекологии.



Ряд алкалоидов используют при лечении мигрени, гипертонии, в психиатрической практике. Клавинный алкалоид агроклавин ингибирует лактацию.

К этой же группе относится обладающий галлюциногенными свойствами N,N-диэтил-D-лизергинамид (ЛСД), который получают путем микробиологического синтеза и последующей химической модификации.

Большинство видов *Claviceps* образуют алкалоиды только при паразитизме на растениях, лишь некоторые виды проявляют эту способность в условиях сапрофитного образа жизни.

В настоящее время применяют как глубинный, так и поверхностный способ культивирования продуцентов из рода *Claviceps*. Глубинные культуры спорыньи, видимо, образуют алкалоиды только при высоком осмотическом давлении. Общие представления о факторах, влияющих на синтез эргоалкалоидов, до сих пор не выяснены окончательно из-за значительных различий между штаммами-продуцентами.

Цитоморфологическое изучение одного из алкалоидпродуцирующих штаммов *Claviceps purpurea* показало, что культура является гетерокарионом, не дающим конидий. Штамм другого гетерокариона, продуцирующего эргоалкалоиды, был способен к споруляции. В настоящее время распространено представление о том, что только гетерокарионы способны обеспечить синтез алкалоидов в культурах вида *Claviceps* благодаря комплементарному действию мутантных аллелей в отдельных ядрах гетерокарионов.

Проведена проверка пригодности конидий и мицелия как посевного материала. Положительный результат получен только при использовании мицелия; при посеве конидиями синтез эргоалкалоидов не отмечался. Этот факт служит подтверждением указанной роли гетерокарионов. Последние в конидиях отсутствовали.

Алкалоидпродуцирующие штаммы *C. purpurea* весьма полиморфны. При высеве их на плотные среды наблюдается спонтанное расщепление на продуцирующие и не продуцирующие варианты. Визуально варианты различаются по окраске. Колония выглядит довольно пестро. Взятый из различных по окраске секторов колонии посевной материал имеет различную продуцирующую способность или она полностью отсутствует.

Глубинная культура *C. purpurea* на синтетической среде при синтезе эргоалкалоидов может содержать гифы и два типа клеток: конидии и хламидоспоры. Конидии обычно имеют по одному ядру, характерна для них зернистая цитоплазма с жировыми включениями и большими вакуолями. По ходу роста культуры они прорастают, образуя вегетативный мицелий.

Хламидоспоры в отличие от конидий имеют гомогенную цитоплазму, у них нет вакуолей, присутствует лишь несколько жировых включений. Хламидоспоры, как правило, имеют форму ганте-

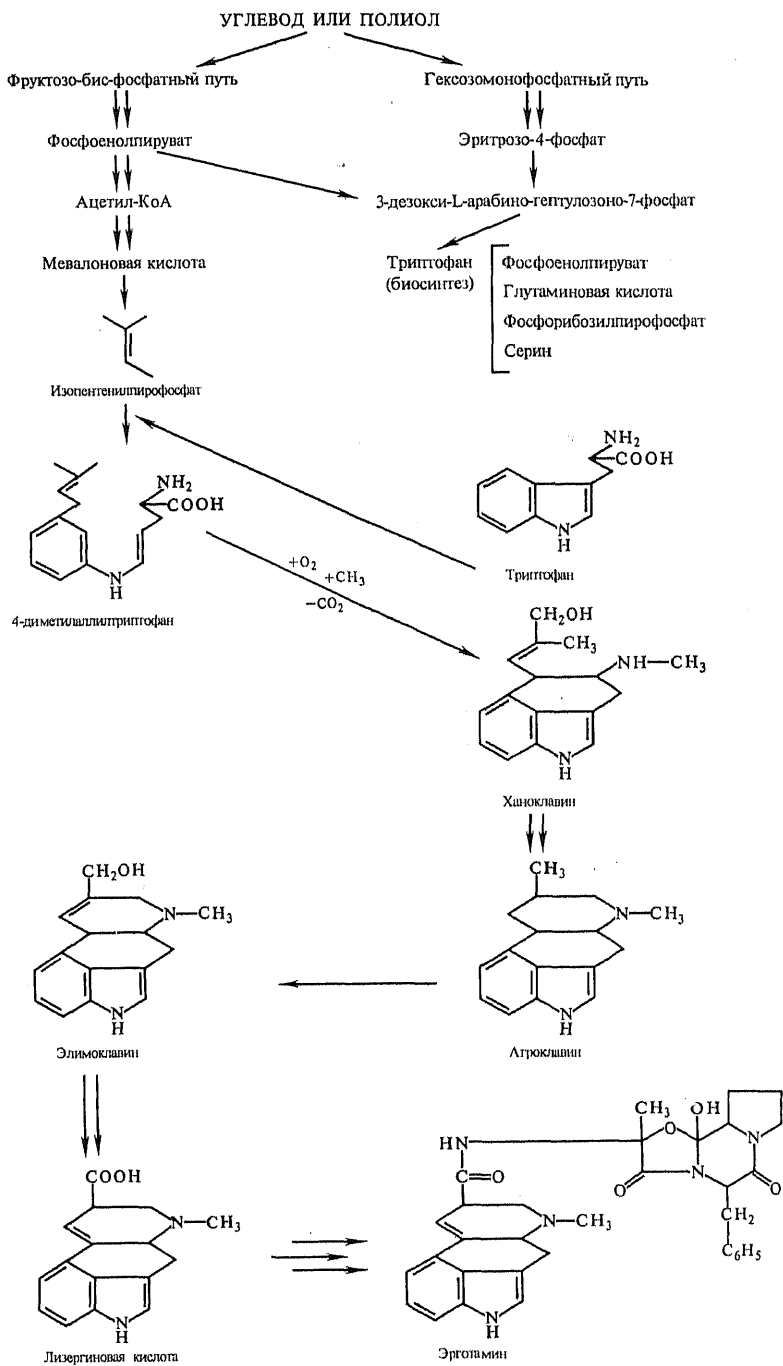


Рис. 15.1. Схема биосинтеза эрготамина

лей и обычно содержат два ядра. Хламидоспоры образуются из терминальных гифальных клеток. Количество их по ходу культивирования возрастает, достигая максимума к началу интенсивного синтеза алкалоидов, и сохраняется в течение всего синтеза.

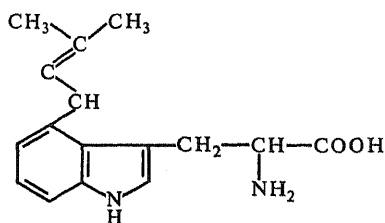
Отмечено, что продуцирующие алкалоиды штаммы спорыньи способны накапливать большое количество липидов, в частности стеролов. При изучении ультраструктуры хламидоспор алкалоидсинтезирующих клеток были обнаружены органеллы, имеющие 0,3—1,0 мкм в диаметре, ограниченные мембраной и окруженные жировыми каплями. Органеллы сорбируют на себе жиры, вследствие чего получили название липидсорбирующих телец. Предполагают, что они имеют отношение к синтезу алкалоидов, мобилизуя резервы клеточных липидов в качестве конструктивного материала.

Что касается закономерностей между ростом культуры, обменом веществ и синтезом эргоалкалоидов, то имеются данные достаточно общего характера. Известно, что условия культивирования, благоприятные для синтеза первичных метаболитов, как правило, не подходят для синтеза вторичных, к числу которых могут быть отнесены эргоалкалоиды. Для биосинтеза алкалоидов благоприятен замедленный рост культуры, но эти наблюдения касаются только тех продуцентов, у которых синтез алкалоидов и рост культуры протекают одновременно. Подобной зависимости не отмечено для тех случаев, когда алкалоиды синтезировались в конце культивирования.

Лучшими источниками углерода для синтеза эргоалкалоидов считается маннит в сочетании с янтарной кислотой. Из источников азота — аммонийные соли, но для большинства штаммов *Claviceps* как источник азота предпочтителен дрожжевой экстракт. Концентрацию фосфата необходимо подбирать опытным путем, так как поддерживающая рост культуры концентрация его подавляет синтез алкалоидов. Феномен, обычный для вторичного метаболизма. Фосфаты, очевидно, проявляют разнообразный эффект на метаболизм. Однако главное, очевидно, заключается в определенном влиянии фосфатов на синтез АТФ. Известно, что увеличение концентрации АТФ в клетках и снижение уровня ее использования благоприятны для синтеза алкалоидов.

Добавление триптофана к среде повышает выход алкалоидов у многих штаммов *Claviceps*. Наибольшее повышение наблюдалось при добавлении триптофана в начале ферментации, т. е. до начала синтеза алкалоидов. Если начальные фазы роста гриба протекают в присутствии избытка триптофана, мицелий активно синтезирует алкалоиды.

Биогенез исходной структуры эргоалкалоидов 4-диметилаллилтриптофана у продуцентов эргоалкалоидов из рода *Claviceps* первоначально протекает одновременно по двум направлениям: синтез триптофана и синтез диметилаллилпирофосфата.



4-Диметилаллилтриптофан

Синтез молекулы 4-диметилаллилтриптофана происходит благодаря активности диметилаллилпирофосфат:триптофандиметилаллилтрансферазы, переносящей диметилаллилпирофосфат на триптофан (рис. 15.1). Синтез диметилаллилпирофосфата осуществляется таким же образом, как это имеет место при биосинтезе каротиноидов, т. е. через мевалоновую кислоту и ее фосфорные эфиры. Однако мевалоновая кислота не является лимитирующим или индуцирующим фактором при образовании эргоалкалоидов.

Поскольку синтез эргоалкалоидов происходит внутри клетки продуцента, существенное значение имеет содержание триптофана в ее метаболическом фонде. Триптофан может поступать в клетку из среды или синтезироваться продуцентом. Синтез триптофана контролируется по принципу обратной связи. Внутриклеточный пул триптофана имеет два (три) периода нарастания предшествующих биосинтезу эргоалкалоидов.

Триптофан выполняет также регулирующую функцию. В клетке в течение роста система синтеза алкалоидов находится в репрессированном состоянии. Триптофан в клетке связывается репрессором, вследствие чего происходит дерепрессия синтеза алкалоидов. Однако, как сказано выше, синтез самого триптофана контролируется механизмом обратной связи. Отмечено также, что ингибирующий эффект фосфат-иона на синтез алкалоидов может быть снят при наличии определенной концентрации триптофана в среде.

Кроме эргоалкалоидов микроорганизмы способны синтезировать и другие алкалоиды, отличные от таковых по своей химической природе. В первую очередь следует назвать соединения, относящиеся к числу производных хинолина. Из различных культур бактерий рода *Pseudomonas* выделены алкалоиды — псевданы. По строению они представляют собой 2-*n*-алкил и 2-*n*-алкинил производные 4-оксихинолина. Культура гриба *Penicillium viridicatum* синтезирует другое производное хинолина — виридикатин.

Бензодиазепенин — производное алкалоидов циклопенина и циклопенола также образуют грибы из рода *Penicillium*. Циклопенин структурно близок к синтетически полученным бензодиазепин-производным, известным как антиконвульсивные средства и транквилизаторы.

## Глава 16 АМИНОКИСЛОТЫ

В последние годы широкое применение в народном хозяйстве и медицине находят различные аминокислоты. Особое значение они имеют для сбалансирования белкового питания. Некоторые пищевые и кормовые продукты не содержат в своем составе необходимых количеств незаменимых аминокислот, в частности лизина. К таким продуктам относятся пшеница, кукуруза, овес, рис и ряд других. Для ликвидации возможного дисбаланса аминокислоты используют в чистом виде или вводят в состав комбинированных кормов, выпускаемых промышленностью. Поэтому основной сферой применения аминокислот следует считать создание рационов, позволяющих понизить содержание растительных белков в кормах. Показано, что искусственные смеси аминокислот позволяют экономить расход естественных кормов. Кроме добавок к кормам сельскохозяйственных животных аминокислоты используются в пищевой промышленности. Применяются они и при изготовлении ряда полимерных материалов, например синтетической кожи, некоторых специальных волокон, пленок для упаковки пищевых продуктов. Ряд аминокислот или их производных обладают пестицидным действием. Метионин и  $\gamma$ -аминомасляная кислота широко применяются как лекарственные средства. Удельный вес применений аминокислот в различных отраслях хозяйства может быть продемонстрирован на примере Японии, где на долю пищевой промышленности приходится 65 % всех производимых в стране аминокислот, на животноводство — 18, для медицинских целей — 15 и на прочие нужды — 2 %. Мировой уровень производства аминокислот достигает в настоящее время нескольких миллионов тонн в год. В наибольших количествах в мире вырабатываются L-глутаминовая кислота, L-лизин, DL-метионин, L-аспарагиновая кислота, глицин. Основными способами получения аминокислот являются следующие: экстракция из белковых гидролизатов растительного сырья, химический синтез, микробиологический синтез растущими клетками, при использовании иммобилизованных микробных клеток или ферментов, выделенных из микроорганизмов.

На примере Японии, занимающей лидирующее положение в мире по производству продуктов микробного синтеза, можно проследить основные методы получения аминокислот (табл. 16.1).

Микробиологический синтез — в настоящее время весьма перспективный и экономически выгодный способ получения многих аминокислот. В процессе культивирования продуцентов аминокислот непосредственно синтезируются L-аминокислоты. Одна из важных задач микробиологического синтеза аминокислот — получение высокоактивных штаммов — продуцентов, в частности, с использованием методов генной инженерии. Именно таким способом в СССР получен высокоактивный штамм — продуцент L-треонина.

Кроме микробиологического синтеза аминокислоты можно по-



**Т а б л и ц а 16.1. Способы производства аминокислот и их объем в Японии (по данным 1977 г.)**

Аминокислота	Способ производства	Объем производства, т/г
Аланин	Ф, Х	150—200
Аргинин	М, Х, Г	100—300
Аспарагиновая кислота	Ф	1 000
Аспарагин	Х, Г	10—50
Цитруллин	М, Х	10—50
Цистеин	Г	1—10
Цистин	Г	100—200
Глицин	Х	5000—6000
Глутаминовая кислота	М	100 000
Гистидин	М, Г	100—200
Гомосерин	М	10—50
Оксипролин	Г	10—50
Глутамин	М	200—300
Изолейцин	М, Г	10—50
Лейцин	М, Г	50—100
Лизин	М	15 000
Метионин	Х	60 000—70 000
L-Метионин	М	100—200
Орнитин	М, Г	10—50
Фенилаланин	М, Х	50—100
Пролин	М, Г	10—50
Серин	М, Г	10—50
L-Треонин	М	50—100
DL-, L-триптофан	Х, Ф	100
Тирозин	М, Г	10—100
Валин	М	50—100
ДОФА	Ф	0,1

Обозначения: ф — ферментативный синтез, Х — химический синтез, М — микробиологический синтез, Г — путем экстракции из белковых гидролизатов животного и растительного сырья, ДОФА — 3,4-диоксифенилаланин

лучать, как указано выше, путем гидролиза природного белок-содержащего животного и растительного сырья. Это наиболее старый способ. Основным его недостатком является нерациональное использование сырья, которое с большой пользой может применяться в качестве белковых кормов или пищевых продуктов. Например, в странах юго-восточной Азии моноглутамат натрия получают из соевого шрота (обезжиренная соевая мука). В США описан способ получения аминокислот из клейковины пшеницы и кукурузного глютена, остающегося после отмывки крахмала. В равной мере, очевидно, могут быть названы и другие белки, однако их использование для получения аминокислот экономически невыгодно.

Химический синтез аминокислот достаточно эффективен, позволяет получить соединения любой структуры и организовать непрерывное производство при высокой автоматизации. В нем в основном используется непищевое сырье, достигается высокая концентрация продукта. Однако, как правило, процесс этот многостадийный и требует сложной аппаратуры. Главный недостаток

химического синтеза — получение рацемической формы аминокислот. Пока не разработаны достаточно эффективные и дешевые пути разделения соединений на оптические изомеры. Химический синтез рентабелен для получения только тех аминокислот, которые могут быть использованы в виде рацемического продукта. Наиболее хорошо разработан химический синтез LD-метионина, главным потребителем которого является птицеводство. L- и D-изомеры метионина усваиваются организмами одинаково хорошо.

В последние годы имеются успехи в области асимметрического синтеза аминокислот, позволяющие избежать оптического разделения рацемических аминокислот. Новый подход к этой проблеме стал возможен благодаря открытию гомогенного каталитического гидрирования олефинов с помощью комплексов родия с фосфиновыми лигандами и разработке путей синтеза хиральных фосфинов. Применение комплексов родия с хиральными фосфинами в качестве гомогенных катализаторов для гидрирования N-ациламиноакриловых кислот позволило осуществить асимметрический синтез  $\alpha$ -аминокислот с высокой степенью стереоспецифичности и хорошими выходами.

Использование для пищевых, кормовых и медицинских целей аминокислот, полученных химическим синтезом, ставит еще одну существенную технологическую проблему — полное освобождение готового продукта от возможных токсических полупродуктов синтеза.

В последние годы прочные позиции начинает занимать комбинированный химико-микробиологический метод синтеза, при котором исходное соединение получают в результате химических реакций, а конечная стадия осуществляется за счет активности ферментных систем соответствующих штаммов микроорганизмов.

Микробиологический метод синтеза аминокислот основан на способности многих микроорганизмов накапливать в среде значительные количества таких продуктов. Среди микроорганизмов, получивших оценку как потенциальные продуценты глутаминовой кислоты, обнаружено много бактерий, ряд дрожжей и других грибов. Большинство обследованных штаммов микроорганизмов независимо от их систематического положения преимущественно накапливают  $\alpha$ -аланин и глутаминовую кислоту. Значительно меньше штаммов и в меньшем количестве выделяют аспарагиновую кислоту, лейцин, валин, изолейцин, лизин. Строгой корреляции между видовой принадлежностью микроорганизмов и способностью их накапливать аминокислоты нет.

Несмотря на широкое распространение микроорганизмов, накапливающих аминокислоты в процессе роста, продуцентов, обеспечивающих экономически выгодные выходы этих продуктов, не так много. Получают их обычно путем применения различных мутагенных факторов. Продуцент должен аккумулировать преимущественно одну аминокислоту. Одновременное присутствие нескольких аминокислот, особенно если они близки по своим физико-химическим свойствам, затрудняет их выделение и очистку.

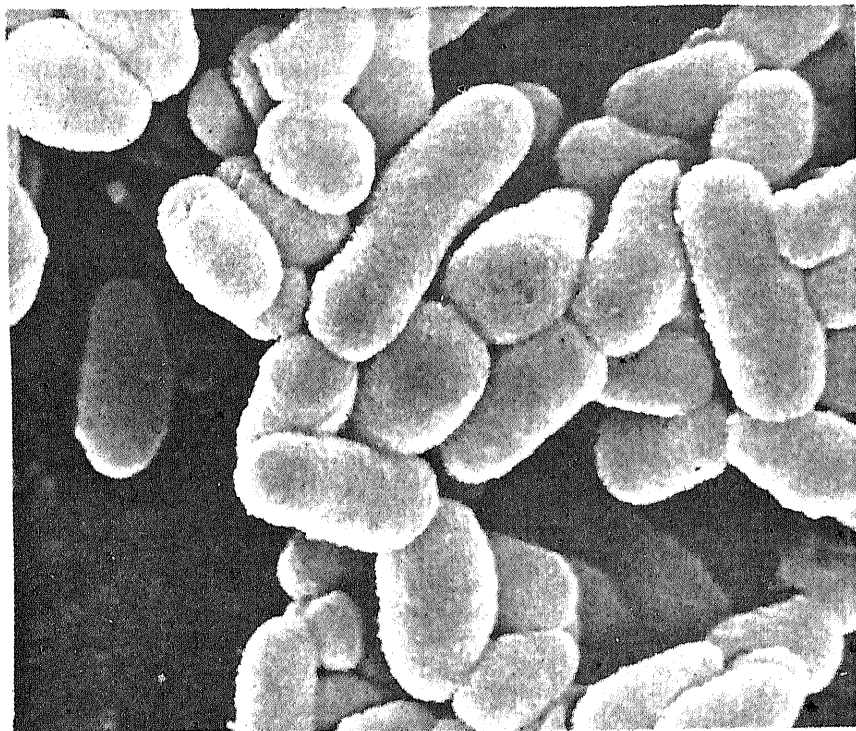


Рис. 16.1. Продукент лизина *Brevibacterium* sp. 22 ( $\times 22\,000$ ).

Ауксотрофные мутанты микроорганизмов, лишённые в результате действия мутагенов, ряда ферментных систем, признаны наиболее ценными продуцентами. Блокада у таких мутантов соответствующих реакций в цепи обмена веществ приводит к сверхсинтезу одного из метаболитов (см. схему биосинтеза лизина).

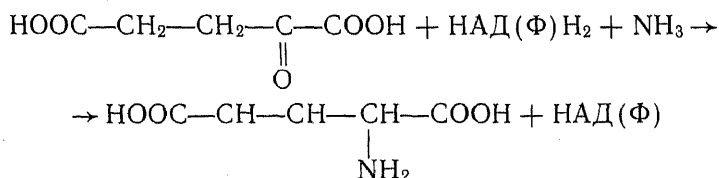
Наиболее распространённые продуценты аминокислот—грамположительные бесспорные бактерии, относимые к родам *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* (рис. 16.1) и некоторым другим, но точное таксономическое положение большинства из них определить трудно, так как содержащаяся в публикациях информация явно недостаточна для этого.

Одним из наиболее важных научных положений микробиологического синтеза аминокислот считается вопрос об их происхождении: находящиеся в среде аминокислоты — продукты ферментативного распада белков в результате автолитического процесса или они результат синтеза из других соединений? При использовании синтетических сред для культивирования продуцентов достаточно определённо показано, что аминокислоты, обнаруживаемые в среде, представляют собой продукты синтеза *de novo*.

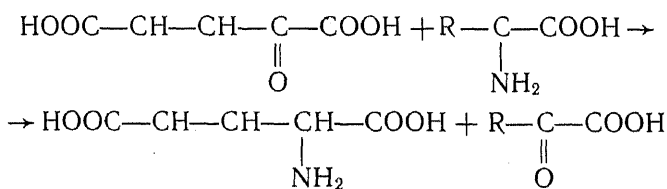
Ферментативные реакции синтеза аминокислот протекают внутри клеток. Первоначально аминокислоты накапливаются внутри клеток в виде так называемых свободных аминокислот. На ранних этапах роста культуры свободные аминокислоты включаются в конструктивный обмен микроорганизма. Активное накопление аминокислот в среде в периодической культуре происходит обычно с середины экспоненциальной фазы ее роста, достигая максимума к концу.

### 16.1. БИОСИНТЕЗ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

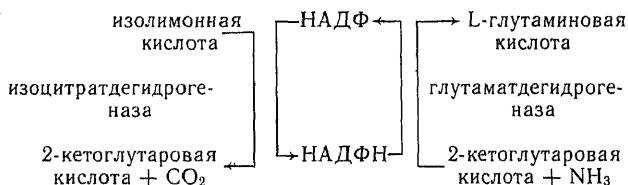
При биосинтезе глутаминовой кислоты непосредственным метаболическим предшественником служит 2-кетоглутаровая кислота, которая образуется обычно благодаря функционированию в клетках цикла трикарбонных кислот (ЦТК) или его части. Синтез глутаминовой кислоты происходит в результате ферментативного восстановительного аминирования 2-кетоглутаровой кислоты за счет НАД- или НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы:



2-Кетоглутаровая кислота способна также вступать в реакцию переаминирования с аминокислотами, осуществляемую трансаминазами. Коферментом в реакции переаминирования служит пиридоксаль-5-фосфат:



В ЦТК 2-кетоглутаровая кислота образуется из изолимонной кислоты под действием изоцитратдегидрогеназы. Необходимый для синтеза глутаминовой кислоты НАД(Ф)Н постоянно регенерируется при окислении изолимонной кислоты в 2-кетоглутаровую.





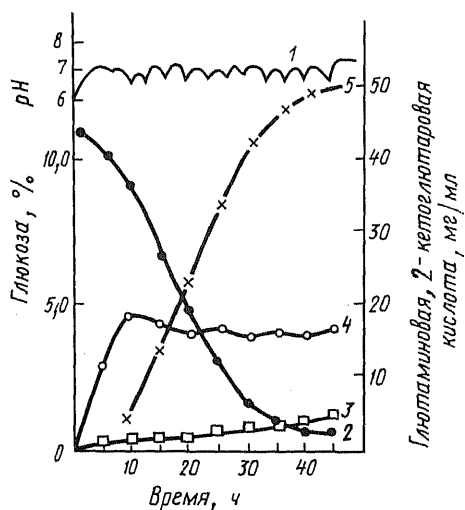


Рис. 16.3. Основные показатели культуры *Corynebacterium glutamicum* при получении глутаминовой кислоты с дробной добавкой мочевины:

1 — pH, 2 — глюкоза 3 — 2-кетоглутаровая кислота, 4 — биомасса, 5 — глутаминовая кислота

распространение в качестве углеводного компонента среды углеводовороды, этанол, метанол, уксусная кислота. Из источников азота — соли аммония или мочевины. Концентрация соединений углерода в средах при получении глутаминовой кислоты обычно довольно высокая, до 5—10 %. Исходная концентрация источника азота — низкая. При таком соотношении азота к углероду в среде неизбежно понижение уровня pH. Вместе с тем такое соотношение ведет к ограниченному росту биомассы продуцентов и, с другой стороны, к накоплению метаболического предшественника глутаминовой кислоты — 2-кетоглутаровой кислоты. Для включения в реакцию синтеза глутаминовой кислоты, синтезированной продуцентом 2-кетоглутаровой кислоты, в среду периодически вводят источник азота. Один из наиболее подходящих источников азота — мочевины. Последняя разлагается уреазой продуцента с выделением аммиака, вступающего в реакцию с 2-кетоглутаровой кислотой, образуя глутаминовую кислоту. Введение раствора мочевины осуществляется автоматически, когда уровень pH в среде достигает некоторой контрольной величины. Накопление глутаминовой кислоты происходит только тогда, когда рост *Corynebacterium glutamicum* закончен (рис. 16.3).

Некоторые продуценты глутаминовой кислоты, например *C. glutamicum*, способны при изменении условий культивирования накапливать в среде L-глутамин, который, вероятно, образуется из глутаминовой кислоты. Реакция происходит при участии глутамин-синтетазы:

ровую кислоту (или ее соль), буфер, обеспечивающий оптимум ферментативной реакции и, суспензию клеток, обладающих глутаматдегидрогеназной активностью. Но метод этот не получил развития и был вытеснен экономически более выгодным методом с использованием растущих культур микроорганизмов.

При получении глутаминовой кислоты таким способом в качестве источника углерода можно использовать глюкозу; крахмал, из технических продуктов — малассу, гидрол (маточник, остающийся после кристаллизации глюкозы). В последние годы получают



нечного продукта реакции ингибирует собственный синтез. В одном случае подавляется активность одного или ряда ферментов, происходит явление ретроингибирования, связанное с аллостерическим эффектом. В другом — прекращается синтез самого фермента, происходит репрессия. Отсюда очевидно, что наличие в среде ряда аминокислот должно быть в строго ограниченном количестве, достаточном только для роста культуры. Узловым ферментом в синтезе лизина является аспараткиназа. Угнетают ее активность лизин и треонин при их совместном действии, так как аспараткиназа представляет собой мультивалентный фермент. Треонин ингибирует у *S. glutamicum* дегидрогеназу полуальдегида аспарагиновой кислоты и гомосериндегидрогеназу.

Метионин по отношению к гомосериндегидрогеназе является репрессором. Изолейцин ингибирует треониндегидрогеназу. Следовательно, продукты обмена веществ, ингибирующие различные ферменты, участвующие в синтезе лизина, должны быть выведены из сферы реакции. Именно поэтому мутантные штаммы микроорганизмов наиболее удобны для производства. Так, штаммы, лишенные активности гомосериндегидрогеназы, обеспечивают достаточно высокие выходы лизина.

Аминокислоты, необходимые для роста микроорганизмов, вносятся в среду. Они обычно содержатся в природных продуктах, например в мелассе. Но их количество должно контролироваться, чтобы не были созданы условия, при которых аминокислоты выступают в качестве регуляторов процесса. Одним из компонентов среды, оказывающим влияние на ход биосинтеза аминокислот, является фосфор (в виде фосфата). Так, при увеличении оптимальной для накопления лизина концентрации фосфора в десять раз количество лизина снижается на 40 %, а содержание других аминокислот, особенно валина, значительно увеличиваются.

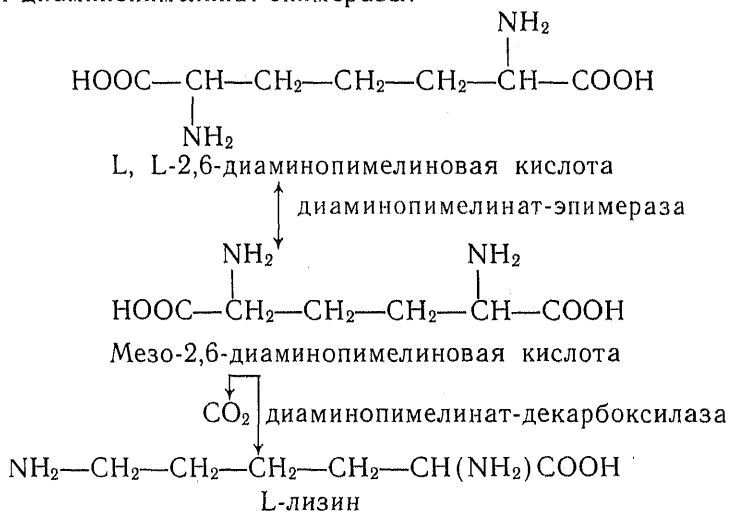
При изучении механизмов регуляции образования целевых продуктов преимущественное внимание обычно обращают на конечные этапы биосинтеза, как это было показано выше на примере лизина. Но важно знать и весь путь биосинтеза с точки зрения оценки ферментативной активности всех реально функционирующих систем. Интерес может представлять соотношение количеств глюкозы, включающихся в обмен по фруктозобисфосфатному пути или через гексозомонофосфатный путь. Последний путь способен обеспечить процесс большим количеством восстановленной формы никотинамиддинуклеотид (фосфат)а, а также синтез продуктов, образующихся через шикимовую кислоту.

Применительно к механизму синтеза лизина несомненный интерес имеет функция цикла трикарбоновых кислот. Известно, что синтез лизина проходит через ЦТК, далее — через аспарагиновую кислоту после аминирования щавелевоуксусной и ее фосфорилированное производное. Поэтому вполне закономерен вопрос о коррелятивных взаимоотношениях величин активности ферментов брожения, ЦТК и синтезом лизина. В непосредственной связи с этим вопросом находится представление о влиянии



концентрации источника углерода на синтез лизина. Показано, что при увеличении концентрации углеводов в среде в культуре *Brevibacterium* sp. выше некоей эмпирически установленной оптимальной величины, удлиняется лаг-фаза, увеличивается удельная скорость роста в экспоненциальной фазе, но снижается выход лизина и изменяется активность ферментов пути Эмбдена — Мейергофа — Парнаса и ЦТК. Следует отметить, что оптимальная для синтеза лизина концентрация углеводов не является постоянной. Она зависит от многих показателей, в частности от интенсивности перемешивания среды. Максимальная лизин-синтезирующая активность продуцента *Brevibacterium* sp. обычно наблюдается при высокой активности ферментов ЦТК.

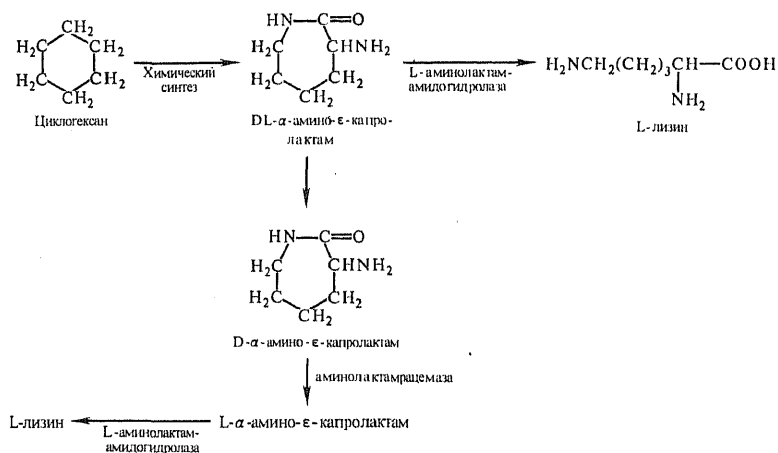
Одним из способов получения лизина является ферментативный метод, при котором субстратом служит мезо-изомер 2,6-диаминопимелиновой кислоты, а фермент — диаминопимелинат-декарбоксилаза. Практически используют суспензию микробных клеток, в частности *Brevibacterium* sp., предварительно выращенных на соответствующей среде. Иногда микробные клетки предварительно обрабатывают ацетоном для получения «ацетонового порошка». Однако применение такого метода не всегда возможно, особенно в тех случаях, когда 2,6-диаминопимелиновая кислота не способна проникать в клетки микроорганизма, где протекает ее декарбоксилирование. В этом случае рекомендуется проводить дезинтеграцию клеток в условиях, исключающих инактивацию фермента. Диаминопимелинат-декарбоксилаза *Brevibacterium* sp. представляет собой аллостерический фермент с несколькими активными центрами. Для ее активности необходим пиридоксальфосфат. Прежде чем произойдет реакция декарбоксилирования, субстрат (2,6-диаминопимелиновая кислота) должен быть переведен в мезо-форму из L,L-изомера благодаря активности диаминопимелинат-эпимеразы:



Предложено также несколько технологических способов перевода L,L-2,6-диаминопимелиновой кислоты в мезо-форму (например, тепловая обработка при 200 °С, пропускание через сульфокатионит в H-форме и др.).

Разработаны методы культивирования *Brevibacterium* sp., обеспечивающие высокую декарбоксилазную активность, участвующую в синтезе лизина. Наибольшая удельная активность фермента на полусинтетической среде наблюдается через 18—20 ч роста культур, т. е. в конце экспоненциальной фазы, на меласной — в середине экспоненциальной фазы роста.

Показана, кроме того, возможность конверсии в лизин DL-α-амино-ε-капролактама. Для осуществления процесса первоначально путем химических реакций получают из циклогексана DL-α-амино-ε-капролактam, который на стадии ферментативного гидролиза превращается в L-лизин. При этом происходит разделение оптических изомеров (наиболее сложный и дорогостоящий этап синтеза всех L-аминокислот). Этот процесс предполагает участие двух ферментативных реакций, а именно рацемизацию DL-α-амино-ε-капролактама и гидролиз L-аминолактама:



Продуцентами гидролазы α-амино-ε-капролактама служат некоторые штаммы дрожжей, относящиеся к родам *Cryptococcus*, *Candida*, *Trichosporon*. Культивирование их ведется в азробных условиях при 20—40 °С и рН 6—10 на среде, содержащей глюкозу и соль аммония. В среде непременно должен также присутствовать DL-α-амино-ε-капролактam (или его L-изомер).

Источником фермента для осуществления технологического процесса гидролиза могут служить: биомасса, собранная сразу после культивирования, клетки, обработанные ацетоном, клетки после сублимационной сушки, клеточный экстракт и очищенный фермент L-α-амино-ε-капролактam гидролаза. Реакция проходит в щелочной среде при 40—50 °С, при более высокой температуре

активность падает. Активаторами фермента являются ионы  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ . По окончании процесса полученный L-лизин извлекают из реакционной смеси каким-либо известным способом. Оставшийся D- $\alpha$ -амин- $\epsilon$ -капролактam подвергается рацемизации.

Источником рацемаз могут быть бактерии, относящиеся к родам *Achromobacter*, *Flavobacterium* и некоторым другим. Непременным компонентом среды для их выращивания, как и в предыдущем случае, служит DL- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактam или его хлоргидрат. Принцип действия фермента, по-видимому, идентичен действию рацемаз аминокислот, требующих в качестве кофактора пиридоксаль-5'-фосфат.

При получении L-лизина целесообразно совместное действие на субстрат двух ферментов. Для этого в водный раствор DL- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактама вводят необходимое количество дрожжевых и бактериальных клеток, проявляющих гидролазную и рацемазную активности. Для совместного действия двух ферментов наиболее благоприятны рН среды 8,0—8,5, температура 30—50 °С. В результате реакции DL- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактam количественно переходит в L-лизин. Рассмотренный способ синтеза L-лизина интересен тем, что указанные ферменты можно получить в иммобилизованной форме.

Помимо чистого лизина или его хлористоводородной соли, промышленность выпускает так называемый кормовой лизин. Последний представляет собой порошок, полученный путем высушивания на распылительной сушилке культуральной жидкости продуцента лизина. В порошке содержится лизин, другие продукты метаболизма продуцента и его клетки. Для повышения кормовой ценности препарата в ферментер, где происходит биосинтез лизина, предложено добавлять культуру кормовых дрожжей. Они ассимилируют компоненты среды, не используемые продуцентом лизина, быстро размножаются и тем самым вносят в препарат некоторое дополнительное количество белка, а также аминокислот.

### 16.3. РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА АМИНОКИСЛОТ

При микробиологическом синтезе аминокислот широкое распространение в качестве компонентов сред для культивирования продуцентов имеют поверхностно-активные вещества, биотин и некоторые антибиотики. Биотин содержат многие растительные продукты, часто входящие в состав ферментационных сред. Наиболее богата биотином меласса, являющаяся во многих случаях одним из основных ингредиентов производственных сред, но избыток биотина отрицательно сказывается на накоплении глутаминовой кислоты. Количество биотина в среде должно быть минимально. Например, для *C. glutamicum* при 10 %-ной концентрации глюкозы оптимальное содержание биотина на литр среды не должно превышать 2—4 мкг. Оптимум концентрации биотина

в известных пределах находится в зависимости от содержания глюкозы. Количество биотина, необходимого для максимального накопления глутаминовой кислоты *C. glutamicum*, должно быть меньше концентрации, необходимой для максимального роста бактерии. При получении лизина и  $\alpha$ -аланина оптимальные концентрации биотина в среде обычно в 5—10 раз выше, чем при получении глутаминовой кислоты. Биотин в ряде случаев оказывается фактором, регулирующим процесс биосинтеза: один и тот же микроорганизм при низких концентрациях биотина может накапливать глутаминовую кислоту, а при высоких—лизин. Функция биотина в этом процессе получила объяснение при изучении метаболизма продуцентов. Аминокислоты первоначально накапливаются в клетке, составляя пул, или фонд. Отмечено, что аминокислотный фонд клеток *Brevibacterium flavum*, выросших на бедной биотином среде, ниже, чем при росте на среде, где его много. Этот факт связывают с повышенной проницаемостью бактерий, выросших на среде, бедной биотином. Показано, что клеточная мембрана бактерий, бедных по биотину и способных накапливать глутаминовую кислоту, содержит больше насыщенных жирных кислот, чем ненасыщенных, в противоположность «богатым» по биотину клеткам, ее не накапливающих. Кроме того, в мембране клеток, «бедных» биотином, меньше фосфолипидов, чем у «богатых» биотином. Таким образом, одна из функций биотина сводится к синтезу ненасыщенных жирных кислот, снижающих проницаемость клеточной мембраны для глутаминовой кислоты. Избыток биотина в среде может также привести к повышению активности 2-кетоглутаратдегидрогеназы, т. е. направить течение реакции в сторону синтеза сукцинил-КоА. В этом случае выход глутаминовой кислоты понижается. Исследования были проведены с *Brevibacterium* sp., не имеющим блока по 2-кетоглутаратдегидрогеназе. Механизм действия биотина в данном случае не ясен, так как он не принимает участия в каталитическом процессе, осуществляемом 2-кетоглутаратдегидрогеназной системой.

С целью повышения проницаемости микроорганизмов рекомендуется вводить в среды некоторые антибиотики, в частности калиевую соль бензилпенициллина. Увеличение проницаемости происходит, по-видимому, за счет нарушения структуры пептидогликанового слоя клеточной стенки. Известно, что пенициллин нарушает образование «мостиков» пептидной части структуры.

Повышение степени проницаемости клеточной стенки также возможно при введении в среды поверхностно-активных веществ. Некоторые из детергентов, будучи добавленными к бактериальным суспензиям, вызывали интенсивную утечку из клеток аминокислот, нуклеотидов и других низкомолекулярных метаболитов. Изучение механизма взаимодействия ионных детергентов с клеточными структурами показало, что поверхностно-активные вещества анионного типа взаимодействуют, по-видимому, с кетонидными группами мембранных белков и иминогруппами амино-

полисахаридов. Вещества катионного типа — с карбоксильными группами белка. Из наиболее известных агентов, влияющих на проницаемость клеток и выход глутаминовой кислоты, следует назвать твин-40 (полиоксиэтилен-сорбитан-монопальмитат), твин-60 (полиоксиэтилен-сорбитан-стеарат), полиэтиленгликоль моностеарат, N-миристоил-глицин. Рекомендуется совместное применение пенициллина с поверхностно-активными веществами.

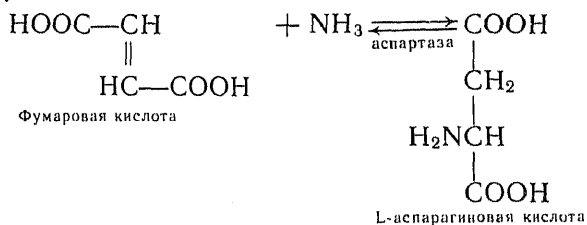
#### 16.4. ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК И ФЕРМЕНТОВ

В последние годы внимание исследователей привлекают методы получения аминокислот с использованием иммобилизованных ферментов. Способ имеет ряд преимуществ, в частности, конечный продукт отличается высокой концентрацией и чистотой, нет опасности заражения в ходе реакции посторонними микроорганизмами, в результате синтеза образуются только природные изомеры, имеется возможность осуществления непрерывных технологических процессов.

Микроорганизмы являются основными источниками ферментов, переводимых в иммобилизованную форму. Имея в виду преимущества иммобилизованных ферментов, необходимо учитывать, что они всегда будут дороже растворимых, но их внедрение экономически оправдано при удовлетворении даже одного из приводимых ниже условий: повышение стабильности фермента, обеспечивающее его многократное применение и тем самым сокращение расходов на препарат; улучшение качества продукта благодаря отсутствию в нем следов фермента и предотвращению нежелательных побочных реакций.

Из уже перечисленных способов получения аминокислот можно обратиться к превращению DL- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактама в лизин. Ферменты, участвующие в реакциях гидролиза и рацемизации, могут быть иммобилизованы на ионообменных полисахаридах путем ковалентного связывания. Одно из серьезных технологических затруднений при осуществлении ферментативных реакций на носителях — возможность регенерации кофакторов (если реакция идет при их участии).

Наиболее широкое распространение имеет ферментативный метод получения аспарагиновой кислоты из fumarовой и аммония благодаря активности аспартазы, катализирующей эту реакцию:

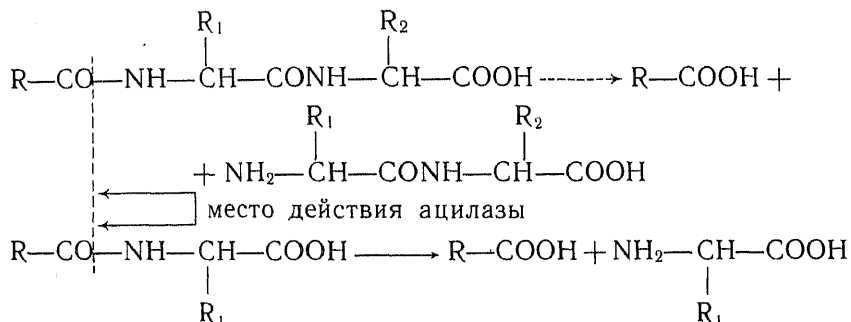


Поскольку аспартаза, заключенная в полиакриламидный гель, относительно быстро теряет исходную активность, иммобилизации подвергают микробные клетки, обладающие аспартазной активностью. Хорошим продуцентом аспартазы признаны некоторые штаммы *Escherichia coli*, клетки которой фиксируются в полиакриламидном геле. При оптимальных режимах выход аспарагиновой кислоты при таком способе достигает 12 000—16 000 мкМ/ч·г сухих клеток. Отмечено существенное повышение активности аспартазы клеток *E. coli* после их иммобилизации.

Ферментативные методы используются также при синтезе L-аланина декарбоксилированием L-аспарагиновой кислоты с помощью *Pseudomonas dactinifera*.

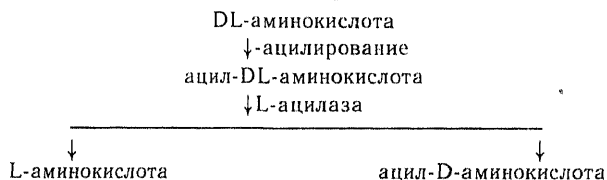
### 16.5. ПОЛУЧЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ ИЗОМЕРОВ АМИНОКИСЛОТ ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ АЦИЛАЗ МИКРООРГАНИЗМОВ

Одним из способов разделения рецематов аминокислот на L- и D-изомеры является ферментативный путь с использованием микроорганизмов, обладающих специфической L-ацилазной активностью. Ацилазы разрывают пептидную связь у ацилпроизводных аминокислот или пептидов, в результате чего образуются соответствующие свободные аминокислоты и пептиды, а также органическая кислота:



При культивировании микроорганизмов, содержащих ацилазы, необходимо соблюдать ряд условий. В частности, вводить в среды вещества, близкие по природе к субстрату действия ацилазы, например в случае превращения DL-лизина — ε-ацетил-L-лизин. Ацилазы грибов находятся внутри клеток. Поэтому их клетки необходимо предварительно подвергать дезинтеграции, например применяя ультразвук. Основой использования микробных ацилаз для гидролиза ацилпроизводных аминокислот является специфичность их действия относительно оптической конфигурации и структуры субстрата. Соответственно характеру асимметрического деацетилирования субстрата различают L- и D-ацилазы, причем у микроорганизмов наиболее часто обнаруживаются L-ацилазы. В зависимости от характера отщепляемого ацильного радикала различают ацетил-, бензоил-, хлорацетил-,

сукцинил- и другие производные аминокислот. Поскольку наиболее распространенными являются ацетил- и бензоилацилазы, именно эти производные аминокислот предпочтительно использовать в реакциях. Необходимо иметь в виду специфичность ацилазы к аминокислотному остатку. Указанные особенности ацилаз позволяют использовать их для выделения нужной аминокислоты из смеси многих ацилпроизводных:



Остающиеся ацил-рацемат и ацил-D-аминокислота легко отделяются от оптически активной аминокислоты вследствие различий в физико-химических свойствах, например растворимости в органических растворителях и воде, способности сорбироваться на ионитах. Использование D-изомеров теоретически возможно, если иметь в виду дальнейшее применение рацемаз или химических способов. Например, некоторые N-ацетил-D-аминокислоты могут легко превращаться в N-ацетил-DL-аминокислоты путем нагревания в присутствии уксусного ангидрида. Процесс рацемизации может быть реализован также путем применения иммобилизованных ферментов.

## Глава 17 НУКЛЕОТИДЫ

Микробиологический синтез нуклеотидов и их производных имеет пока довольно ограниченные масштабы. Сферы применения этих соединений также пока невелики, за исключением нуклеотидов, используемых как вкусовые пищевые добавки, в особенности при производстве искусственной пищи. Нуклеотиды и их производные могут иметь применение и как лечебные препараты. Широко используются они в лабораторной биохимической практике. Характерная особенность большинства способов получения нуклеотидов — необходимость внесения метаболического предшественника в среду для культивирования микроорганизмов или в реакционную смесь.

### 17.1. СИНТЕЗ АТФ

Получение аденозинтрифосфата (АДФ) и аденозинтрифосфата (АТФ) основано на осуществлении культурой микроорганизма реакции фосфорилирования аденина или адениловой кислоты (5'-АМФ).

В случае использования *Brevibacterium ammoniagenes* АТСС 6872 эту бактерию выращивают на среде, содержащей

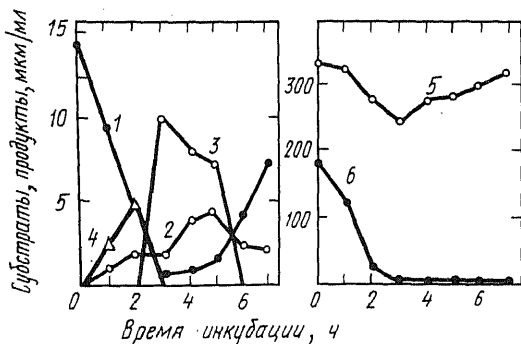


Рис. 17.1. Фосфорилирование 5'-АМФ разрушенными клетками пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) в фосфатном буфере: 1 — АМФ, 2 — АДФ, 3 — АТФ, 4 — аденозин, 5 — неорганический фосфат, 6 — глюкоза

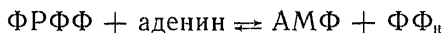
высокую концентрацию глюкозы, мочевины, дрожжевой экстракт, соли фосфора, магния, кальция и биотин. По ходу культивирования в среду вносят аденозин, который подвергается ферментативному фосфорилированию с образованием адениловой кислоты, АДФ и АТФ. При аналогичных условиях культивирования, но при внесении гуанозина, можно получить гуаниловую кислоту, ГДФ и ГТФ. Фосфорилирующим агентом, по-видимому, выступает АТФ. Накопить АТФ в сфере реакции без передачи на акцепторную молекулу внесенного из вне аденозина не удастся.

Другим источником ферментных систем, осуществляющих фосфорилирование 5'-АМФ, могут служить пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), взятые в виде гомогената или ацетонового порошка. Реакционная смесь содержит 5'-АМФ, глюкозу, фосфатный буфер (рН 7,0) и дрожжи, подготовленные, как сказано выше (рис. 17.1). Вслед за истощением глюкозы при минимальном количестве неорганического фосфата отмечается максимум накопления АТФ. После достижения максимума АТФ наблюдается его распад до АДФ и АМФ при одновременном повышении уровня неорганического фосфата. На выход продукта существенное влияние оказывает концентрация фосфата, присутствующего в виде фосфатного буфера. Отклонение от оптимальной величины может привести к ряду нежелательных реакций: вызвать образование инозиновой кислоты, инозина и гипоксантина. Вероятно, вносимый извне аденозин необходим для осуществления «затравочной» реакции. В равной мере это относится и к 5'-АМФ. Отсюда очевидна необходимость иметь в сфере реакции высокую концентрацию глюкозы и сбалансированное количество фосфата.

По несколько иному пути происходит синтез АТФ при введении в среду аденина (вместо аденозина). В этом случае ключевой реакцией является N-рибозидация аденина. Процесс обычно проводят как типичную аэробную ферментацию с добавлением предшественника. Продукентами служат *Brevibacterium ammoniagenes* или *Corynebacterium* sp. В этих случаях также необходима среда с высокой концентрацией глюкозы. На первом этапе синтеза происходит образование АМФ из внесенного в конце экспоненциальной фазы роста культуры аденина и синте-



зированной клеткой фосфорибозилпирофосфата (ФРФФ). Реакцию осуществляет аденинфосфорибозилтрансфераза:



Дальнейший процесс происходит так же, как при наличии АМФ. ФРФФ в клетках образуется в результате реакции, происходящей между рибозо-5-фосфатом (Р-5-Ф) и АТФ при посредстве АТФ: D-рибоза-5-фосфат пирофосфаттрансферазы. АТФ и Р-5-Ф образуются в результате катаболизма глюкозы. Р-5-Ф в ходе функционирования ГМФ-пути, а АТФ — как продукт гликолиза.

## 17.2. СИНТЕЗ НИКОТИНАМИДДИНУКЛЕОТИДА

Микробиологический синтез никотинамиддинуклеотида (НАД) происходит путем культивирования *Brevibacterium ammoniagenes* АТСС 6872 с предшественником. Выращивание продуцента рекомендуется проводить на средах, содержащих глюкозу, мочевины, дрожжевой экстракт, фосфаты, соли магния, кальция и биотин. Предшественниками НАД в среде могут быть никотиновая кислота и никотинамид. В условиях опыта предшественники обычно вводят на вторые сутки роста культуры (рис. 17.2). К пятым суткам в среде накапливается НАД, и культура вступает в фазу стационарного роста. Помимо НАД, в среде содержится промежуточный продукт его синтеза — мононуклеотид никотиновой кислоты. Никотиновая кислота включается непосредственно в синтез, и если в среду вводят ее амид, происходит ферментативное дезаминирование с образованием кислоты. Ниже дана схема синтеза НАД, где фосфорибозилпирофосфат обозначен буквами ФРФФ, а остатки фосфорной кислоты в нуклеотидах — Ф (рис. 17.3). На этой же схеме показана также реакция, в результате которой образуется никотинамиддинуклеотидфосфат (НАДФ). Реакцию осуществляет НАД-киназа, передающая фосфорный остаток от АТФ на НАД. Для получения НАДФ предложена также система, использующая в качестве ферментного препарата экстракт из клеток *Proteus mirabilis* IFO 3849, а компонентами служат НАД, п-нитрофенилфосфат, никотинамид, сульфат цинка, аце-

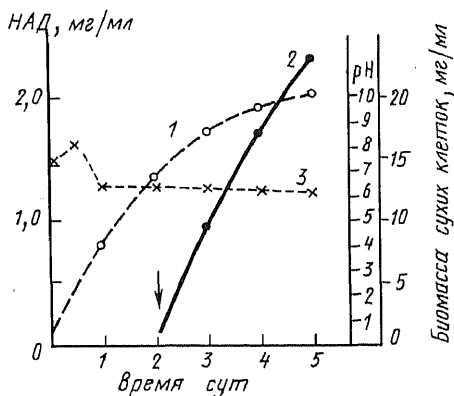


Рис. 17.2. Накопление НАД при культивировании *Brevibacterium ammoniagenes*: 1 — биомасса, сухие клетки (мг/мл), 2 — НАД (мг/мл), 3 — рН среды. Стрелкой показано время внесения предшественника

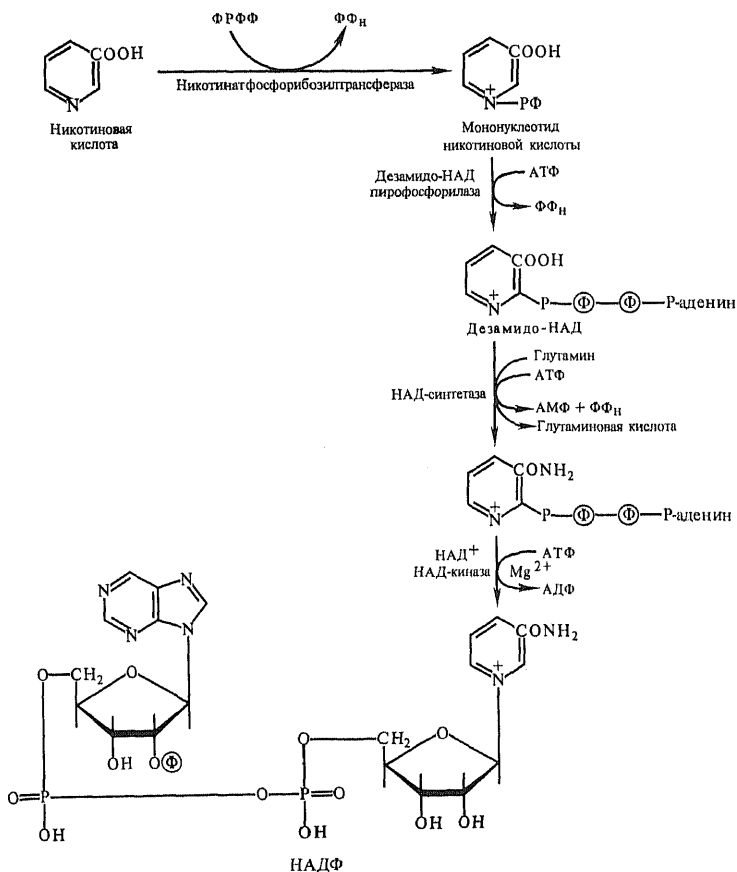


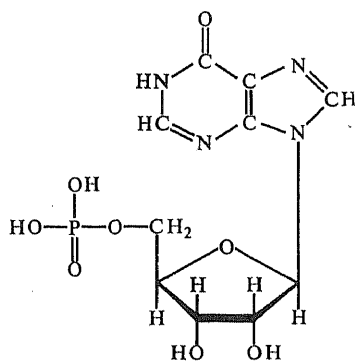
Рис. 17.3. Схема биосинтеза НАД и НАДФ при использовании никотиновой кислоты в качестве предшественника:

фрфф — фосфорибозинпирофосфат, ффн — пирофосфат (неорганический)

татный буфер (рН 4,0). Однако в данном случае, помимо НАДФ, происходит синтез НАД-дифосфата и некоторых НАД-аналогов.

### 17.3. СИНТЕЗ ИНОЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Инозиновая кислота — метаболический предшественник важнейших пуриновых нуклеотидов — адениловой и гуаниловой кислот. Поэтому накопление инозиновой кислоты может происходить, если продуцент имеет блок в ферментных системах, осуществляющих дальнейшие ее превращения.



Инозиновая кислота

Очевидно, что не следует лишать структуру столь необходимых и важных метаболитов (адениловой и гуаниловой кислот). Введение их в среду для восполнения дефицита возможно, но довольно дорого. Поэтому предпочитают вводить в сферу реакции нуклеозид — инозин. Для получения 5'-инозиновой кислоты (5'-ИМФ) необходимо иметь источник фермента, фосфорилирующего инозин в 5'-положении рибозного остатка. Источниками фосфорилирующего фермента — нуклеозиддифосфаттрансферазы — могут служить многие микроорганизмы, относящиеся к родам *Flavobacterium*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*. Донорами фосфора в этой реакции могут быть нуклеотиды, а также неприродные соединения — п-нитрофенилфосфат (п-НФФ), бензилфосфат, фенилфосфат.

В СССР в качестве источника фосфорилирующего фермента предложен штамм *Pseudomonas*. Культуру предварительно выращивают на среде, содержащей глюкозу, пептон, дрожжевой экстракт. В качестве ферментного препарата, осуществляющего реакцию, используют живые клетки, высушенные под вакуумом или ацетоном, а также замороженные клетки, поскольку локализация фермента внутриклеточная. Из названных выше доноров фосфата лучшим считается п-нитрофенилфосфат. Реакция происходит в ацетатном буфере, при pH 4,0, в присутствии ионов меди и цинка, заметно усиливающих выход продукта.

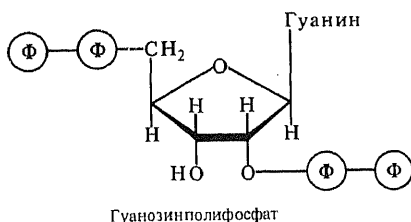
Наиболее важными факторами, определяющими активность реакции фосфорилирования инозина, являются концентрации донора (фосфора), акцептора (инозина) и количества клеток. При оптимальных соотношениях п-НФФ и инозина клетки *Ps. trifolii* могут фосфорилировать до 90% инозина в реакционной смеси. Выход инозиновой кислоты можно увеличить, если к реакционной смеси добавить поверхностно-активные вещества, в частности различные твинны. Концентрации добавок подбирают опытным путем.

Как и во всех других случаях использования в качестве ферментных препаратов клеток микроорганизмов, возникает необходимость оценить активность и условия ее проявления у фермен-

тов, разрушающих целевой продукт синтеза. Наиболее нежелательно для синтеза инозиновой кислоты наличие активных фосфоэстеразы и 5'-нуклеотидазы. Если невозможно подавить их активность ингибиторами, то следует выбрать условия, при которых она будет минимальной. В первую очередь к условиям, наиболее легко регулируемым, относятся температура и рН среды. Инозиновую кислоту выделяют в виде бариевой соли и путем ионообменной хроматографии.

#### 17.4. СИНТЕЗ ГУАНОЗИНПОЛИФОСФАТОВ

Среди продуктов обмена веществ нуклеотидной природы у микроорганизмов обнаружены гуанозинполифосфаты. Преимущественно это тетра- или пентафосфаты. Они выполняют функции



регуляторов в многочисленных биохимических реакциях, поэтому на их получение обращено внимание многих специалистов.

Накопление гуанозинполифосфатов обнаружено в культуре *Brevibacterium ammoniagenes* KV 13510 в присутствии в реакционной смеси гуанозин-5'-монофосфата (Г-5'-Ф) или ксантозин-5'-монофосфата (Кс-5'-Ф). Штамм представляет собой мутант, требующий для выращивания присутствия в среде дорогостоящих для промышленного производства компонентов: дрожжевой экстракт, биотин, тиамин, пантотеновую кислоту и др.

Ксантозин-5'-монофосфат — метаболический предшественник гуаниловой кислоты, образующейся после амидирования пуринового основания глутаминов в присутствии АТФ.

Собственно процесс ферментативного превращения метаболических предшественников (Г-5'-Ф или Кс-5'-Ф) в нуклеозидполифосфат происходит в среде, содержащей глюкозу, а также высокий уровень фосфатов и магния. Помимо полифосфатов в среде накапливается 5'-ГМФ, 5'-ГДФ, 5'-ГТФ, однако гуанозинполифосфаты образуются в более узком интервале рН и при ином температурном оптимуме.

Фермент АТФ нуклеотид пирофосфаттрансфераза, осуществляющий перенос пирофосфатных остатков из АТФ на акцепторные молекулы, выделен из *Streptomyces adenosipholyticus* A-4668. Продуктами реакции могут быть нуклеозид-3'-дифосфат-5'-моно(ди- и три-) фосфаты, такие, как rppGpp, ppGpp, pGpp, а также производные аденина и инозина — rppApp, ppApp, rppIpp.

## Глава 18 ФЕРМЕНТЫ

### 18.1. ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ферменты широко используются в различных областях практической деятельности человека как биологические катализаторы. Источниками ферментов могут быть животные, растения и микроорганизмы. К настоящему времени установлено наличие более двух тысяч ферментов, а несколько сотен из них получены как индивидуальные вещества.

Микроорганизмы в качестве продуцентов ферментов представляют особый интерес, поскольку их метаболизм, а следовательно, и работа ферментных систем осуществляются с очень большой интенсивностью.

Если характеризовать суммарную интенсивность ферментных реакций по поглощению молекулярного кислорода в виде коэффициента  $Q_{O_2}$  ( $\text{см}^3 \text{O}_2$ , потребленное одним мг сухой биомассы за один час), то для клеток печени он равен 2—5; почки — 10—20, дрожжевой клетки — 50—110; у бактерий рода *Acetobacter* — 1800, а у *Azotobacter* — 2000.

Помимо высокой интенсивности метаболизма, следует помнить об очень большой скорости прироста биомассы микроорганизмов. Это позволяет в течение коротких промежутков времени (иногда за 24—72 ч) получать такие количества сырья для выделения ферментов, которые не могут сравниться с тем, что дают растения и животные.

Важное свойство многих микроорганизмов — способность расти, используя различные дешевые субстраты, в том числе не имеющие пищевого значения (целлюлоза, углеводороды нефти, метан, метанол и др.). Некоторые субстраты, используемые микроорганизмами, токсичны для человека и животных.

Содержание отдельных ферментов в клетках микроорганизмов может быть весьма высоким. Так, количество рибулезобисфосфаткарбоксилазы у фототрофных бактерий иногда достигает 40—60% от всех растворимых белков.

Многие микроорганизмы образуют ферменты, которые в большом количестве выделяются в культуральную среду. Эти ферменты в основном принадлежат к гидролазам, расщепляющим белки, крахмал, целлюлозу, жиры и другие нерастворимые в воде вещества.

Выделение ферментных препаратов из клеток микроорганизмов и особенно из культуральной среды после их выращивания проще и экономичнее, чем из растительных и животных тканей.

Ряд ферментов обнаружены только у микроорганизмов. К таким ферментам относятся: танназа, расщепляющая дигаллат до галловой кислоты, рацемазы многих аминокислот, кератины, гидролизующие серусодержащие белки — кератины, входящие в состав волоса, перьев, рогов и копыт. Некоторые микроорганизмы обладают специфическими декарбоксилазами amino-

кислот, образуют пенициллиназу, расщепляющую пенициллин до пенициллиновой кислоты и воды.

Такой фермент, как нитрогеназа, участвующая в образовании аммиака из молекулярного азота, обнаружена лишь у бактерий, способных к фиксации  $N_2$ .

Характерной особенностью некоторых бактерий является их способность окислять неорганические субстраты: аммиак, нитриты, сульфид и другие соединения серы, а также двухвалентное железо, что связано с наличием у них особых ферментов. Ряд бактерий и водорослей синтезируют гидрогеназы, катализирующие окисление и образование молекулярного водорода.

Значительное число бактерий способны синтезировать ферменты, позволяющие им использовать метан, метанол, метилированные амины, окись углерода и другие одноуглеродные соединения в качестве субстратов для роста.

Очистка окружающей среды от ряда загрязняющих ее веществ возможна благодаря способности ферментов, образуемых микроорганизмами, разрушать компоненты пластмасс, пестициды и другие ядовитые соединения.

Способность микроорганизмов развиваться в экстремальных условиях, т. е. при низких и высоких температурах, в отсутствие молекулярного кислорода, в кислых или щелочных средах, при высоких концентрациях солей, определяется часто характером их ферментов.

Психрофильные дрожжи *Candida gelida* имеют оптимум роста  $15^{\circ}C$ , при нагревании до  $35^{\circ}C$  они погибают: у них необратимо инактивируется только пируваткарбоксилаза. У облигатно психрофильного штамма *Micrococcus cryophilus* кратковременное нагревание до  $25^{\circ}C$  изменяет вторичную и третичную структуру глутамин- и пролин-тРНК-синтетаз. В результате клетки теряют способность соединять т-РНК с соответствующей аминокислотой. Некоторые псевдомонады обнаруживают активный рост при  $+3$ ,  $+4^{\circ}C$ , а их ферменты активны при  $-5$ ,  $-10^{\circ}C$ .

Исключительное положение среди живых существ занимают термофильные бактерии, имеющие оптимум роста при  $60-80^{\circ}C$  и выше. Возможность развития этих бактерий при высоких температурах обуславливается термостабильностью белков. Например, экстремальный термофил *Thermus aquaticus* обладает энлазой с оптимумом действия при  $90^{\circ}C$ .

Гриб *Malbranchea pulchella* var. *sulfurica*, способный расти при  $45^{\circ}C$ , выделяет в среду термостабильную протеиназу, сохраняющую активность при  $73^{\circ}C$ .

Некоторые мезофильные микроорганизмы также образуют ферменты с высокой термостабильностью, проявляющие максимальную активность при более высокой температуре, чем нужна для роста продуцента.

Необычна форма жизни галофильных микроорганизмов, рост их наблюдается даже в насыщенном растворе NaCl. Ферменты

таких микроорганизмов требуют для проявления максимальной активности высоких концентраций солей. Отношения микробных ферментов к кислотности и щелочности среды во многих случаях также уникальны.

Амилолитическая активность *Aspergillus niger* обеспечивается двумя амилазами, из которых одна стабильна при очень низких значениях рН.

Некоторые амилазы, напротив, требуют для проявления активности резко щелочных условий. Например, амилаза *Bacillus* sp. проявляла максимум активности при рН 10,5. Известны бактерии, развивающиеся в щелочной среде (рН 9,0 и выше) и образующие ферменты с высоким оптимумом рН.

Большой интерес как продуценты ферментов представляют анаэробные микроорганизмы. Многие анаэробные бактерии превращают аминокислоты, пурины, пиримидины и другие субстраты путями, отличными от тех, которые известны для аэробных микроорганизмов, животных и растений.

В последние годы установлено, что среди строгих анаэробов имеются бактерии, способные расти в хемолитоавтотрофных условиях. При этом у них действуют системы ассимиляции углекислоты, не свойственные другим организмам, что обусловлено наличием особых ферментов. К числу таких автотрофов принадлежат некоторые метанобразующие, ацетатобразующие и сульфатредуцирующие бактерии.

Внимание, проявляемое к анаэробам, объясняется возможностью получения в результате их деятельности этанола, бутанола, метана, ацетата и других полезных продуктов при переработке растительных остатков и другого дешевого сырья. Культивирование анаэробов исключает необходимость аэрирования и перемешивания питательной среды; снижается возможность инфицирования, вызываемого недостаточной стерильностью воздуха. Кроме того, использование анаэробных микроорганизмов позволяет проводить процесс в больших емкостях с высоким слоем среды.

Свойством многих ферментов микробного происхождения является их индуцибельность. Так, синтез  $\beta$ -галактозидазы у *Escherichia coli* индуцируется лактозой и начинается менее чем через три минуты после ее внесения, а при удалении индуктора синтез так же быстро прекращается. Поэтому путем изменения условий культивирования можно добиться образования микроорганизмами больших количеств многих практически важных ферментов.

Известно, что ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но полученные из разных организмов, могут существенно различаться по свойствам. Примером этого может служить глутаминаза, осуществляющая дезамидирование глутамина с образованием глутаминовой кислоты. У глутаминаз, полученных из клеток *Azotobacter agilis*, оптимум рН = 6,0 — 7,0; из *Clostridium welchii* — 5,0; из *Mycobacterium tuberculosis* — 8,3. Хлори-

ды ингибируют глутаминазу *Pseudomonas* sp., но не влияют на ее активность у *E. coli* и активируют глутаминазу *Cl. welchii*. Аспарагиназы *E. coli* и *Alcaligenes eutrophus* различны по субстратной специфичности.

Резюмируя сказанное, следует подчеркнуть, что микроорганизмы обладают очень высокой активностью ферментативных реакций и способны осуществлять многие процессы, отсутствующие у макроорганизмов, благодаря наличию специфических ферментов.

Ферменты сходной функции у микро- и макроорганизмов могут быть различны по свойствам и у микроорганизмов иногда для проявления своей активности нуждаются в особых условиях. Поэтому изучение ферментов разных микроорганизмов — задача весьма важная.

## 18.2. ФЕРМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ПРОИЗВОДСТВЕ

В своей практической деятельности человек использует ферментативную активность микроорганизмов очень давно. Культуры грибов уже несколько тысяч лет назад в Китае, Корее, Японии и некоторых других странах применяли для осахаривания крахмалистых продуктов и для получения спирта.

Винокурение, хлебопечение, обработка волокнистых растений, получение кисломолочных продуктов известны человечеству с давних времен. Однако использование не ферментной активности микроорганизмов, а собственно ферментов как индивидуальных химических соединений специфического и сложного строения началось сравнительно недавно. Ферменты в промышленных масштабах производятся в СССР, Японии, США, Англии, Франции, Голландии, Дании, Швейцарии, Чехословакии, Венгрии, Польше и ряде других стран.

Основными поставщиками ферментов из микроорганизмов до последнего времени были грибы. Однако сейчас все более широкое применение находят ферменты и некоторых бактерий (табл. 18.1).

Согласно принятой системе классификации все ферменты подразделяют на шесть классов. 1. Оксидоредуктазы. 2. Трансферазы. 3. Гидролазы. 4. Лиазы. 5. Изомеразы. 6. Лигазы (синтазы).

Наиболее широкое применение получили ферменты микроорганизмов, относящиеся к гидролазам (гликозидазы, пептидазы и др.). Они воздействуют на глюкозидные, пептидные, эфирные и некоторые другие связи с участием воды:



Среди гидролаз много внеклеточных ферментов. Выделяясь из клеток, они накапливаются в культуральной среде. Получе-



Т а б л и ц а 18.1. Микроорганизмы, наиболее часто используемые для получения некоторых ферментов, выпускаемых промышленностью

Фермент	Грибы	Бактерии
α-Амилаза	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Asp. niger</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bac. licheniformis</i>
Глюкоамилаза	<i>Asp. niger</i> <i>Rhizopus niveus</i> <i>Endomycopsis</i> sp.	
Пулланаза		<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Декстраназа	<i>Penicillium</i> sp. <i>Asp. niger</i>	<i>Bac. amyloliquefaciens</i> <i>Actinoplanes missouriensis</i>
β-Глюконаза		
Глюкозоизомераза		
Инвертаза	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Sacch. cerevisiae</i>	
Целлюлазы	<i>Asp. niger</i> <i>Trichoderma roseum</i> <i>T. viride</i>	
Пектиназы	<i>Asp. niger</i> <i>Asp. awamori</i>	
Протеиназы	<i>Asp. niger</i> <i>Asp. oryzae</i> <i>Mucor mihei</i> <i>M. rouxii</i> <i>M. pusillus</i> , <i>Endothia parasitica</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bac. amyloliquefaciens</i> <i>Bac. licheniformis</i> <i>Bac. stearothermophilus</i>
Липазы	<i>Asp. oryzae</i> <i>Asp. awamori</i> <i>Candida cylindrica</i> <i>Mucor michei</i> <i>Rhizopus</i> sp.	
Глюкозооксидаза	<i>Asp. niger</i> <i>Penicillium amagaskiense</i> <i>P. vitale</i> <i>P. notatum</i>	
Каталаза	<i>Aspergillus</i> sp.	
Деацетилаза	<i>Aspergillus</i> sp.	
Аспартаза		<i>Escherichia coli</i>
Фумараза		<i>E. coli</i>
Пенициллинамидаза		<i>E. coli</i>

ние таких ферментов, как уже отмечалось, проще и дешевле, чем выделение из клеток. Поэтому гидролазы представляют особый интерес и наиболее часто используются.

### 18.2.1. Гликозидазы

К гликозидазам относится большое число микробных ферментов, катализирующих гидролиз гликозидных соединений. Изучаются и применяются они давно. В эту группу входят амилолитические ферменты, гидролизующие крахмал: α- и β-амилазы и глюкоамилаза. Эти гидролазы в зависимости от происхождения (животные, растения, грибы, бактерии) различаются по строе-

нию, молекулярным массам, термостабильности, оптимуму pH и другим свойствам. Многие микроорганизмы образуют  $\alpha$ -амилазу (1,4- $\alpha$ -D-глюканглюканогидролазу), гидролизующую внутренние  $\alpha$ -1,4-глюкозидные связи в амилазе и амилопектине с образованием мальтозы, декстранов и небольшого количества глюкозы. Синтез  $\beta$ -амилазы у микроорганизмов наблюдается реже.

Продуцентами  $\alpha$ -амилазы, применяемыми в практических целях, являются *Bacillus licheniformis*, *Bac. amyloliquefaciens*, *Aspergillus oryzae* и некоторые другие микроорганизмы. Интересен тот факт, что  $\alpha$ -амилаза *Bac. licheniformis* обладает очень высокой термоустойчивостью и способна гидролизовать крахмал при температуре около 100°C.

Широко представлена, в основном у грибов, глюкоамилаза (1,4- $\alpha$ -D-глюкан—глюканогидролаза). У *Asp. niger* она состоит из двух глюкопротеинов с молекулярной массой около 100 000 дальтон.

Декстраназа (1,6- $\alpha$ -D-глюкан—глюканогидролаза) воздействует на 1,6-глюкозидные связи в декстрани. В большом количестве ее образуют *Penicillium purpurogenium* и некоторые другие грибы этого рода.

Фермент пуллуланаза (пуллулан-6-глюканогидролаза) гидролизует грибной полисахарид пуллулан, а также гликоген, амилопектин и декстрины, последние образуются из амилопектина и гликогена. Интересно, что фермент пуллуланаза получают из грамотрицательной бактерии *Klebsiella pneumoniae*, редко используемой в качестве продуцента ферментов.

Лактаза или  $\beta$ -галактозидаза ( $\beta$ -D-галактозид—галактогидролаза) превращает лактазу в глюкозу и галактозу. Производят фермент *E. coli*, *Asp. niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Curvularia inaequalis*, *Alternaria tenuis* и некоторые другие микроорганизмы.

Инвертаза ( $\beta$ -D-фруктофуранозид—фруктогидролаза) расщепляет сахарозу на глюкозу и фруктозу. Образуют ее многие представители рода *Aspergillus* (*Asp. awamori*, *Asp. batatae*, *Asp. niger*), дрожжи, а также отдельные штаммы *Bacillus subtilis* и *Bac. diastaticus*.

Целлюлолитические ферменты (целлюлазы) — сложный комплекс активных белков, действующих на различные участки молекул целлюлозы.  $C_1$ -компонент (экзонуклеаза) действует на нативную целлюлозу (хлопок, фильтровальная бумага);  $C_x$ -компонент (эндонуклеаза) гидролизует клетчатку, переведенную в растворимую форму (карбоксиметилцеллюлозу). Вместе с целлюлазами микроорганизмы продуцируют целлобиазу ( $\beta$ -глюкозидаза), гидролизующую целлобиозу, и гемицеллюлазу, действующую на гемицеллюлозу. В конечном счете гидролиз целлюлозы приводит к образованию глюкозы.

Выпускаемые промышленностью препараты целлюлолитических ферментов обычно обладают активностью  $C_1$  и  $C_x$ , а также цел-

лобиазной и гемицеллюлазной активностями; эти препараты стабильны в широком диапазоне рН (от 3,0 до 8,0). Продуцентами целлюлаз являются многие мицелиальные грибы, в том числе *Penicillium notatum*, *P. variable*, *P. iiriense*, *Trichoderma roseum*, *Vorticellium alboatrum* и др. Продуцируют целлюлазы и некоторые бактерии, но их свойства изучены мало.

Значительное число микроорганизмов образуют ферменты, разлагающие пектины. Пектины (полигалактурониды) состоят из остатков D-галактуроновых кислот, соединенных  $\alpha$ -1,4-глюкозидными связями. Карбоксильные группы галактуроновой кислоты могут быть полностью или частично этерифицированы метанолом.

Пектолитические ферменты образуют комплексы, отдельные компоненты которых расщепляют молекулу пектина в различных местах. Пектиназы (полигалактуроназы) широко распространены у микроорганизмов (грибов и бактерий); у растений они встречаются редко.

Известны ферменты, осуществляющие негидролитическое расщепление пектиновых веществ с образованием двойной связи в галактуроновом остатке между  $C_4$  и  $C_5$ . Грибные пектолитические ферменты имеют оптимум рН от 3,5 до 5,0; они более стабильны. Некоторые фитопатогенные грибы обладают высокоактивным пектолитическим комплексом ферментов (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* forma *lycopersici*), обуславливающим их патогенность. Фитопатогенные виды *Erwinia* вызывают распад тканей ряда растений благодаря высокой активности пектинолитических ферментов.

Анаэробная бактерия *Clostridium felsineum* продуцирует пектатрансэлиминазу, полигалактуроназу и пектинэстеразу. Четыре пектинолитических фермента обнаружены у факультативного анаэроба *Bacillus polymyxa*. Они характеризуются различными значениями оптимума рН и дают различные продукты гидролиза.

### 18.2.2. Протеиназы

Протеиназы, или протеазы (пептид-пептид-гидролазы), катализируют разрыв пептидных связей белков с образованием свободных аминокислот, ди- и полипептидов. Таких ферментов очень много. Некоторые из них получены в кристаллическом состоянии. По своим свойствам протеиназы микроорганизмов могут существенно различаться. Они бывают нейтральными (у *Bac. subtilis*, *Asp. terricola*), кислыми (*Asp. foetidus*) и щелочными, т. е. активными при различных значениях рН.

Некоторые микроорганизмы обладают несколькими протеиназами. Так, *Actinomyces fradiae* синтезирует шесть протеиназ. Полученный при использовании этого микроорганизма ферментный препарат «протофрадин» содержит лейцинамино- и карбоксипептидазы, сериновые протеиназы с трипсиновой, химотрипси-

новой и эластазной активностями. Из культуральной среды *Act. rimosus* выделен комплекс протеиназ, названный «римопротелином», а из *Streptomyces griseus* — «протелин», гидролизующий казеин, эластин, обладающий трипсиновой, химотрипсиновой активностями и сходный с проназой.

Из *Asp. terricola* получен активный препарат протеиназы, лизирующий тромбы крови без гемолиза эритроцитов.

Одним из протеолитических ферментов, получаемых в промышленных количествах, является коллагеназа *Clostridium histolyticum*. Субстратом коллагеназы служат коллаген-белковая основа коллагеновых волокон соединительной ткани (сухожилия, сетчатый слой кожи, хрящи, связки). Пепсин, химотрипсин, трипсин, проназа отщепляют концевые пептидные группы коллагена, но не действуют на нативный коллаген.

Коллагеназа *Cl. histolyticum* действует на коллагены различного происхождения (шкуры животных, плавательные пузыри рыб и др.) с образованием различных продуктов, преимущественно пептидов с молекулярной массой около 500. Два трипептида доминируют в продуктах гидролиза: глицил—пролил—аланин и глицил—гистидин—пролин. Ряд грибов и *Bac. subtilis* образуют протеиназы, похожие на ренин животных.

Аспартаза (L-аспартат-NH<sub>3</sub>-лиаза) осуществляет разложение аспарагиновой кислоты и активно проводит ее синтез из фумаровой кислоты и аммиака. Продуцируют этот фермент *E. coli* и ряд других бактерий.

Практический интерес представляют декарбоксилазы аминокислот, образуемые рядом бактерий, в частности фермент, действующий на лизин (L-лизин-карбоксилиаза).

### 18.2.3. Липазы и другие гидролазы

Из ферментов, участвующих в липидном обмене, наибольший практический интерес представляют липазы (триацилглицеролацилгидролазы). Продуцентами липаз, выделяемых в культуральную среду, служат многие грибы из числа *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, некоторые дрожжи (*Candida*) и бактерии (*Pseudomonas*). Липазы катализируют гидролиз триацилглицеролов с образованием жирных кислот и глицерина.

Фосфокиназы расщепляют сложноэфирные связи между жирными кислотами, глицерином и фосфатидиловой кислотой. Они также имеют широкое распространение у микроорганизмов, особенно часто встречаются у спорообразующих бактерий рода *Clostridium* и *Bacillus*.

Пенициллинацилазы (пенициллин аминогидролазы, иначе называемые пенициллинамидазами) катализируют гидролиз пенициллина. Это имеет большое практическое значение для получения полусинтетических пенициллинов, а также инактивации антибиотика. Продуцентами ферментов являются *E. coli* и некоторые другие бактерии, а также гриб *Neurospora crassa*. С по-

мощью ацилаз L-аминокислот возможно разделение их на L- и D-формы, поскольку этот фермент гидролизует только ацил-L-изомер. В результате отщепления от него ацильной группы образуется L-аминокислота, которая более растворима. Продуктами аминоксиллазы, имеющими практическое значение, являются некоторые мицелиальные грибы и дрожжи. Аспарагиназа, образуемая в значительном количестве некоторыми штаммами *E. coli* и *Erwinia carotinovorа*, отщепляет амидную группу от аспартата, что также имеет практическое значение.

#### 18.2.4. Литические ферменты

Такие ферменты способны вызывать лизис вещества клеточной стенки у многих видов бактерий и дрожжей. По действию литические ферменты микробного происхождения сходны с лизоцимом, но отличаются от него тем, что это комплекс, в состав которого могут входить  $\alpha$ - и  $\beta$ -маннозидазы, глюконазы, протеиназы, амидазы, липазы, хитиназы и другие ферменты. Последовательность действия отдельных компонентов такого сложного комплекса по отношению к различным клеткам и в зависимости от продуцента различна. Протеиназы обычно действуют раньше глюконаз на клетки дрожжей, но известно, что  $\beta$ -1,3- и  $\beta$ -1,6-глюконазы *Bac. subtilis* лизируют дрожжевые клетки без участия протеиназ. Продуцируют литические ферменты также некоторые актиномицеты (*Actinomyces griseus*, *Thermoactinomyces vulgaris*) и бактерии из рода *Pseudomonas*.

#### 18.2.5. Негидролитические ферменты

К негидролитическим ферментам относятся отдельные оксидоредуктазы, лиазы, изомеразы, а также лигазы. Негидролитические ферменты используются в практике пока сравнительно редко.

Лактатлиазы и пектинлиазы, как уже отмечалось выше, вместе с другими ферментами осуществляют разложение пектиновых веществ. Продуцируют их бактерии родов *Erwinia*, *Bacillus*, *Clostridium*, а также представители некоторых грибов рода *Aspergillus*.

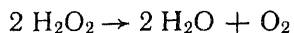
Фумарат-гидратаза, или фумараза (L-малат-гидро-лиаза), образуемая многими микроорганизмами, катализирует образование малата из фумарата и  $H_2O$ . К числу бактерий, активно осуществляющих такую реакцию, относится *E. coli*.

Изомеразы превращают глюкозу во фруктозу и ксилозу в ксилулозу. Продукентами глюкозоизомеразы являются некоторые бактерии (*Streptomyces* и *Bacillus*), а также грибы из рода *Mucor*. Фермент используется для получения смеси D-глюкозы и фруктозы как заменителя сахарозы при гидролизе крахмала до глюкозы.

Глюкозооксидаза ( $\beta$ -D-глюкозо: $O_2$ -оксидоредуктаза) осуше-

ствяет реакцию окисления  $\beta$ -D-глюкозы молекулярным кислородом с образованием D-глюконо- $\sigma$ -лактона и пероксида водорода. Продуцируют фермент *Penicillium vitale*, *P. notatum* и *Asp. niger*.

Каталаза катализирует реакцию



Фермент образуют в большом количестве грибы рода *Aspergillus* и *Penicillium* (*P. vitale*), а также некоторые дрожжи и бактерии.

Помимо получаемых в производственных условиях и в промышленном масштабе, имеется ряд ферментов, пока используемых в ограниченном количестве, но некоторые из них чрезвычайно важны. К их числу относятся так называемые рестриктазы (эндонуклеазы), осуществляющие расщепление нуклеиновых кислот, и лигазы, участвующие в их синтезе. И те и другие необходимы для работ в области генетической инженерии. Продуцентами таких ферментов служат различные микроорганизмы.

### 18.3. ШТАММЫ-ПРОДУЦЕНТЫ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

Среди выделенных из различных источников штаммов микроорганизмов найдены многие активные и производственно ценные продуценты ферментов. Однако наиболее высокопродуктивные штаммы во многих случаях получены с помощью различных физических и химических мутагенов.

#### 18.3.1. Получение активных продуцентов

Мутанты в большинстве случаев ауксотрофны по ряду соединений, так как в них произошли определенные нарушения обмена веществ, вызвавшие гипертрофию некоторых функций клетки. Обычно активные штаммы, выделенные из естественных источников, подвергают действию мутагенов несколько раз, т. е. осуществляют ступенчатую селекцию. В результате получают высокопродуктивные штаммы. Часто эффективно комбинированное воздействие мутагенов химической и физической природы. Так, применение этиленмина и ультрафиолетового излучения в сочетании со ступенчатым отбором позволило получить очень активные штаммы *Asp. awamori*, используемые как продуценты амилолитического, протеолитического и других ферментных комплексов. Селекция производственно ценных штаммов ведется и в условиях производства.

Непременным условием правильно поставленного промышленного процесса являются также мероприятия по сохранению микроорганизмов-продуцентов. Существует ряд методов хранения производственно ценных штаммов, обеспечивающих их высокую биохимическую активность (см. гл. 8). В музеях живых культур при заводских лабораториях культуры периодически пересеваются. Однако пересевы через короткие промежутки времени могут снизить активность микроорганизмов, поэтому после

развития культуры на плотной среде ее заливают стерильным вазелиновым маслом. Во многих случаях лучшим способом хранения является лиофилизация культур.

### 18.3.2. Питательные среды для культивирования микроорганизмов

Питательные среды по своему назначению разделяются на три основные группы: среды для поддержания штаммов-продуцентов в лаборатории и в музее; среды для получения посевного материала и среды, употребляемые в больших объемах в основном процессе производства. Если первая группа сред подбирается исходя из физиологических потребностей микроорганизмов, то две последние группы должны удовлетворять и требованиям производства, т. е. они должны быть достаточно дешевыми. Состав сред, обеспечивающих накопление того или иного фермента, может значительно отличаться от состава сред, применяемых для выделения и поддержания культуры продуцентов.

Как уже было отмечено выше, некоторые ферменты микроорганизмов индуцибельны и требуют для своего синтеза присутствия в среде индуктора, причем индуктором не всегда может быть субстрат, на который фермент действует. Так, например, если для синтеза липазы *Aps. niger* благоприятно присутствие в среде растительного масла, а для синтеза рибонуклеазы — нуклеиновых кислот, то для повышенного синтеза  $\alpha$ -амилазы *Vac. polymyxa* недостаточно присутствия в среде растворимого крахмала, необходимо добавление гидролизата казеина. При замене органических соединений азота неорганическими фермент не синтезировался. С целью удешевления производства ферментов подбирают наиболее дешевые источники сырья, пригодные для культивирования микроорганизмов-продуцентов.

При промышленном получении гидролаз обычно используют различные отходы, содержащие специфические субстраты. Так, в производстве пектолитических ферментов применяют пектинсодержащее сырье, например свекловичный жом, для целлюлолитических — солому, отруби и другие целлюлозосодержащие субстраты. Но использование в промышленности сред с такими нерастворимыми субстратами не всегда оказывается технологичным, а также затрудняет направленное ведение ферментации при глубинном культивировании продуцентов.

Применение сред с растворимым соединением углерода дает возможность устранить эти недостатки, сократить сроки ферментации и вести процесс на современном уровне. Перспективным сырьем для получения некоторых микробных экзоферментов (пектиназы, целлюлазы и др.) признана молочная сыворотка — дешевый побочный продукт производства сыра, творога, казеина. Использование молочной сыворотки в качестве питательной среды позволяет также осуществить непрерывный способ получения ряда экзоферментов.

Для получения целлюлазы при помощи термотолерантного штамма *Asp. terreus* подобрана дешевая питательная среда с пшеничной соломой, которая может быть использована в виде сечки и муки.

При приготовлении сред для промышленного выращивания продуцентов ферментов может быть использована биомасса других микроорганизмов, подвергнутая гидролизу или экстракции.

Разработан способ экстрагирования биомассы грибов-продуцентов пектиназы и последующего введения экстрактов в питательную среду, позволяющий полностью утилизировать всю получаемую биомассу, сократив на 9% количество экстракта свекловичного жома и интенсифицировав биосинтез пектолитических ферментов в 2,4 раза.

Разработана также замкнутая технологическая схема получения пектолитических ферментов, позволяющая полностью утилизировать отходы микробиологического производства, путем возврата их в технологический процесс.

Поиски новых питательных сред, удовлетворяющих современное производство ферментов, способных заменить исходное сырье (кормовые и пищевые продукты), — актуальная проблема биотехнологии.

#### **18.4. ВЫДЕЛЕНИЕ И СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ**

Выбор метода выделения и очистки ферментов микроорганизмов различны и определяются в зависимости от локализации (в клетках фермент или в культуральной среде) и целями применения. Неочищенные ферментные препараты получают путем сушки и размельчения мицелия гриба вместе с твердым субстратом (отрубями, жомом и др.) или высушиванием продуцента вместе с культуральной жидкостью на распылительной сушилке. Высушенные препараты размалываются в порошок и в таком виде используются. Удельная ферментная активность таких препаратов невелика, но они дешевле и достаточно устойчивы при хранении. Таким способом получают амилазы, протеазы, целлюлазы для сельского хозяйства и некоторых отраслей промышленности.

Получение сиропов производится при сгущении отделенной от биомассы микроорганизма культуральной жидкости, содержащей фермент.

В лабораторной практике и промышленности существуют различные способы концентрирования, однако лишь некоторые из них могут быть использованы для сгущения ферментных растворов.

При промышленном производстве ферментов наряду с активностью важными показателями являются их термоустойчивость, рН и стабильность. Следует также учитывать, что увеличение концентрации неочищенных растворов ферментов может сопровождаться повышением содержания ингибирующих примесей до



критического с одновременным разложением и удалением стабилизирующих продуктов. Но обычно уменьшение содержания воды при сгущении приводит к снижению скорости химических и биохимических процессов.

Способов концентрирования известно несколько: 1) без изменения фаз (мембранные); 2) с изменением фаз (вымораживание; выпаривание). Концентрирование с помощью мембран основано на том, что состав жидкости может быть изменен при пропускании ее через мембрану с селективной проницаемостью. Идеальная мембрана должна быстро пропускать необходимое вещество из раствора, но быть барьером для всех других компонентов.

Возможен и другой вариант мембраны, при котором необходимое вещество остается, а все другие компоненты пропускаются. На практике применяют мембраны обоих типов.

Для сгущения термочувствительных жидкостей используется прием, основанный на избирательной кристаллизации воды в растворе при охлаждении ниже 0°. Сущность этого метода концентрирования заключается в том, что вода сгущаемого раствора превращается в кристаллы льда, увеличивая тем самым концентрацию растворимых веществ. Кристаллы льда удаляются центрифугированием или прессованием. Операция повторяется многократно до получения необходимой концентрации фермента. При таких условиях полностью исключаются потери термостабильных компонентов раствора (отсутствует термическое разрушение).

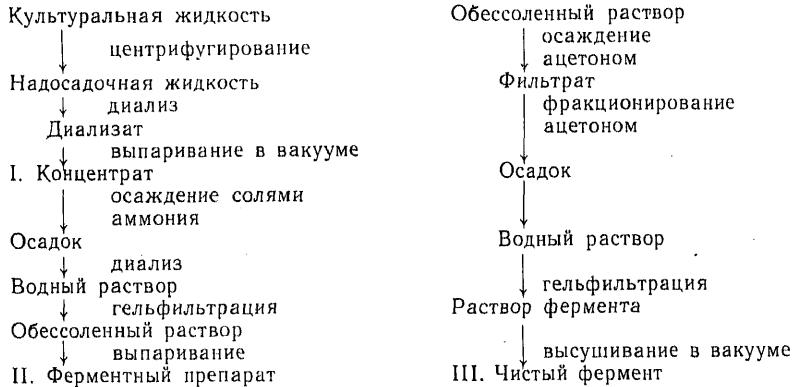
Разработка новых способов концентрирования биологических жидкостей не умаляет значения такого общеизвестного приема, как вакуум-выпаривание. Обилие конструкций выпарных установок и уровень современного развития исследований в этой области открывают большие возможности использования процесса выпаривания.

Физический смысл выпаривания растворов — разделение их на две части: воду, удаляемую в виде пара, и обогащенный растворимыми веществами концентрат. В ферментной промышленности широко распространен процесс концентрирования водных растворов под вакуумом. Так производят, например, сгущение водного экстракта из мицелия *Asp. oryzae* для получения препарата протеоризина. Большое количество ферментных препаратов производят с использованием способа вакуум-концентрирования.

Высушивание ферментных препаратов производится в вакууме при распылении или из замороженного состояния. После высушивания препарат в случае нестойкости необходимо смешивать со стабилизатором или с наполнителем (крахмал, декстрины, неорганические нейтральные соединения, тальк и др.). В некоторых случаях удается стабилизировать фермент добавлением в культуральную жидкость хелатирующих агентов. Так удалось стабилизировать щелочную протеазу *Bac. subtilis*

добавлением в среду триполифосфата натрия, нитрилотриацетата натрия и этилендиаминтетраацетата.

Используются ферменты и в виде гомогенных белков. Получение ферментов в чистом виде осуществляется различными способами в зависимости от их свойств и области применения. Обычная схема получения экзоферментов может быть следующей:



В промышленности высокая степень очистки ферментов не всегда нужна. Очистка должна быть очень высокой в случае использования ферментов как терапевтических препаратов.

Очистку и разделение ферментов, образующих комплексы, проводят, применяя ионообменные смолы. Ионообменный метод, например, позволяет разделить ферменты пектолитического комплекса грибов, очистить и выделить пектинэстеразы, полигалактуроназы и пектинтрасэлиминазы.

Для использования фермента как терапевтического препарата применяется иногда микрокапсулирование. Фермент, заключенный в специальные капсулы, достигает органа или ткани, где он должен проявить свою активность, там капсула растворяется и фермент попадает в тканевую жидкость.

В настоящее время все шире используются так называемые иммобилизованные ферменты, т. е. ферменты, прочно связанные с различными носителями. Помимо иммобилизации высоко очищенных ферментов, весьма перспективен способ иммобилизации целых клеток микроорганизмов, обладающих той или иной ферментной активностью. В этом случае фермент более стабилен (см. гл. 10).

### 18.5. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Использование ферментов микроорганизмов в различных областях народного хозяйства весьма перспективно. В настоящее время ферментные препараты, полученные из микроорганизмов, применяются в различных областях промышленности, сельского хозяйства и медицины.

## 18.5.1. Применение ферментов в пищевой промышленности

В пивоварении и винокурении для замены солода используются препараты грибных амилаз. Это удешевляет производство и сокращает расход зерна. Амилазы используются также для получения растворимого крахмала, декстрина и патоки. Продукты из овощей и фруктов, полученные с применением амилаз, содержат больше сахара и лучше усваиваются, особенно детьми. В хлебопечении амилазы ускоряют процесс созревания теста и улучшают качество хлеба.

В кондитерской промышленности используется инвертаза (сахараза) дрожжей, превращающая сахарозу в глюкозу и фруктозу, она предупреждает кристаллизацию сахарозы при высоких концентрациях.

Комплекс ферментов (цитаз) грибов, расщепляющих вещества стенок растительных клеток, используют для улучшения экстракции их содержимого (сока, эфирных масел, жиров, крахмала).

Пектиназы грибов применяют для осветления фруктовых и ягодных соков, для повышения выхода виноградного сока в виноделии, при производстве кофе. Применение пектиназ особенно эффективно при производстве сока из плодов и ягод, содержащих много пектина (черная смородина, крыжовник, слива). В СССР в промышленных масштабах выпускаются пектолитические препараты «Авоморин ППК», «Пектавоморин П10х».

Грибная глюкоамилаза применяется в пивоваренной промышленности для удаления остатков декстринов из пива. Глюкозоизомераза используется для получения глюкозо-фруктозных сиропов, заменяющих сахарозу, что важно для улучшения рационов питания, поскольку использование в большом количестве сахарозы вредно для человека.

Лактаза применяется для получения молока без лактозы. После такой обработки оно приобретает лучшие вкусовые качества. Кроме того, некоторая часть населения не может употреблять молоко именно из-за наличия в нем лактозы, которая вызывает аллергическую реакцию. С помощью лактазы получают также сахара (глюкозу, галактозу) из молочной сыворотки, содержащей большое количество лактозы.

Большое значение имеет глюкозооксидаза грибов, так как она позволяет пищевым продуктам освободиться от остатков глюкозы и молекулярного кислорода и этим повышает сроки их хранения. Глюкозооксидазу добавляют к яичному порошку, к майонезу, к пиву при его длительном хранении. С помощью этого фермента замедляется окисление аскорбиновой кислоты при обработке им овощей и фруктов. Применение ферментов облегчает получение глюконовой кислоты.

Каталазу *Asp. niger* применяют в пищевой промышленности для удаления остатков пероксида водорода — стерилизующего

агента при получении пищевых концентратов, стерильного молока, меланжа.

Препараты целлюлазы используют для осахаривания картофельной мезги, выделения крахмала из картофеля и зерна, увеличения выхода агар-агара из водорослей, для приготовления овощной пасты, удаления кожуры у цитрусовых. Используют их и для получения редуцирующих сахаров из растительных материалов. Такой способ производства сахаров может быть дешевле, чем при использовании в качестве исходного субстрата крахмала.

Протеолитические ферменты микробного происхождения заменяют ренин в сыроделии для получения сгустка. Начинают их использовать для размягчения (тендеризации) мяса, ускорения созревания рыбы при посоле, в виноделии и пивоварении.

Липазы находят применение в производстве цельного сухого молока, в сыроделии для ускорения созревания сыров и придания им специфического вкуса и аромата.

### **18.5.2. Применение ферментов в текстильной промышленности**

В текстильной промышленности пектолитические ферменты микроорганизмов давно и широко применяются для переработки льносоломы и получения из нее волокна. В настоящее время используется тепловая мочка льна на льнозаводах. Основными микроорганизмами, участвующими в процессе мочки, признаны анаэробы рода *Clostridium*. Процессы, протекающие во время мочки, приводят к разрушению пектиновых веществ льносоломы и высвобождением льноволокна.

Для ускорения процесса (обычно идущего 2,5—3 сут) и повышения качества волокна был получен ферментный препарат пектоклостридин ГЗх — отфильтрованная и высушенная культуральная жидкость *Clostridium* sp. Препарат позволяет ускорить процесс мочки в 2—2,5 раза и получить волокно с высокой механической прочностью. Амилолитические препараты используют для удаления клея из тканей (расшлихтовка). Некоторые протеиназы, в частности протосубтилин, используются для обесклеивания шелка (удаления серицина) и высвобождения шелковых волокон, состоящих из фиброина. Для освобождения шелкового волокна от жира применяют препараты липаз.

### **18.5.3. Другие области промышленного применения ферментов**

В кожевенной промышленности микробные протеиназы используют для обезволашивания шкур и мягчения кожи. Применение комплексного ферментного препарата, состоящего из протеазы и липазы, ускоряет процесс и позволяет получить высококачественную шерсть.

Использование микробных ферментов при производстве моющих средств приобретает все большее распространение. Обычно в них добавляют ферменты *Bac. subtilis*, обладающие протеолитической, амилалитической и липолитической активностями; препараты используются в комбинации с поверхностно-активными веществами. Моющие средства, содержащие ферменты, сокращают продолжительность стирки, повышают сохранность тканей, так как обработка ведется при 40—60°C (не выше).

#### 18.5.4. Применение ферментов в сельском хозяйстве

Применение ферментов в сельском хозяйстве развивается в двух направлениях: 1) использование в рационах животных, 2) обработка кормов ферментами для повышения их усвояемости.

При поверхностном способе культивирования *Asp. oryzae* у нас в стране получают препарат амилоризин — высушенная культура гриба, содержащая  $\alpha$ -амилазу, декстриназу, мальтазу, глюкоамилазу и протеиназу. Препарат глюкаваморин — высушенная культура *Asp. awamori*, выращенного на отрубях, содержит  $\alpha$ -амилазу, декстриназу, мальтазу, глюкоамилазу, кислую протеиназу и гемицеллюлазу. Препарат амилосубтилин, содержит  $\alpha$ -амилазу, протеазы,  $\beta$ -глюконазу и литические ферменты. Эти ферменты входят в состав протосублитина ГЗх и ксилаваморина ГЗх, содержащих также гемицеллюлазу и пектиназу.

#### 18.5.5. Применение ферментов в медицине

Микробные ферменты используются в различных областях медицины как терапевтические средства и при проведении клинических анализов. При лечении воспалительных процессов и ожогов применяются препараты протеиназ, разрушающие некротизированные ткани и клетки, способствуя быстрому заживлению ран.

При терапии злокачественных новообразований используют бактериальную L-аспарагиназу, превращающую L-аспарагин, необходимый лейкозным клеткам, в L-аспарагиновую кислоту, в результате чего рост опухоли значительно замедляется. Тромболитическими свойствами обладают протеиназы террилитин и стрептокиназа, имеющие микробное происхождение.

В заместительной терапии, т. е. при нарушении синтеза некоторых ферментов в организме человека, применяют отдельные ферменты и комплексные ферментные препараты. Например, при нарушении функции поджелудочной железы употребляют комплексный препарат, содержащий протеиназу, амилазу и липазу. При потере способности к синтезу лактазы и глюкоамилазы также используют эти ферменты, полученные из микроорганизмов.

При нарушении процессов пищеварения в некоторых случаях используют комплекс ферментов ( $\alpha$ -амилаза, целлюлаза, липаза и протеиназа).

Использование микробных ферментов в медицине весьма перспективно и, несомненно, будет расширяться. Трудности в применении ферментных препаратов для целей медицины состоят в необходимости очистки их от пирогенных веществ, токсинов и других примесей. Принимая во внимание белковую природу ферментов, необходимо проверять их на антигенное действие и аллергическую реакцию организма.

### 18.5.6. Использование ферментов при проведении химических анализов

Применение ферментов в качестве химических реактивов составляет особую область аналитической и препаративной биохимии.

В качестве примеров можно привести определение кокарбоксилазы в крови при помощи протеиназы *Asp. niger*, расщепляющей ее с выделением тиамин. По количеству свободного тиамин рассчитывают количество фермента.

Определение галактозы производят, используя галактозооксидазу гриба *Polysporus ciracinatus*. Фермент окисляет галактозу, переводя ее в соответствующий лактон с одновременным образованием пероксида водорода. При добавлении пероксидазы и орто-дианизида появляется синяя окраска колориметрируемого раствора.

Определение оротовой кислоты можно проводить с соответствующей дегидрогеназой оротовой кислоты из *Clostridium oroticum*. Фермент катализирует восстановление оротовой кислоты НАДН<sub>2</sub> с образованием дигидрооротата и НАД.

Бактериальная гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту количественно с образованием ненасыщенного дисахарида. При этом образуются N-ацетилглюкозаминовые группы, дающие при нагревании в щелочи с пара-диметиламинобензальдегидом красную окраску. (важно для колориметрирования).

Бактериальные и грибные протеиназы используются для расщепления белков, причем расщепление может быть фрагментарным. Например, субтилизин при коротком воздействии на рибонуклеазу расщепляет только одну пептидную связь этого белка. Карбоксидопептидаза дрожжей постепенно расщепляет белки, отделяя одну за другой аминокислоты с карбоксильного или аминного конца.

Определение L-аминокислот (L-лизин, L-аргинин, L-орнитин, L-тирозин и др.) можно проводить с помощью специфических декарбоксилаз аминокислот. Ферменты синтезируются некоторыми бактериями (например, *Cl. welchii*, *Cl. septica*) и эффективны при низком значении рН. Образовавшаяся при реакции углекислота может быть измерена количественно.

Определение глутамина и аспарагина проводится путем их дезаминирования специфическими дезаминадами *Pseudomonas* sp. Освобождающийся аммиак определяют по цветной реакции с фенолятом в присутствии нитропруссиды.

Весьма перспективны такие ферменты микроорганизмов, как холестериноксидаза для определения холестерина в крови, алкогольоксидаза для обнаружения спирта и др. Ферменты используют также для изучения первичной структуры высокомолекулярных соединений: нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов.

### 18.5.7. Использование ферментов в органическом синтезе

Перспективная область применения ферментов микроорганизмов — использование их для синтеза различных практически важных соединений.

Выше отмечалось, что с помощью пенициллинамидазы, образуемой некоторыми бактериями, можно получить 6-аминопенициллановую кислоту — субстрат для синтеза полусинтетических пенициллинов.

L-Аспарагиновую кислоту получают с помощью аспартазы *E. coli*. При этом используют как препараты фермента, так и клетки с увеличенной проницаемостью в иммобилизованном состоянии.

Аналогичным образом могут быть синтезированы и некоторые другие практически важные L-аминокислоты, в частности тирозин, 3,4-диоксифенилаланин.

Использование ацилаз аминокислот позволяет разделить их L- и D-изомеры. В Японии создано производство L-яблочной кислоты из фумаровой на основе использования бактериальной фумаразы. Эта кислота применяется как заменитель лимонной кислоты в пищевой и фармацевтической промышленности.

Ряд реакций трансформации, ведущих к получению стероидных препаратов, основан практически на ферментативной активности не растущих клеток микроорганизмов (см. гл. 27).

С помощью ферментов микроорганизмов возможно и проведение многостадийных процессов. Например, иммобилизованные клетки дрожжей способны синтезировать глутатион из глюкозы и фосфата, что требует последовательного действия нескольких ферментов.

Как уже отмечалось выше, особая область применения ферментов микроорганизмов — их использование в генетической инженерии. Даже эти немногочисленные примеры позволяют представить, что возможности использования ферментов микроорганизмов для получения практически важных соединений, а также для других целей весьма разнообразны. Очевидно, что в недалеком будущем количество и число ферментов микробного происхождения, выпускаемых промышленностью, будет существенно расширено.

## Глава 19 ЛИПИДЫ

Липиды — большая группа природных веществ, разнообразных по химической структуре и физико-химическим свойствам. Имеется несколько трактовок понятия липиды и различных схем их классификации, основанных на свойствах этих веществ. Общее свойство липидных соединений — способность растворяться в эфире, хлороформе и других органических растворителях (но не в воде).

Липиды по строению можно подразделить на две большие группы. 1. Простые липиды, или нейтральные жиры, представленные у большинства организмов ацилглицеринами, т. е. глицериновыми эфирами жирных кислот (свободные жирные кислоты встречаются в клетках лишь как минорный компонент). 2. Сложные липиды, к которым относятся липиды, содержащие фосфорную кислоту в моно- или диэфирной связи, — это фосфолипиды, в число которых входят глицерофосфолипиды и сфинголипиды. К сложным липидам относятся соединения, связанные гликозидной связью с одним или несколькими остатками моносахаридов, или гликолипиды, а также соединения стероидной и изопреноидной природы, в том числе каротиноиды.

До 20-х годов нашего столетия липиды, особенно нейтральные, рассматривались лишь как запасной материал, который возможно без особого ущерба для жизнедеятельности организма заменить другими, равными по калорийности веществами. Первое доказательство того, что липиды содержат физиологически необходимые для высших животных соединения, получено в 1926 г. голландскими исследователями Ивансом и Буром. Несколько позднее было установлено, что этими соединениями являются полиненасыщенные жирные кислоты (линолевая, линоленовая и арахидоновая) — физиологически необходимые для большинства живых организмов (витамин F).

В дальнейшем было установлено, что и в клетках микроорганизмов липиды выполняют самые различные биологические функции. Они входят в состав таких ответственных структур, как клеточная мембрана, митохондрии, хлоропласты и другие органеллы. Липопротеиновые комплексы играют важную роль в процессах метаболизма. С ними в значительной мере связаны активный перенос различных веществ через пограничные мембраны и распределение этих веществ внутри клетки. С составом липидов во многом связаны такие свойства организмов, как термотолерантность и термофильность, психрофильность, кислотоустойчивость, вирулентность, устойчивость к ионизирующей радиации и другие признаки. Кроме того, липиды могут выполнять функцию запасных продуктов. К таковым относятся поли- $\beta$ -гидроксимасляная кислота, образуемая многими бактериями, и ацилглицерины, в частности триацилглицерин, накапливаемый в больших количествах некоторыми дрожжами и другими представителями грибов.



## 19.1. СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ У МИКРООРГАНИЗМОВ

Систематическое изучение липидов микроорганизмов началось с 1878 г. после сообщения немецких исследователей Нэгели и Лёв об образовании капель жира у дрожжей, растущих в условиях обильного снабжения кислородом. Общее количество липидов у микроорганизмов обычно колеблется от 0,2 до 10% от абсолютно сухих веществ клетки. Однако в условиях, благоприятных для накопления этих продуктов метаболизма, содержание липидов может достигать 60—70% от сухих веществ. Способностью к такому «сверхсинтезу» липидов обладают лишь некоторые представители микроорганизмов. Из мицелиальных грибов значительные количества липидов (40—70%) образуют представители родов *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium* и некоторые другие. Примерно такое же количество липидов синтезируют дрожжи — представители родов *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Sporobolomyces*. Из бактерий интересны микобактерии, способные накапливать до 40% липидов. У ряда бактерий количество полигидроксибутирата доходит до 60%, например у водородоксиляющего вида *Alcaligenes eutrophus*. В определенных условиях культивирования до 60% и более липидов накапливают некоторые микрорформы водорослей.

### Максимальное содержание липидов у некоторых микроорганизмов

Микроорганизм	Липиды по отношению к сухому веществу клеток, %
<i>Actinomyces albaduncus</i> . . . . .	42—57
<i>Alcaligenes eutrophus</i> . . . . .	40—60
<i>Mycobacterium smegmatis</i> . . . . .	35—36
<i>Pseudomonas mallei</i> . . . . .	39—40
<i>Cryptococcus terricolus</i> . . . . .	65—70
<i>Endomycopsis vernalis</i> . . . . .	45—59
<i>Lipomyces lipoferus</i> . . . . .	50—63
<i>Lipomyces starkeyi</i> . . . . .	50—63
<i>Rhodotorula gracilis</i> . . . . .	50—65
<i>Sporobolomyces roseus</i> . . . . .	40—55
<i>Blakeslea trispora</i> . . . . .	54—56
<i>Geotrichum candidum</i> . . . . .	25—39
<i>Geotrichum wallrothi</i> . . . . .	30—50
<i>Penicillium yavanicum</i> . . . . .	41—42
<i>Rhizopus arrhizus</i> . . . . .	45—70
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> . . . . .	38—76

Состав липидов различных микроорганизмов часто неодинаков. У бактерий, как правило, много фосфолипидов. Микобактерии содержат значительные количества восков, а у архебактерий нейтральные липиды представлены простыми изопропилглицериновыми эфирами, т. е. не содержат в своем составе жирных кислот, наличие которых характерно для других организмов.

Жирные кислоты у эубактерий обычно содержат от 10 до 20 атомов углерода (преимущественно 15—19). Среди них имеются насыщенные кислоты с прямой цепью углеродных атомов, мононенасыщенные с прямой цепью, с разветвленной цепью (изо- и анте-изо-), с циклопропановым кольцом и гидроксикислоты. Но у подавляющего большинства бактерий отсутствуют полиненасыщенные жирные кислоты, типичные для липидов эукариотных организмов.

Жирные кислоты микобактерий и родственных форм сложнее таковых у других бактерий. Кроме обычных жирных кислот микобактерии, коринебактерии и нокардии содержат в составе липидов своеобразные, характерные только для этих микроорганизмов миколовые кислоты, представляющие собой высокомолекулярные  $\beta$ -гидроксикислоты с длинной алифатической цепью в  $\alpha$ -положении.

У грамположительных и грамотрицательных эубактерий (бацилл, клостридий, стрептококков, энтеробактерий и бруцелл) широко распространены жирные кислоты с циклопропановым кольцом.

Для актиномицетов и бацилл характерно высокое содержание разветвленных жирных кислот, количество которых достигает 80% от общей суммы жирных кислот.

Жирнокислотный состав липидов мицелиальных грибов во многом идентичен составу растительных масел. В связи с этим грибные липиды могут найти применение в различных отраслях народного хозяйства (сельское хозяйство, лакокрасочная промышленность, производство медицинских препаратов). В последние годы среди мицелиальных грибов обнаружены высокоактивные продуценты арахидоновой кислоты и разработан способ ее трансформации в некоторые простагландины (биологически активные вещества, представляющие собой производные полиненасыщенных жирных кислот, молекула которых содержит 20 углеродных атомов).

Из дрожжей наиболее изучен состав липидов у представителей родов *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*. У сахаромикетов обнаружены жирные кислоты от  $C_4$  до  $C_{26}$ . У аэробных и анаэробных культур *Saccharomyces* состав жирных кислот значительно различается. У дрожжей рода *Rhodotorula* жирные кислоты с длинной цепью ( $C_{22}$ ,  $C_{24}$ ,  $C_{26}$ ) встречаются чаще, чем у *Lipomyces* и *Cryptococcus*. Состав жирных кислот в липидах водорослей аналогичен составу различных растений.

Наряду с внутриклеточными, некоторые виды дрожжей и мицелиальных грибов обладают способностью образовывать и внеклеточные липиды. Имеются описания нескольких форм липидов, обнаруженных в среде. В культурах *Pullularia*, *Rhodotorula* и *Hansenula* экстрацеллюлярные липиды имеют вид капель различного диаметра. При выращивании дрожжей *Candida bogoriensis* глубинным способом экстрацеллюлярные липиды обнаруживаются в виде капель различного диаметра и в виде длинных белых

кристаллов. Исследования химического состава внеклеточных липидов показали, что дрожжами экскретируются четыре основных типа этих соединений:

- 1) полиоловые эфиры жирных кислот, в которых насыщенные, ненасыщенные и гидроксикислоты связаны эфирными связями с С<sub>5</sub>- и С<sub>6</sub>-полиолами;
- 2) сфинголипиды (тетраацетил С<sub>18</sub>-фитосфингозин и др.);
- 3) софорозиды гидроксикислот;
- 4) замещенные кислоты, например эритро-8, 9, 13-триацетоксидокозановая кислота.

Триацилглицерины в составе внеклеточных липидов не обнаруживаются. Сравнительное изучение вне- и внутриклеточных липидов *Rhodotorula glutinis* показало существенные различия в их жирнокислотном составе. Во внутриклеточных липидах идентифицировано только шесть органических кислот (основная — олеиновая). Кроме того, во внутриклеточных липидах отсутствовали С<sub>19</sub>, С<sub>20</sub>, гидроксистеариновая и гидроксиарахиновая насыщенные кислоты. Две последние в сумме составляют более 50 % всех жирных кислот внеклеточных липидов.

Между синтезом экстрацеллюлярных липидов и полисахаридов наблюдается обратная зависимость. При температуре культивирования ниже оптимальной у *R. glutinis* происходит резкое торможение синтеза экстрацеллюлярных липидов и в среде накапливаются значительные количества экзополисахаридов. Такое же явление наблюдается в условиях низкого значения рН.

## 19.2. ПРОДУЦЕНТЫ ЛИПИДОВ

Из разных представителей микроорганизмов дрожжи обладают рядом свойств (быстрота роста, нетребовательность к составу среды, отсутствие токсинов, высокий выход липидов, их состав), позволяющих рассматривать их как наиболее перспективный на ближайшее время источник промышленного получения липидов.

В качестве продуцентов для промышленного получения липидов могут использоваться представители, по ряду признаков относящиеся к группе «жировых дрожжей». Жировыми, или липидными, дрожжами называют виды, способные в нормальных условиях роста синтезировать до 40 % липидов и более (по отношению к сухим веществам клеток).

У типичного представителя липидных дрожжей — *Cryptococcus terricolus* обменные процессы направлены на преимущественный синтез липидов. Для большинства других дрожжей такой тип обмена не совсем обычен.

К липидобразующим дрожжам относят также некоторых представителей родов *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* и *Trichosporon* (*L. starkeyi*, *L. lipoferus*, *R. gracilis*, *S. roseus*, *T. pullulans*). Все эти дрожжи способны продуцировать значительные количества липидов. Однако в отличие от *C. terricolus*

Таблица 19.1. Состав дрожжевых липидов (%)

Фракция	<i>Lipomyces starkeyi</i>	<i>Lipomyces lipoferus</i>	<i>Sporobolomyces roseus</i>	<i>Cryptococcus terricolus</i>
Фосфолипиды	2,2	4,3	3,3	4,3
Стерины	2,5	5,3	3,7	1,1
Моно- и диацилглицерины	4,6	5,7	4,8	3,1
Свободные жирные кислоты	16,4	2,6	10,1	3,9
Триацилглицерины	71,4	78,1	72,2	86,3
Стериновые эфиры и воска	1,2	1,7	2,1	1,0

липидообразование их существенно зависит от условий культивирования и в первую очередь от соотношения соединений углерода и азота в среде. Общим для перечисленных микроорганизмов является строго аэробный метаболизм и неспособность к росту в результате брожений.

Среди отдельных фракций дрожжевых липидов наибольший удельный вес занимают триацилглицерины (табл. 19.1). Кроме того, обнаружены фракции фосфолипидов, стеринов и их эфиров, свободных жирных кислот, углеводов и восков. Фракционный состав липидов дрожжей различных таксономических групп идентичен, отличия состоят лишь в количественном соотношении фракций. Аналогичный фракционный состав имеют липиды мицелиальных грибов и водорослей.

Наличие в дрожжевых липидах значительного количества ненасыщенных жирных кислот придает им сходство с растительными маслами (табл. 19.2). По соотношению основных жирных кислот липиды *S. roseus* довольно близки такому «экзотическому жиру», как пальмовое масло, и могут быть его заменителем.

Таблица 19.2. Содержание основных жирных кислот в липидах (%)

Источник получения липидов	Насыщенные кислоты				Ненасыщенные кислоты			
	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C16:1	C18:1	C18:2	C18:3
Соевое масло	—	0,5	11,0	5,0	—	22,0	53,0	8,8
Подсолнечное масло	—	0,5	6,5	3,5	—	23,0	65,0	0,5
Пальмоядровое масло	53,0	16,1	9,0	3,0	—	18,0	1,0	—
Пальмовое масло	—	1,0	45,0	5,0	1,0	40,0	10,0	—
Льняное масло	—	—	7,0	14,0	—	18,0	14,0	47,0
Оливковое масло	—	—	11,5	2,8	0,8	75,0	8,5	0,8
Кокосовое масло	58,6	14,7	5,8	1,7	—	9,7	1,2	—
Животный жир	1,0	2,0	27,0	13,0	4,0	43,0	7,0	1,0
<i>Rhodotorula gracilis</i>	—	1,1	29,8	8,8	1,8	40,1	11,2	4,8
<i>Lipomyces starkeyi</i>	—	0,4	23,1	7,0	9,0	38,5	18,8	9,5
<i>Lipomyces lipoferus</i>	—	0,1	25,6	5,9	1,3	54,5	5,7	0,7
<i>Sporobolomyces roseus</i>	0,2	1,9	44,3	3,8	1,4	37,6	6,4	3,6
<i>Cryptococcus terricolus</i>	—	—	23,4	2,2	3,9	58,9	12,6	—
<i>Saccharomyces fragilis</i>	—	2,5	19,2	3,4	11,9	27,0	25,0	9,6

Близки дрожжевые липиды растительным маслам и по многим физико-химическим показателям. Так, йодное число, характеризующее степень ненасыщенности жира липидов *L. lipoferus*, близко к 60, показатель преломления 1,467, температура застывания около 18°C.

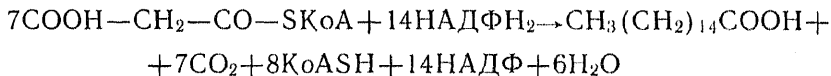
Липиды различных организмов подразделяются на две группы: 1) липиды, присутствующие постоянно; 2) липиды, количество которых непостоянно. Постоянно присутствующие в клетке липиды рассматриваются как ее необходимая составная часть; количество их не может уменьшаться ниже определенного предела, определяемого физиологическими особенностями организма. Липиды, содержание которых непостоянно, составляют, по-видимому, резерв питательных веществ, и количество их может быть весьма различным.

Кроме дрожжей как продуценты липидов в перспективе могут рассматриваться мицелиальные грибы и микроформы водорослей. Известный интерес (как источники специфических жирных кислот, поли-β-гидроксibuтирата, фосфолипидов и восков) представляют бактериальные продуценты.

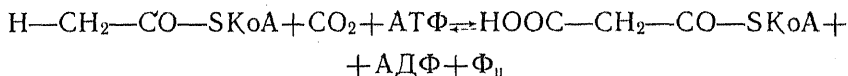
### 19.3. БИОСИНТЕЗ ЛИПИДОВ

В последние годы достигнуты значительные успехи в выяснении механизма биосинтеза липидов у микроорганизмов. Тем не менее некоторые детали этого процесса остаются неясными, особенно в отношении биосинтеза сложных липидов.

Первая стадия в биосинтезе липидов, содержащих жирные кислоты, — образование эфиров жирных кислот и кофермента А. Весь гомологический ряд жирных кислот с длинной цепью, содержащих четное число углеродных атомов, образуется в процессе реакций, называемых путем малонил-КоА. В этих реакциях к исходной молекуле ацетил-КоА последовательно добавляется звено С-2. Приведем суммарную реакцию синтеза пальмитил-КоА:

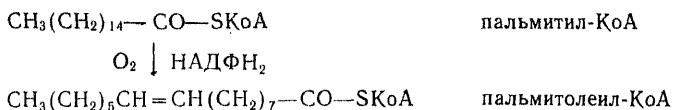


При первой реакции образуется малонил-КоА (путей синтеза несколько). Один из путей — реакция, катализируемая биотинсодержащим ферментом ацетил-КоА-карбоксилазой:



У дрожжей система синтеза жирных кислот представляет собой гомогенный многоферментный комплекс с молекулярной массой около 2—3 млн. (так называемая синтетаза жирных кислот).

Образование ненасыщенных жирных кислот у аэробных микроорганизмов происходит по следующей схеме:



Дополнительные двойные связи могут быть введены в эфир КоА и мононенасыщенной кислоты в сходной реакции, которая может быть катализирована тем же ферментом.

У многих бактерий обычный путь образования ненасыщенных жирных кислот — анаэробный, при котором происходит постепенное удлинение уже ненасыщенных предшественников. Кислоты, содержащие циклопропановые кольца, синтезируются путем образования метиленового мостика по месту двойной связи в ненасыщенных кислотах, при этом добавляемый углерод заимствуется из метильной группы метионина в форме S-аденозилметионина. Это добавление имеет место только при включении в фосфолипид предшественника с одной двойной связью.

#### 19.4. ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СОСТАВ ЛИПИДОВ

Многочисленные эксперименты по влиянию источников углерода на синтез липидов у дрожжей и мицелиальных грибов показали, что они оказывают влияние не столько на количество, сколько на состав образуемых липидов. Приспосабливаясь к новым условиям питания, микроорганизм в конечном счете может синтезировать примерно такое же количество липидов, как и на специфических для него средах. Что же касается состава жирных кислот, то он во многом определяется характером тех промежуточных продуктов, которые появляются в процессе превращения различных источников углеродного питания.

Особое влияние на состав жирных кислот в синтезируемых липидах оказывают соединения, которые сами входят в их состав (табл. 19.3). Так, при использовании микроорганизмами в качестве источника углерода высших жирных кислот последние в большом количестве включаются в состав липидов. При использовании углеводов основные жирные кислоты клеток либо имеют длину цепи потребляемого алкана, либо появляются в результате изменения длины углеродной цепи молекулы исходного алкана на четное число углеродных атомов.

В отличие от соединений углерода соединения азота не оказывают прямого влияния на биосинтез липидов. Их влияние связано со сдвигом равновесия питательной среды в сторону от оптимума значения рН, характерного для липидообразования. В то же время концентрация источника азота играет существенную роль в процессах липидообразования. Связано это с соотношением азота и углерода в среде. Чем это соотношение

Т а б л и ц а 19.3. Состав жирных кислот у *Cryptococcus terricolus*, выращенного на средах с различными соединениями углерода (% от общего количества)

Соединение углерода	C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>
Глюкоза	—	0,3	19,2	1,9	2,4	58,3	16,9	0,8
Глицерин	—	—	19,4	2,0	2,1	50,0	20,1	0,8
C <sub>12:0</sub>	22,0	0,4	14,1	2,8	3,5	40,1	10,8	1,9
C <sub>14:0</sub>	0,3	30,6	13,1	1,4	1,2	37,5	14,0	1,1
C <sub>16:0</sub>	—	5,0	40,5	1,7	4,2	37,9	10,5	сл.
C <sub>18:0</sub>	—	—	8,3	46,7	1,0	27,3	12,9	1,3
C <sub>18:1</sub>	—	0,3	20,1	4,8	3,6	58,4	10,3	1,3
C <sub>18:2</sub>	—	0,2	16,1	3,2	2,8	12,1	62,7	2,9
C <sub>18:3</sub>	—	0,7	4,6	1,1	2,2	9,6	8,3	70,8

выше в сторону углерода, тем более благоприятны условия для биосинтеза липидов, и наоборот.

В большой степени образование липидов у дрожжей и других грибов связано с дыхательной активностью клетки. Ингибирование процесса дыхания ведет к торможению биосинтеза липидов. При недостаточном снабжении кислородом резко тормозятся процессы образования триацилглицеринов, но накапливается значительное количество свободных жирных кислот и фосфолипидов. С интенсификацией аэрации среды возрастает степень ненасыщенности липидов путем частичной трансформации олеиновой кислоты в кислоты с двумя и тремя двойными связями.

На процессы биосинтеза липидов у микроорганизмов оказывают влияние также рН среды и температура культивирования. Так, повышение рН среды увеличивает содержание в составе дрожжевых липидов свободных жирных кислот, фосфолипидов и уменьшает содержание триацилглицеринов. При снижении рН увеличивается общая ненасыщенность липидов.

Снижение температуры культивирования ведет к повышению степени ненасыщенности клеточных липидов.

Кроме источников углеродного и азотного питания, а также рН, аэрации, температуры на процессы роста микроорганизмов и синтеза ими липидов определенное влияние оказывают различные компоненты минерального питания и некоторые витамины.

Отсутствие в среде пантотеновой кислоты отрицательно влияет не только на синтез общих липидов, но и на образование некоторыми дрожжами эргостерина. Определенное влияние на процессы липидообразования у дрожжей и других организмов могут оказывать также пара-аминобензойная кислота, инозит, пиридоксин и другие соединения.

Из безазотистых минеральных солей на липидообразование наиболее сильное влияние оказывают фосфаты. Недостаток фосфора ведет к неполному использованию источников углерода, избыток меняет направление обменных процессов в сторону синтеза в клетке соединений нелипидной природы.

В 1922 г. Г. А. Надсон наблюдал сильное ожирение дрожжевых клеток, наступающее после ионизирующего облучения при продолжающемся росте в питательной среде. Данное явление объяснялось им как результат резких нарушений обмена веществ, главным образом углеводного, ведущих к более интенсивному накоплению липидов, в первую очередь триацилглицеринов и стеринов.

Действие, подобное ионизирующей радиации, оказывают на дрожжевые организмы различные радиомиметические вещества (эмбихин и др.). Вызывая нарушение координации между отдельными звеньями общего обмена клетки, такие вещества резко угнетают функции размножения организма и приводят его к ожирению.

### **19.5. ВОЗМОЖНОСТИ ПРОМЫШЛЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПИДОВ**

Вопросам промышленного получения липидов с помощью микроорганизмов уделяется пристальное внимание как в нашей стране, так и за рубежом. Микроорганизмы можно использовать для получения фосфолипидов, гликолипидов, незаменимых жирных кислот и препаратов на их основе, необходимых для использования в медицинской практике, сельском хозяйстве, пищевой и других отраслях промышленности.

Ряд дрожжей и мицелиальных грибов рассматривается как потенциальные продуценты липидов, в том числе липидов — аналогов некоторым типам растительных масел. Мировая практика пока не имеет производств с целевым назначением получать микробные липиды. Однако изменение конъюнктуры на мировом рынке не исключает целесообразности организации получения липидов путем микробиологического синтеза.

В настоящее время в небольших объемах получают липиды только с помощью дрожжей, причем липиды являются побочным продуктом основного производства (при получении белково-витаминных концентратов на углеводородах нефти). Получение липидов из мицелиальных грибов, а также бактерий, водорослей и простейших пока не вышло за рамки лабораторных исследований. Одной из причин медленного решения вопросов получения бактериальных липидов следует признать наличие в их составе соединений, токсичных для макроорганизма.

С помощью дрожжей возможно получение липидов на различных субстратах: гидролизатах растительного сырья, сульфитных щелоках, углеводородах нефти и др. Эффективность производства дрожжевого жира во многом связана с количеством основного сырья, необходимого для получения определенной единицы массы дрожжей, и его стоимостью. Кроме того, сырье, на базе которого готовится питательный субстрат для выращивания дрожжей, должно обеспечивать получение липидов, отвечающих



требованиям, предъявляемым промышленностью, перерабатывающей липиды в различные продукты.

Наиболее отработаны технологические схемы получения липидов с помощью дрожжей на гидролизатах верхового торфа малой степени разложения и углеводородах нефти. Эти схемы различаются тем, что при получении липидов на гидролизатах торфа дрожжевой жир является основным продуктом, а при использовании углеводов дрожжевой жир — побочный продукт, появляющийся в результате очистки дрожжевой биомассы от остаточных углеводов. В связи с этим и фракционный состав получаемых этими путями липидов весьма различен: доминирующая фракция углеводородных дрожжей — фосфолипиды, основная фракция при получении липидов на гидролизатах торфа — триацилглицерины. В нашей стране процесс получения дрожжевых липидов в условиях специализированной установки осуществлен на Кстовском опытно-промышленном заводе белково-витаминных концентратов, вырабатывающем сотни тонн этого продукта биосинтеза. В ближайшие годы планируется ввод в строй нескольких установок по получению липидов из дрожжей способом, аналогичным кстовскому.

Процесс получения липидов на гидролизатах верхового торфа малой степени разложения включает несколько основных операций: получение гидролизата торфа, отдувка фурфурола и нейтрализация гидролизата до pH 5,5—6,0, введение в гидролизат минеральных источников питания, выращивание дрожжей — продуцентов липидов, отделение биомассы и экстракция из нее липидов. Следовательно, весь процесс аналогичен процессу получения кормовых дрожжей, за исключением дополнительных операций, связанных с извлечением липидов. Система растворителей, применяемая для этой цели, идентична используемым в масло-жировой промышленности. Оставшаяся после экстракции липидов биомасса «биошрот» может быть использована в кормлении сельскохозяйственных животных.

Продуцентами липидов на гидролизатах торфа являются выделенные в институте микробиологии АН БССР штаммы *Lipomyces lipoferus*, биомасса которых содержит до 40 % липидов и более. Из одной тонны абсолютно сухого торфа можно получить 50—70 кг дрожжевых липидов, содержащих до 70—75 % триацилглицеринов.

Кроме гидролизатов торфа для культивирования липидообразующих дрожжей и получения липидов по указанной выше схеме могут быть использованы другие гидролизные среды, например, гидролизаты древесины, или смешанные субстраты древесины и торфа.

## 19.6. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЛИПИДОВ

Многочисленными экспериментами показано, что дрожжевые липиды и продукты их переработки могут использоваться в самых различных отраслях народного хозяйства: в текстильной,

керамической, кожевенной, металлообрабатывающей (прокат стального листа, протяжка проволоки, лужение жести) промышленности. Дрожжевые липиды могут быть использованы также при производстве каучука, резины, фармацевтических препаратов, косметики, мыла, олиф, в процессах флотации руд и др. Наконец, как показали эксперименты, дрожжевые липиды могут найти большое применение в кормлении сельскохозяйственных животных и птиц. В этом случае из схемы производства липидов исключается процесс их экстракции из клеток — для кормовых целей используется богатая жиром биомасса микроорганизмов.

После второй мировой войны значительное число работ было направлено на изыскание возможности получения микробных липидов для пищевых целей. Шведский исследователь Лундин показал, что богатый физиологически необходимыми жирными кислотами дрожжевой жир (*Rhodotocula gracilis*) может с успехом использоваться кроме технических и на пищевые нужды. Рацион из 25 г жировых дрожжей может обеспечить организм человека 10 г липидов, 6 г белка и многими другими необходимыми веществами, что на 20 % удовлетворяет дневную потребность в этих соединениях.

Производство микробного жира для пищевых целей уже имело место в Германии во время первой мировой войны. В качестве питательной среды использовали мелассу или другие сахаросодержащие субстраты, продуцентом служил дрожжеподобный гриб *Endomycopsis vernalis*. В пищу использовали богатую жиром биомассу, из которой готовили пасту, известную под названием «Эвернал» или «Мицета».

Комбинируя питательные среды, а также подбирая продуцент и условия его культивирования, можно получать липиды, по составу отвечающие требованиям различных отраслей промышленности и сельского хозяйства. Например, при кормлении птиц предпочтение отдается липидам, содержащим до 65—70 % ненасыщенных жирных кислот. Микробные липиды, содержащие значительное количество жирных кислот с двумя двойными связями, возможно использовать для приготовления лаков и красок, а также для приготовления медицинских препаратов, способствующих предотвращению атеросклероза и тромбоза. Липиды с преобладанием насыщенных жирных кислот можно употреблять на производство технических смазок. В первых случаях таким требованиям отвечают липиды мицелиальных грибов и дрожжей *Lipomyces lipoferus*, а во втором — липиды *Candida humicola*, выращенных на гидролизате древесины.

Резюмируя сказанное, следует отметить, что состав липидов (а отсюда и область их возможного использования) в большой мере обусловлен систематическим положением организма-продуцента. В то же время соотношение отдельных компонентов в составе липидов определяется спецификой используемого сырья и физико-химическими условиями культивирования. Эти законо-

мерности липидогенеза весьма существенны при организации промышленного производства микробного жира, так как в конкретных условиях позволяют получать продукт строго определенного состава и свойств. Такой управляемый микробный синтез может удовлетворить требованиям, предъявляемым к липидам различными отраслями народного хозяйства.

## Глава 20 ПОЛИСАХАРИДЫ

Полисахариды (или гликаны) — полимеры, построенные не менее чем из 11 моносакхаридных единиц. Они могут состоять из одного или нескольких типов моносакхаров. Соответственно различают гомополисахариды и гетерополисахариды. Полисахариды — обязательные компоненты всех организмов, составляют большую часть углеводов, встречающихся в природе, преобладающую долю в биомассе растений, а следовательно, и основную массу органического вещества на Земле.

Полисахариды встречаются в виде самостоятельных полимеров, а также в комплексах с нуклеиновыми кислотами, белками, липидами, фосфатом. Разнообразны они по мономерному составу и структуре. Особым разнообразием отличаются полисахариды микроорганизмов. Некоторые из них близки или идентичны полисахаридам растений и животных. Но подавляющее большинство микробных полисахаридов имеет уникальную структуру, специфическую для вида или для серологической группы вида. В микробных гликанах часто обнаруживаются ранее неизвестные моносакхара, которые не встречаются ни у животных, ни у растений.

О том, что слизь, образуемая многими микроорганизмами, может иметь углеводную природу, знали еще во времена Пастера. Однако особое внимание микробным полисахаридам стали уделять лишь с начала 20-х годов нашего столетия, когда узнали, что вещества, определяющие серологическую специфичность пневмококков, являются полисахаридами. В настоящее время исследование микробных полисахаридов приобрело особое значение в связи с открывшейся возможностью широкого применения их в медицине и ряде областей народного хозяйства.

Полисахариды микроорганизмов в соответствии с локализацией делятся на внутриклеточные и внеклеточные. К внутриклеточным относят обычно полисахариды цитоплазмы, мембран и клеточных стенок, а к внеклеточным — полисахариды капсул, чехлов (пристеночные структуры) и свободной слизи, не прилегающей к клеточной стенке. Иногда к внеклеточным относят также полисахариды, локализованные снаружи от цитоплазматической мембраны. В этом случае в группу внеклеточных попадают и полисахариды клеточных стенок. У ряда микроорганизмов действительно трудно различить границу между капсулой и клеточной стенкой.

Нередко по локализации выделяют три группы полисахаридов: внутриклеточные (цитоплазмы, мембран, периплазмы), полисахариды клеточных стенок и внеклеточные (капсул, чехлов и свободной слизи).

Термин «экзогликаны» применяют в основном к полисахаридам свободной слизи. Иногда экзогликанами называют также капсульные полисахариды.

Микробные полисахариды объединяют в группы и по функциям: резервные, участвующие в активном транспорте, опорные, участвующие во взаимодействии между клетками, защитные и др.

Некоторые исследователи классифицируют полисахариды, учитывая их топологию и функции. В соответствии с этим клеточные полисахариды подразделяются на две группы. Одна включает резервно-энергетические и модификаторы (внутриклеточные), вторая — структурные и структурно-метаболические (в клеточной стенке). К внеклеточным относятся выделяющиеся при гиперпродукции структурно-метаболические гликаны и собственно экзогликаны.

#### **20.1. ПОЛИСАХАРИДЫ ЦИТОПЛАЗМЫ И МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР**

Полисахариды цитоплазмы обнаруживаются в двух формах: они могут быть диспергированы в ней или объединены в гранулы. Обычно в цитоплазме бактерий содержится 20—30% полисахаридов, а в условиях, способствующих их накоплению, до 50—60% от массы сухих клеток. Чаще всего в цитоплазме микроорганизмов обнаруживают гомогликаны, из которых особенно распространены глюканы типа гликогена. Их выделяли из цитоплазмы многих прокариотных и эукариотных микроорганизмов: представителей разных родов бактерий *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Nostoc*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Streptococcus*, а также дрожжей, мицелиальных грибов, ресничных и жгутиковых простейших, некоторых водорослей. Кроме гликогеноподобных полисахаридов в цитоплазме ряда микроорганизмов найдены крахмал, маннаны, леваны, арабаны и ксиланы. Гликоген и другие гомогликаны цитоплазмы могут образовывать комплексы с ДНК, РНК, белками, липидами, фосфатом. Гетерополисахариды обнаруживаются в цитоплазме реже. Однако у представителей *Streptomyces* и *Mycobacterium* они оказываются преобладающими.

Функции полисахаридов цитоплазмы до конца не выяснены. До недавнего времени считали, что основное или даже единственное их назначение — быть резервным источником углерода и энергии для клетки. Они расходуются, например, при созревании эндоспор у бактерий родов *Bacillus* и *Clostridium*. Но теперь ясно, что полисахариды цитоплазмы могут выполнять ряд других важных функций. Предполагается, что комплексы гомогликанов с другими компонентами цитоплазмы участвуют в

механизмах клеточной регуляции, контролирующих синтез различных веществ, рост и деление клеток. Так, гликогенрибосомные комплексы, возможно, контролируют синтез белков. Гликоген может оказывать радиозащитное действие на связанные с ним молекулы нуклеиновых кислот.

В мембранах микроорганизмов обнаруживается в среднем от 2 до 5%, иногда (у *Micrococcus luteus*) до 15—20% углеводов от массы мембраны. Возможно, в некоторых случаях эти углеводы полностью или частично представляют собой остаточный материал цитоплазмы или клеточных стенок. Тем не менее достоверно показано, что в мембранах грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий содержатся гликолипиды и гликопротеины.

Все грамположительные эубактерии, за исключением микрোকков и некоторых стрептококков, а также дрожжи и мицелиальные грибы содержат в области цитоплазматической мембраны тейхоевые кислоты (1—2% от сухой биомассы). Тейхоевые кислоты относят к кислым полисахаридам необычного строения. При их гидролизе наряду с моносахаридами образуются вещества, относящиеся к другим классам соединений. Разнообразие тейхоевых кислот определяется в основном числом присутствующих в них остатков сахаров и наличием связей различных типов. Мембранные тейхоевые кислоты — это всегда глицерофосфатные полимеры, часто связанные с гликолипидами и фосфолипидами (липотейхоевые кислоты). У некоторых микроорганизмов выявляются только липотейхоевые кислоты, а свободных тейхоевых кислот нет. В мембранах грамотрицательных бактерий тейхоевые кислоты не обнаружены.

Мембранные гликолипиды участвуют в биосинтезе полисахаридов и транспорте сахаров. Тейхоевые кислоты, видимо, регулируют ионный обмен (связывают двухвалентные катионы, что необходимо для нормального функционирования ферментов, локализованных в мембране), действуют на связывание аминокислот с тРНК, осуществляют связь между мембраной и клеточной стенкой, проявляют антигенную активность.

## 20.2. ПОЛИСАХАРИДЫ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК

У грамположительных эубактерий полисахариды составляют от 30 до 60% сухой массы клеточной стенки. Значительная их часть входит в состав муреинового комплекса, количество которого у грамположительных эубактерий достигает 50—90% веществ клеточной стенки. Линейные полисахаридные цепи муреина построены из повторяющихся  $\beta$ -1,4-связанных единиц N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. Мурамовая кислота — производное глюкозамина, содержащее D-молочную кислоту.

Клеточные стенки некоторых архебактерий, дающих положительную окраску по Граму, содержат псевдомуреин, гликано-

вая часть которого состоит из N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина и N-ацетилталозаминуруновой кислоты. Мурамвая кислота в псевдомуреине не найдена. У ряда грамположительных археобактерий клеточная стенка построена только из кислого гетерополисахарида, в состав которого входят галактозамин, нейтральные сахара и уроновые кислоты. В клеточных стенках подавляющего большинства грамположительных эубактерий, за исключением микобактерий и коринебактерий, содержатся тейхоевые кислоты. Их количество обычно достигает 50—90% от массы клеточной стенки, у стрептомицетов оно колеблется от 4 до 50%. Как правило, у микроорганизмов обнаруживается либо глицеринтейхоевая, либо рибиттейхоевая кислота. Однако у *Streptococcus faecalis* и у одного штамма *Streptomyces* sp. найдены тейхоевые кислоты обоих типов.

Другие полисахариды, содержащиеся в клеточных стенках грамположительных бактерий, отличаются большим разнообразием; чаще всего это гетерогликаны. В их составе обнаруживаются нейтральные моносахара, аминоксахара, уроновые кислоты, ацетильные группы, остатки фосфорной кислоты.

Клеточные стенки грамотрицательных бактерий содержат от 1 до 50% полисахаридов. Среди них полисахариды муреинового комплекса не занимают доминирующего положения, так как его количество составляет в среднем всего около 5% веществ клеточной стенки. Тейхоевые кислоты обнаруживаются только у отдельных представителей грамотрицательных бактерий.

Особенно характерны для клеточных стенок грамотрицательных бактерий липополисахариды (ЛПС) — биологически активные вещества, участвующие в формировании наружной мембраны. Число различных липополисахаридов велико и, несмотря на интенсивное изучение, строение и состав многих из них известны не до конца. В полисахаридной части комплекса различают базисную структуру и O-специфические боковые цепи. Моносахаридный состав, варьирование связей и структура их в основном и определяют биологическую активность липополисахаридов, выполняющих функцию соматических антигенов. Углеводный компонент липополисахарида — это обычно гетерополисахарид. У различных бактерий в его составе обнаружены нейтральные сахара, аминоксахара, уроновые кислоты, метильные и ацетильные группы и, что особенно характерно, 3,6-дидезоксипроизводные сахаров, которые в других природных объектах встречаются редко. Из них наиболее распространены абеквоза (3,6-дидезокси-D-галактоза), колитоза (3,6-дидезокси-L-галактоза), тивелоза (3,6-дидезокси-D-манноза), аскарилоза (3,6-дидезокси-L-манноза) и паратоза (3,6-дидезокси-D-глюкоза). Эти сахара часто определяют серологическую специфичность бактерий. В O-специфической боковой цепи липополисахарида одного из видов рода *Pasteurella* обнаружена 6-дезокси-D-манногептоза — первая 6-дезоксигептоза, найденная в природе. Моносахариды особого типа — гликолактиловые кислоты — выявлены в составе O-анти-

генных полисахаридов представителей рода *Shigella*. Полисахаридные компоненты ЛПС ряда бактерий отличаются сложностью. Они могут содержать до 6 и более различных незамещенных и замещенных моносахаров. У энтеробактерий молекулы ЛПС могут образовывать комплексы с пептидогликаном, кислыми капсульными гликанами и другими гетерополисахаридами клетки.

Полисахариды — главные компоненты клеточной стенки дрожжей и мицелиальных грибов. Они могут составлять до 90% массы клеточной стенки (*Saccharomyces cerevisiae*). У дрожжей часто обнаруживаются гомогликаны: глюканы, маннаны, хитин (полимер N-ацетилглюкозамина). В дрожжевых маннанах нередко содержатся остатки фосфорной кислоты и (или) метильные группы, а в глюканах — ацетильные и аминогруппы. У многих дрожжей в клеточной стенке обнаруживаются гетерополисахариды — галактоманнаны и глюкоманнаны, а также кислые гликаны, построенные из 3—4 мономеров. По-видимому, в клеточных стенках дрожжей присутствует несколько полисахаридов. Гликаны клеточных стенок дрожжей могут быть связаны с пептидами.

Основным полисахаридным компонентом клеточных стенок большинства исследованных мицелиальных грибов является хитин. Обнаруживаются также неацетилированный или частично ацетилированный полимер глюкозамина — хитозан, глюканы (иногда целлюлоза), галактаны и различные гетерополисахариды, включающие незамещенные и замещенные сахара, уроновые кислоты.

Структурные микрофибриллы клеточных стенок большинства микроформ водорослей состоят из целлюлозы, а у отдельных представителей — из других гомополисахаридов, часто из ксиланов и маннанов. Количество их может достигать 50—80% массы сухой клеточной стенки. Полисахариды матрикса представлены в основном гетерогликанами. Обнаруживаются и сульфатированные полисахариды.

Полисахариды клеточных стенок выполняют разнообразные функции. Многие из них определяют механическую прочность клеточных стенок. Поэтому их часто называют «скелетными». Липополисахариды, тейхоевые кислоты, а также гетерополисахариды ряда грамположительных бактерий ответственны за антигенную активность клеток. ЛПС значительного числа грамотрицательных бактерий — токсины. ЛПС энтеробактерий защищают клетки от ингибирующего действия длинноцепочечных жирных кислот, позволяя этим бактериям выживать в кишечнике животных. С наличием O-специфических боковых цепей ЛПС связана способность шигелл прикрепляться к надмембранному покрову эпителиальных клеток. Многие полисахариды определяют устойчивость бактерий к литическим ферментам и фагам. Полианионные полисахариды способствуют транспорту из клетки заряженных метаболитов и веществ, поступающих в нее из окружающей

среды. Кроме того, такие полисахариды сообщают клетке отрицательный заряд, в результате чего происходит взаимное отталкивание клеток, диспергирование их в среде. Потеря О-боковых цепей ЛПС снижает гидрофильность клеток и приводит к их спонтанной агглютинации. Полисахариды клеточных стенок микроорганизмов, растущих на средах с *n*-алканами, обычно являются хорошими эмульгаторами и тем самым способствуют проникновению углеводов в клетку.

### 20.3. ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ

Внеклеточные полисахариды, как уже отмечалось, обнаруживаются в виде капсул и чехлов, прилегающих к клеточным стенкам, а также свободной слизи. Капсулы, имеющие толщину менее 0,2 мкм, не различимы в световом микроскопе, но хорошо видимы в электронный микроскоп, называют микрокапсулами. Микрокапсулы обычно связаны с клеточной стенкой прочнее, чем капсулы. У многих микроорганизмов капсулы имеют определенную структуру и четко ограничены от слизи. У некоторых бактерий капсульный материал рыхлый, бесструктурный, легко отторгается от клеток, поэтому границу между капсулой и свободной слизью в этом случае определить трудно. Такие аморфные капсулы называют слизистыми слоями. Чехлы в отличие от капсул имеют сложную структуру. В них нередко различают несколько слоев с разным строением. Количество внеклеточных полисахаридов может во много раз превышать биомассу клеток.

Капсулы, чехлы и слизь не всегда состоят только из полисахаридов. Они могут кроме гликанов включать белки, полипептиды, нуклеиновые кислоты, липиды, образующие или не образующие комплексы с полисахаридами. Как правило, чехлы имеют более сложный химический состав. Так, у *Sphaerotilus natans* они содержат глюкозу, глюкозамин, белок, липид и фосфат. Чехлы бактерий, окисляющих восстановленные соединения металлов, часто содержат включения их окислов. Иногда неуглеводные полимеры — единственные компоненты капсул и слизи. Так, капсулы некоторых видов рода *Bacillus* построены из полипептида, слизь некоторых штаммов *Pseudomonas aeruginosa* состоит из ДНК.

Внеклеточные полисахариды, капсульные или свободные, или те и другие, образуют многие микроорганизмы. Пожалуй, нет такой группы микроорганизмов, представители которой не обладали бы этой способностью. Однако синтез внеклеточных полисахаридов — не обязательная функция клетки и проявляется она лишь в определенных условиях. Встречаются микроорганизмы, у которых никогда не удавалось наблюдать ни капсул, ни слизи.

Внеклеточные полисахариды микроорганизмов чрезвычайно разнообразны по составу и строению. К настоящему времени исследован состав около 200 экзогликанов, установлены первич-



ная структура и детали строения многих из них. В составе внеклеточных полисахаридов различных микроорганизмов обнаружено более 20 моносахаров и их производных. Наиболее часто встречаются гексозы: глюкоза, галактоза, манноза и 6-дезоксигексозы: фукоза и рамноза. Реже выявляются пентозы: арабиноза, ксилоза, рибоза. Распространены уроновые кислоты: галактуроновая, маннуриновая и особенно глюкуроновая. Многие содержат аminosахара: глюкозамин, галактозамин и маннозамин. Часто в экзогликанах присутствуют неуглеводные заместители — пируват и ацетат, встречаются также сукцинат и глицерин. Для ряда внеклеточных гликанов характерно наличие редких мономеров: 2,6- или 3,6-дидезоксисахаров, у некоторых найдены ранее неизвестные моносахариды, например гликолактиловые кислоты (у сапротрофных микобактерий). Иногда обнаруживаются тейхоевые кислоты, фосфатные и сульфатные ионы.

Внеклеточные полисахариды большинства видов бактерий — кислые гетерогликаны разнообразного состава, построенные из 2—5, иногда 6—7 мономеров, линейные и разветвленные, имеющие регулярную структуру из повторяющихся олигосахаридных звеньев. Так, например, *Xanthomonas campestris* синтезирует полианионит ксантан, включающий глюкозу, маннозу, глюкуроновую кислоту и О-ацетильную группу и пируват.

Некоторые бактерии образуют нейтральные гетерополисахариды.

Весьма распространены у микроорганизмов различные гомополисахариды, особенно глюканы, из которых наиболее известны декстраны (группа более или менее близких по строению нейтральных глюканов). Они могут содержать до 200 000 остатков глюкозы, бывают линейными и разветвленными. Линейная (основная) цепь построена при участии  $\alpha$ -1,6-связей, ветвление обусловлено  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3- и  $\alpha$ -1,4-связями. Молекулярная масса декстранов колеблется от 12 до 600 млн. Наиболее активные продуценты декстранов — представители молочнокислых бактерий *Leuconostoc mesenteroides* и *L. dextranicum*. Декстраны синтезируются также некоторыми видами *Streptococcus* (*Str. sanguis*, *Str. mutans*), *Brevibacterium*, *Lactobacillus*. Практически каждый продуцент синтезирует свой, несколько отличный от других видов декстран. Некоторые штаммы образуют одновременно два различных по структуре декстрана.

Внеклеточную целлюлозу — полисахарид, распространенный в растениях, из бактерий синтезируют некоторые представители *Pseudomonas*, *Zooglea*, *Azotobacter*, подавляющее число видов *Rhizobium* и *Agrobacterium*, *Acetobacter xylinum*.  $\beta$ -(1→3)-Глюкан, называемый курдланом, образуют *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* и виды *Rhizobium*. Сильно разветвленный  $\alpha$ -(1→4)-глюкан с боковыми цепочками, присоединенными  $\alpha$ -(1→6)-связями, — полимер типа гликогена, резервного полисахарида животных, многих бактерий и дрожжей — можно обнаружить в культуральной жидкости *Neisseria perflava*. Нигеран —

$\alpha$ -глюкан с чередующимися (1 $\rightarrow$ 4)- и (1 $\rightarrow$ 3)-связями — образует гриб *Aspergillus niger*.

Разветвленные полимеры фруктозы — леваны с (2 $\rightarrow$ 6)-связями — синтезируют уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti*, некоторые виды *Pseudomonas*, *Erwinia* (подгруппы «*herbicola*»), *Aeromonas*, *Bacillus*. Фруктаны типа инулина (резервный полисахарид растений семейства сложноцветных) с (2 $\rightarrow$ 1)-связями в основной цепи и ответвлениями в положении C6 образуют штаммы *Str. mutans*.

Маннаны обнаружены в культурах некоторых видов *Bacillus* и *Corynebacterium*, а также у многих дрожжей.

Чаще всего микроорганизмы, способные к образованию внеклеточных полисахаридов, синтезируют капсулы и свободную слизь. Мономерный состав слизи и капсул в большинстве случаев одинаковый.

Но не всегда можно определить, какие именно полисахариды свойственны той или иной группе микроорганизмов. В ряде случаев филогенетически близкие бактерии синтезируют внеклеточные гликаны, сходные по составу и строению. К ним относятся, например, бактериальный альгинат *Pseudomonas aeruginosa* и *Azotobacter vinelandii*, курдлан *Rhizobium* и *A. faecalis* var. *myxogenes*, кислые гетерогликины *Corynebacterium* и *Arthrobacter*, декстраны *Streptococcus* и *Lactobacillus* и др. Однако нередко микроорганизмы, далеко отстоящие в таксономическом отношении, образуют гликаны сходного состава или одинаковые. Обычно в этом случае полимеры проявляют и функциональное сходство. Так, очень близки по составу экзогликаны различных фитопатогенных бактерий и возбудителей менингита. У ряда бактерий цементирующим материалом при образовании клеточных агрегатов служит внеклеточная целлюлоза.

Известно, что не только разные виды одного рода микроорганизмов, но часто и разные штаммы одного вида синтезируют неодинаковые экзополисахариды. Так, *E. coli* имеет около 70 серотипов, различных по составу и структуре капсульных полисахаридов и, соответственно, по иммунохимическим свойствам. Экзогликаны эффективных и неэффективных штаммов клубеньковых бактерий различаются по мономерному составу, а разных штаммов дрожжей рода *Lipomyces* — по соотношению моносахаров. Неодинаковыми по моносахаридному составу могут быть внеклеточные гликаны M-, S- и R-форм бактерий.

Отмечены случаи, когда в культуральной жидкости одного микроорганизма накапливается несколько различных гликанов. Например, *L. mesenteroides* образует декстран и леван, у *Serratia marcescens* обнаружено три экзополисахарида: кислый глюкорамнан, содержащий глюкуроновую кислоту, рамноглюкан и гептоглюкан. Гриб *Aureobasidium (Pullularia) pullulans* образует два гомоглюкана: аубазидан — разветвленный полимер с  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) и  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-связями, причем в боковой цепи может быть от одного до четырех остатков глюкозы на одно звено

триозы, и пуллулан — линейный глюкан, состоящий из мальто-триозных и мальтотетраозных фрагментов, соединенных  $\alpha$ -(1→6)-связями.

Внеклеточные полисахариды не являются жизненно необходимыми для микроорганизмов. В природе есть виды, никогда их не образующие. Экспериментально показано, что клетки, лишенные капсул, столь же жизнеспособны, как и капсулированные. Тем не менее внеклеточные полисахариды выполняют определенные функции, способствующие поддержанию условий, благоприятных для жизнедеятельности продуцента. Одни из них — универсальны для всех полисахаридов, поскольку определяются общими для этих веществ свойствами, другие — специфичны для определенного полисахарида, что обусловлено особенностями состава и строения данного полимера.

Внеклеточные полисахариды предохраняют клетки от высыхания, от губительного действия ультрафиолетовых лучей и различных химических агентов, в том числе тяжелых металлов и лекарственных препаратов. Замечено, что капсулированные бактерии устойчивее к химиотерапевтическим средствам, чем бескапсульные варианты. Располагаясь поверхностно, капсулы защищают клетки от бактериофагов и поглощения их простейшими, предупреждают денатурацию клеточного белка.

Многие внеклеточные гликаны биологически активны и определяют иммунологические свойства и вирулентность штаммов. Как правило, чем толще капсула, тем выше вирулентность и патогенность бактерий. Некоторые патогенные бактерии, лишенные капсул, становятся авирулентными. К-антигены являются агрессивными, подавляющими фагоцитоз бактерий и тем создающими условия для их размножения.

Одно из характерных проявлений биологической активности полисахаридов — способность модифицировать ферменты различных организмов, в результате чего стимулируется или снижается их активность. Экзополисахариды фитопатогенных бактерий являются фитотоксинами, участвующими в специфическом взаимодействии бактерий с растительной тканью. К ним относится, например, ксантан.

В некоторых случаях внеклеточные гликаны служат резервным источником углерода и энергии, а азотсодержащие полисахариды — источником азота для продуцента. Полианионные полисахариды концентрируют катионы из окружающей среды и способствуют транспорту их в клетку. Полисахаридно-липидные комплексы микроорганизмов, растущих на средах с *n*-алканами: псевдомонад, нокардий, коринебактерий, дрожжей — хорошие эмульгаторы. Они снижают поверхностное натяжение, увеличивают поверхность соприкосновения углеводорода и воды, образуют мицеллы и тем самым способствуют проникновению углеводов в клетку.

Нейтральные внеклеточные полисахариды поддерживают целостность нитчатых форм и различных скоплений клеток. Поли-

сахариды, несущие определенный заряд, напротив, способствуют диспергированию клеток. Экзогликаны некоторых бактерий ответственны за прикрепление клеток к поверхности. Так, *Str. mutans*, вызывающий кариес зубов, прикрепляется к зубной эмали с помощью декстрана.

#### 20.4. БИОСИНТЕЗ ПОЛИСАХАРИДОВ

Биосинтез гликанов сводится к созданию гликозидной связи между моносахарами. В общем виде это можно представить так: гликозильный донор передает гликозил на акцептор-затравку, а сам высвобождается (рис. 20.1). Полимеризация идет вплоть до образования готового полисахарида. Процесс катализируется специфическими гликозилтрансферазами, а ветвление полимеров — другими, «ветвящими», гликозилтрансферазами, отщепляющими фрагменты линейной цепи недостроенного полисахарида и переносящими их на ту же или аналогичную цепь в определенное положение (рис. 20.2).

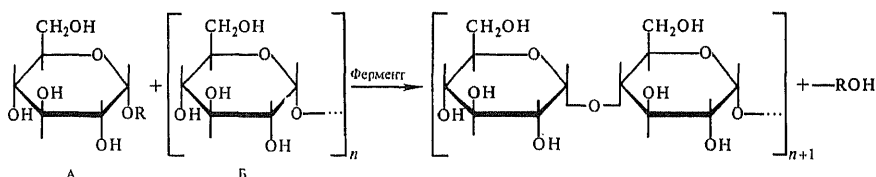


Рис. 20.1. Схема образования гликозидной связи. А — донор; Б — акцептор

В случае биосинтеза гетерополисахаридов существует две возможности: либо регулируемое чередование различных мономерных единиц, либо предварительный синтез ди- и олигосахаридов, которые остаются присоединенными к донору, а затем полимеризуются.

Акцепторами при биосинтезе полисахаридов выступают олигосахара и недостроенные гликаны. Первичными акцепторами часто бывают олигосахара. Это имеет место, например, в случае синтеза декстранов и леванов (сахароза), целлюлозы (целлодекстрины), хитина (хитодекстрины). Иногда первичным акцептором может быть, по-видимому, только недостроенный полисахарид — «затравка».

Доноры моносахаридного остатка имеют различную природу.

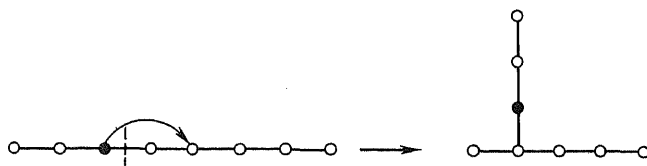


Рис. 20.1. Схема образования разветвленных полисахаридов

Изредка это олигосахара. Так, при биосинтезе декстранов и леванов донором может быть сахароза. Но в большинстве случаев сахара-доноры должны находиться в активированной форме. Активирование мономерных единиц происходит при помощи нуклеозидтрифосфатов с образованием нуклеозиддифосфатсахаров (НДФС), которые признаны наиболее распространенными и универсальными донорами гликозильных остатков. Так, в биосинтезе целлюлозы *Acetobacter xylinum* участвует уридиндифосфатглюкоза, в биосинтезе хитина *Neurospora crassa* — уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин, маннана дрожжей — гуанозиндифосфатманноза. Очевидно, что в биосинтезе гетерополисахаридов принимает участие несколько доноров соответствующих гликозильных остатков. Взаимопревращения моносахаридов происходят на уровне НДФС. Они осуществляются специальными ферментами. В случае нехватки каких-либо ферментов одно из звеньев биосинтеза полисахарида блокируется; образуется дефектный полимер или он не образуется вовсе. НДФС могут передавать не только моносахаридные, но, по-видимому, и олигосахаридные остатки.

Обязательными компонентами цепи биосинтеза полисахаридов у многих микроорганизмов являются, наряду с НДФС, и другие активированные сахарные интермедиаты — гликозилнесущие липиды. По строению это полиизопренолфосфатсахара. У большинства прокариот преобладают полипренольные носители с 11 изопреноидными остатками — ундекапренолы ( $C_{55}$ ), у микобактерий имеются переносчики с 10 остатками ( $C_{50}$ ). Полипренолы эукариот более высокомолекулярны. Например, *Sacch. cerevisiae* содержит 16—18, а *Asp. niger* — 19—21 изопреноидных остатков. У микроорганизмов содержатся полипренолмонофосфатсахара и полипренолпирофосфатсахара; последних больше.

Количество гликозилнесущих липидов составляет всего десятые доли процента от массы клетки. Однако роль их важна и многообразна. Они могут быть промежуточными переносчиками моно- или олигосахаридных остатков, принимая их от НДФС и передавая акцептору — строящемуся полисахариду. Полипренолмонофосфатсахара присоединяют и переносят, как правило, только моносахаридный остаток, а полипренолпирофосфатсахара — ди-, три- и тетрасахаридные звенья. В некоторых случаях перенос моно- и олигосахаридных остатков к акцептору происходит с изменением конфигурации гликозидной связи. На полипренолпирофосфатах может начинаться первичная сборка полисахаридной цепи. Первая стадия этого синтеза — построение олигосахарида с участием НДФС, а затем происходит полимеризация олигосахаридных компонентов, из которых начальный сохраняет связь с липидом, а остальные передаются акцептору. Гликозилнесущие липиды участвуют и в транспорте сахаров на внешнюю сторону мембраны и в клеточную стенку. НДФС не способны проходить через мембраны.

Считают, что биосинтез полисахаридов во многих случаях

может осуществляться только за счет НДСФ, но в реакциях, идущих на поверхности раздела между водной и липидной фазой мембраны, необходимо участие гликозилнесущих липидов.

Предполагается, что остатки органических кислот включаются в молекулу полисахарида в соответствующей коферментной форме. Однако есть мнение, что в гликан может встраиваться только пируват, который уже в молекуле полимера модифицируется в остаток определенной кислоты.

Вопрос о месте биосинтеза ряда полисахаридов, особенно внеклеточных, до конца не решен. Биосинтез многих гликанов связан с определенными структурами клетки, так как соответствующие ферменты, НДСФ и гликозилнесущие липиды локализованы в области цитоплазматической мембраны. Обнаруживаются они и во фракциях клеточных стенок. Однако существуют и внеклеточные ферментные полисахаридсинтезирующие системы. Это декстран- и левансахаразы большинства микроорганизмов, образующих соответствующие полисахариды. Хотя указанные ферменты не всегда целиком выделяются из клетки (у *Gluconobacter oxydans* в культуральной жидкости обнаруживается около 80% левансахаразы), сборка декстранов и леванов в значительной степени идет вне клетки. Но синтез большинства известных экзополисахаридов имеет внутриклеточную локализацию. Для экзогетерогликанов внеклеточный синтез вообще неизвестен. О том, в каком участке клетки происходит сборка полимера и как он выводится наружу, имеется несколько предположений. Согласно одному из них полимеризация гликана может завершаться на внешней стороне цитоплазматической мембраны, а выделение его наружу, вероятно, происходит через поры клеточных стенок. По другой гипотезе полисахарид образуется внутри находящихся в цитоплазме мембранных пузырьков, а затем с их помощью выносится из клетки обратным пиноцитозом. Если соответствующие ферменты локализованы на периферии клетки, то внеклеточные полисахариды иногда рассматриваются как результат сверхсинтеза гликанов клеточной стенки. Очевидно, что в этом случае полисахариды клеточной стенки и внеклеточные должны быть идентичны. Однако наблюдается это редко.

Полисахариды капсул и свободной слизи, одинаковые по составу и структуре, имеют, по-видимому, общее происхождение. Полагают, что при этом слизь образуется в результате отторжения капсульного материала.

Модель синтеза экзополисахаридов у бактерий, основанная на изучении этого процесса у *Klebsiella aerogenes* и родственных видов, представлена в табл. 20.1.

## 20.5. УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И БИОСИНТЕЗ ПОЛИСАХАРИДОВ

Среда обитания микроорганизмов часто определяет количественный выход, мономерный состав, структуру и молекулярную массу полисахаридов, а нередко — и самую возможность их био-



синтеза. Изменение условий культивирования сказывается в первую очередь на образовании внеклеточных и запасных цитоплазматических гликанов. Количество и состав структурных полисахаридов отличаются сравнительным постоянством. Вследствие большого разнообразия микробных гликанов и физиолого-биохимических особенностей их продуцентов значимость одного и того же фактора для образования различных полисахаридов не всегда одинакова.

### 20.5.1. Состав питательной среды

**Источник углерода.** Большинство микроорганизмов синтезирует полисахариды из всех источников углерода, обеспечивающих их рост: углеводов, спиртов, карбоновых кислот, аминокислот, углеводородов,  $C_1$ -соединений. В настоящее время особое внимание привлекает возможность образования микроорганизмами полисахаридов на средах с углеводородами и  $C_1$ -соединениями. На средах с *n*-алканами экзополисахариды синтезируются многими представителями артробактерий и сапротрофных микобактерий, некоторыми коринебактериями, дрожжами рода *Candida*. Ряд метилотрофных бактерий образует значительные количества внеклеточных полисахаридов при росте на средах с метанолом. *Methylococcus capsulatus* образует полисахаридные капсулы и при использовании метана.

Помимо микроорганизмов, синтезирующих полисахариды на средах с любым источником углерода, допускающим рост, встречаются организмы, образующие гликаны лишь при использовании некоторых из них. Например, *Leuconostoc mesenteroides* может расти, потребляя различные углеводы, но синтезирует декстран только на средах с сахарозой.

Природа соединения углерода и его концентрация могут влиять на количественный выход полисахаридов. Так, наиболее высокий выход экзогликана в культурах некоторых микобактерий наблюдается в среде с гексадеканом, хотя биосинтез полимера возможен на средах с другими углеводородами, сахарами и многоатомными спиртами. В ряде случаев для максимального образования полисахарида требуется более высокая концентрация источника углерода в среде, чем для наивысшего накопления биомассы. В условиях периодического культивирования синтезу полисахаридов обычно благоприятствует создание избытка углерода в среде при некотором дефиците азота и фосфора. Однако стимуляция биосинтеза экзогликанов повышением содержания углеродного субстрата в среде возможна лишь до определенного предела, сверх которого положительный эффект не проявляется, а в некоторых случаях наблюдается угнетение процесса. При культивировании в хемостате некоторые микроорганизмы образуют внеклеточные гликаны даже при лимитации углеродным субстратом.

Моносахаридный состав гликанов микроорганизмов не меня-



ется в зависимости от источника углерода, варьируют только состав и соотношение неуглеводных компонентов. Если же микроорганизм синтезирует более одного экзогликана, изменение углеродного субстрата часто ведет к преимущественному синтезу одного из полимеров. Например, соотношение аубазидана и пуллулана в культуре *A. pullulans* сильно различается на средах с разными сахарами. Изменение концентрации источника углерода может регулировать скорость синтеза полисахаридов и их молекулярную массу.

**Источник азота.** Образование полисахаридов возможно, как правило, при использовании источников азота, способных поддерживать активный рост продуцента. Но природа источника азота может, не изменяя рост микроорганизма, влиять на количественный выход гликанов. Существуют микроорганизмы, для роста которых предпочтительнее один источник азота, а для биосинтеза полисахарида — другой. Повышенные концентрации азота в среде, как правило, отрицательно сказываются на синтезе полисахаридов. Качественный состав гликанов, по-видимому, не зависит от источников азота.

**Другие компоненты среды.** На биосинтез полисахаридов могут влиять и другие необходимые для роста микроорганизмов компоненты среды. Большое значение для образования гликанов имеет фосфор. Повышенное содержание фосфора в среде тормозит синтез многих полисахаридов. Но увеличение концентрации фосфора до определенных пределов способствует накоплению левана *G. oxydans*.

Важное значение имеют различные ионы, необходимые для поглощения субстрата или в качестве кофакторов биосинтеза полисахаридов. Катионы железа оказывают положительное действие на продукцию полисахаридов *Pseudomonas aeruginosa* и *Methylomonas mucosa*, на выделение в среду левансахаразы *G. oxydans*. Ионы марганца необходимы для образования глюкана *Rhizobium japonicum* и маннана *Sacch. cerevisiae*. Магний способствует синтезу разветвленных декстранов *L. mesenteroides*. Концентрация ионов кальция в среде определяет соотношение маннурановой и гулурановой кислот в экзополисахариде *A. vinelandii*.

Образование гликанов, как правило, не требует дополнительных количеств витаминов сверх необходимого для нормального роста продуцента. Стимуляция биосинтеза полисахаридов витаминными добавками наблюдается только в отдельных случаях.

## 20.5.2. Физико-химические факторы среды

**Кислотность среды.** Обычно существуют определенные границы pH, допускающие рост микроорганизмов и синтез полисахаридов; эти интервалы у разных микроорганизмов неодинаковы. У ряда представителей границы, а иногда и оптимальные зна-

чения рН для роста и образования гликанов совпадают, но в отдельных случаях они различаются. У некоторых микроорганизмов количество полисахаридов не меняется в зависимости от рН среды. Чаще же изменение кислотности среды влияет на выход гликанов, на количественное соотношение полисахаридов, если их образуется несколько (аубазидан и пуллалан в культуре *A. pullulans*), на их молекулярную массу. Например, увеличение рН среды от 5,0 до 8,0 способствует образованию высокомолекулярных фракций декстранов разными штаммами стрептококков, но мономерный состав гликанов при изменении рН среды, по-видимому, не меняется.

**Аэрация и температура.** Влияние аэрации и температуры на биосинтез полисахаридов очень разнообразно. Режимы аэрации и температуры, благоприятные для образования того или иного гликана, могут сильно различаться.

Большинство микроорганизмов, образующих экзогликаны, — аэробы или факультативные анаэробы, поэтому в условиях хорошей аэрации выход экзогликанов в культурах таких микроорганизмов выше. Однако избыточное аэрирование может угнетать их биосинтез вследствие быстрого окисления углеродного субстрата.

В отношении действия температуры также наблюдается определенная закономерность. Максимальное образование гликанов часто происходит при температуре ниже оптимальной для роста микроорганизмов. Так, количество декстрана в культуре *L. mesenteroides* увеличивается с уменьшением температуры с 30 до 10 °С. Но в некоторых случаях температурные оптимумы роста бактерий и образования ими экзогликанов совпадают.

Изменение температуры культивирования микроорганизмов иногда приводит к синтезу полисахаридов с измененными свойствами. Например, известен штамм стрептококков, синтезирующий при 22 °С внеклеточный полисахарид, отличающийся более высоким содержанием глюкозамина и иными иммунохимическими свойствами, чем гликан, образуемый при 37 °С.

## 20.6. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

В настоящее время полисахариды микроорганизмов достаточно широко используются в практике (табл. 20.2). Они находят применение в самых различных сферах человеческой деятельности: в медицине, фармацевтической, пищевой, химической и текстильной промышленности, в гидрометаллургии, при добыче нефти и в ряде других областей народного хозяйства. При этом внимание исследователей и практиков привлекают и внутриклеточные и внеклеточные гликаны, однако в технико-экономическом плане предпочтительнее последние — масштаб их производства и применения значительно шире.

Возможность и перспективность использования полисахаридов в медицине в значительной мере определяется их биологической активностью.

Т а б л и ц а 20.2. Практическое использование микробных гликанов

Область применения	Полисахарид	Используются	Перспективы
Иммуностимуляторы при лечении различных инфекционных и неинфекционных заболеваний, злокачественных новообразований	Декстраны	+	
	Зимозан	+	
	Продигиозан	+	
	ЛПС различных грамотрицательных патогенных бактерий	+	
	Парамилон (астазиан)	-	+
Плазмозаменители крови	Внеклеточные полисахариды различных бактерий	-	+
	Декстраны	+	
	Пуллулан	-	+
Антикоагулянты	Леваны	-	+
	Декстраны	+	
Диагностические средства	Хитин	-	+
	Липополисахариды сальмонелл	-	+
Профилактика и лечение атеросклероза	Гликаны дрожжей <i>Candida</i>	-	+
	Внеклеточный маннан <i>Rhodotorula rubra</i>	-	+
Получение вакцин	Внеклеточные гетерополисахариды <i>Neisseria meningitidis</i> групп А и С	-	+
	Декстраны	+	
Фармацевтическая промышленность	Аубазидан	+	
Пищевая промышленность	Ксантан	+	
	Экзополисахариды различных бактерий	+	+
Заменители агар-агара	Экзогликаны <i>Pseudomonas elodea</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	-	+
	Ксантан	+	
Стабилизаторы красок и защита их от высушивания	Занфло	+	
	Гетерополисахарид коринебактерий	-	+
Клеящие средства	Ксантан	+	
	Склероглюкан	-	+
	Внеклеточный гетерогликан <i>Methylobacillus methylophilus</i>	-	+
Нефтяная и газодобывающая промышленность	Ксантан	+	
	Пуллулан	+	
Гидрометаллургия	Гетерополисахарид <i>Methylobacillus</i>	-	+
	Ксантан	-	+
Очистка воды	Хитин	-	+
	Декстраны	+	
Препаративная химия	Маннаны	-	+
	Леваны	-	+
	Хитин	-	+
	Аубазидан	+	
Носители для иммобилизации ферментов	Курдлан	-	+
	Хитин	-	+
	Леваны	+	
Сельское хозяйство	Альгинат	+	

Многие микробные полисахариды обладают лечебным и профилактическим действием: повышают устойчивость организма к бактериальным и вирусным инфекциям, обладают противоопухолевой активностью, способствуют заживлению ран и регенерации тканей, благоприятно влияют на течение и исход воспалительных процессов, устраняют болевой синдром, снижают побочное действие лекарственных препаратов и рентгенотерапии. Лечебное и защитное действие полисахаридов определяется прежде всего их способностью повышать неспецифическую иммунобиологическую реактивность организма, влиять на различные защитные реакции, поддерживающие постоянство его внутренней среды. Преимущества многих полисахаридных препаратов перед другими средствами, повышающими неспецифическую резистентность организма, определяются тем, что они свободны от примесей, оказывающих нежелательное действие на организм. Некоторые микробные полисахариды уже нашли применение в лечебной практике различных клиник мира.

В нашей стране для лечения последствий травм и нарушений проводимости нервной системы, для предупреждения образования грубых рубцов пирогеналь или посттравматических рубцов успешно применяли пирогеналь — препарат, выделяемый из клеток *Salmonella typhi* и *Pseudomonas aeruginosa*. В ФРГ и США с этой же целью использовали липополисахариды, изолированные из различных патогенных бактерий. Бактериальные ЛПС обладают также и противолучевой активностью.

В клиниках Советского Союза уже более 20 лет применяют продигиозан — гетерополисахаридный комплекс с липидами, выделенный из клеток *Serratia marcescens*, и зимозан — препарат из оболочек клеток *Sacch. cerevisiae*, состоящий из глюкана, глюкоманнана и минорных количеств тейхоевых кислот. Эти препараты нормализуют ряд сдвигов в иммунобиологических реакциях, оказывают положительное действие при лечении опухолей, ряда инфекционных и неинфекционных заболеваний. Перспективны в качестве противоопухолевых агентов ЛПС ряда грамотрицательных бактерий, внутриклеточный глюкан парамилон (астазин) бесцветных фитофлагеллят *Astasia longa*, внеклеточные полисахариды различных дрожжей родов *Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Bullera* и др., бактерий родов *Alcaligenes* и *Agrobacterium*. Перечисленные соединения рекомендованы для клинических испытаний. Противовирусную активность проявляет продигиозан. Модифицированный (сульфатированный) полярный маннан — внеклеточный полисахарид *Rhodotorula rubra* — перспективен как средство профилактики и лечения атеросклероза.

Полисахариды, обладающие антигенной специфичностью, начинают использоваться в медицинской практике в качестве диагностических средств. К ним относятся, например, полисахаридные препараты патогенных и условно патогенных видов дрожжей рода *Candida*, облегчающие диагностику заболеваний кандидозной природы. Показана возможность использования

модифицированных ЛПС-антигенов сальмонелл в диагностике сальмонеллезов.

Очищенные специфические полисахариды менингококков групп А и С (полимеры N-ацетил, O-ацетилманнозаминфосфата и N-ацетил, O-ацетилнейраминовой кислоты соответственно) используются для получения менингококковых вакцин. Микробные полисахариды могут быть основой для создания искусственных вакцин. Достигается это изменением их конфигурации или конъюгацией с синтетическими полиэлектролитами.

Нейтральные декстраны с молекулярным весом около 75 000, продуцируемые *L. mesenteroides*, широко применяются у нас в стране и за рубежом в качестве заменителей плазмы крови. Перспективны как плазмозаменители пуллулан, а также леваны, синтезируемые *G. oxydans* и *Vac. polymyxa*. Декстраны определенного строения, как и многие другие полисахариды, способны стимулировать защитные реакции организма. В клиниках они применяются в комплексе с другими препаратами для лечения различных заболеваний брюшной полости. Сульфаты декстрана обладают антикоагулирующим действием, заменяют гепарин и могут применяться как антитромбогенное средство. В качестве антикоагулянта перспективен также хитин.

Широкое применение микробных полисахаридов в фармацевтической, парфюмерной, пищевой и других отраслях промышленности определяется их свойствами: вязкостью, реологическими характеристиками, способностью к набуханию, взаимодействием с определенными структурами. В фармацевтике они используются в качестве основы для изготовления лекарственных форм: как мягчители, эмульгаторы и стабилизаторы суспензий, как склеивающие агенты и разрыхлители в мазях, пилюлях, таблетках. Они обеспечивают длительную устойчивость лекарственных препаратов, стабилизируют и пролонгируют их действие. На базе некоторых микробных полисахаридов (аубазидан, декстран) созданы стабильные в течение нескольких лет лекарственные препараты: бутадiona, серы, сульфаниламидов, суспензии сульфата бария для рентгеноскопии и др. Макромолекулярные конъюгаты модифицированных декстранов с ферментами (стрептокиназой, трипсином, фибринолизином) пролонгируют активность ферментов и снижают их аллергизирующее действие.

Микробные полисахариды применяются как гельобразующие агенты при изготовлении косметических изделий, для создания гидрофильного буфера в кремах, в качестве набухающих веществ при производстве кремов, шампуней, лосьонов. Некоторые гликаны можно использовать вместо применяемой в настоящее время натрий-карбоксилцеллюлозы в качестве связующего и биологически активного компонента в зубных пастах.

В пищевой промышленности полисахариды микроорганизмов используются в виде пленок — покрытий продуктов, например сыров, для защиты их от высыхания и плесневения, в качестве стабилизаторов мороженого, фруктовых соков, приправ к сала-

там, загустителей сиропов, джемов, подливок, желе и других кулинарных изделий. Особенно перспективным в этом плане считается ксантан. Слизеобразующие штаммы *Streptococcus lactis* применяют в Швейцарии при производстве густых кефи-ров, сметан и некоторых мягких сыров. Экзополисахариды дрожжей родов *Saccharomyces* и *Cryptococcus*, бактерий родов *Azotobacter* и *Arthrobacter* могут использоваться для улучшения качества хлеба. Добавление их к муке при выпечке хлеба повышает газодерживающую способность теста, улучшает его реологические свойства. Хлеб, выпеченный из такого теста, отличается высоким удельным объемом, хорошей пористостью, медленнее черствеет.

Как гельобразующие агенты экзогликаны применяются при производстве ядерного топлива, фотографических и рентгеновских пленок, как заменители альгиновой кислоты водорослей в пищевой, текстильной, фармацевтической и бумажной промышленности (полиурониды *Azotobacter*, *P. aeruginosa* и ряда других микроорганизмов), они могут заменять агар (гетерополисахари-ды *Bac. subtilis* и *Ps. elodea*, состоящие соответственно из глюкозы, галактозы, фукозы, глюкуроновой кислоты и глюкозы, рамнозы, глюкуроновой кислоты и О-ацетильных групп).

Анионные полисахариды (ксантан, занфло — внеклеточный гетерогликан *Erwinia tahitica*, состоящий из глюкозы, галактозы, фукозы, уроновой кислоты и ацетильных групп, и др.) стабилизируют и предохраняют от высыхания катионные водные эмале-вые краски. Некоторые гликаны, например гетерополисахарид *Corynebacterium equi* var. *micilagenosus*, обладают высокой вязкостью и могут заменять дорогие клеящие средства. Сульфаты ксантана используются как загустители клеев. С другой стороны, способность ряда полисахаридов к образованию поверх-ностных пленок позволяет использовать их в качестве антисклеивающих веществ, например при освобождении слепков из отли-вочных форм. Декстран рекомендуется применять и в качестве смазочного средства.

Полисахариды, водные растворы которых отличаются особой стабильностью при резких изменениях температуры и в условиях агрессивной среды, используются в нефтяной и газодобывающей промышленности как стабилизаторы и структурообразователи промывных жидкостей, предназначенных для бурения нефтяных и газовых скважин, и обеспечивают более полное извлечение нефти из нефтеносных пластов. Уже около 15 лет назад более половины нефти в США добывали с помощью полисахаридов, главным образом ксантана. Промышленные испытания проходит склероглюкан — капсульный линейный нейтральный глюкан, обра-зуемый несовершенными грибами, преимущественно рода *Sclerotium*. В качестве стабилизатора буровых глинистых суспен-зий перспективен линейный внеклеточный гетерогликан обли-гатно-метилотрофных бактерий *Methylobacillus methylophilus*, состоящий из глюкозы, галактозы, маннозы, рамнозы и глюкуро-

новой кислоты. Применение полисахаридов в нефтедобывающей промышленности является очень перспективным в техническом отношении.

Полисахариды ряда микроорганизмов (пуллулан *A. pullulans*, гетерополисахарид бактерий рода *Methylomonas* и др.) являются флокулирующими агентами и применяются в гидрометаллургии для получения металлических компонентов в виде гелей, включающих нерастворимые осадки. Процесс реализован при очистке, разделении и концентрации металлов из растворов их солей или смесей солей.

На основе декстранов получают сефадексы, широко применяемые в лабораторной практике для гельфильтрации. Полианионные гликаны, например ксантан, хитин, рекомендуется использовать для очистки воды от тяжелых металлов, а также при промышленном синтезе полимеров для извлечения их из органических растворителей. Хитин может найти применение и для очистки сточных вод.

В качестве носителя иммобилизованной  $\alpha$ -амилазы используют аубазидан. Перспективны для иммобилизации ферментов курдлан и хитин.

Микробные леваны — источники получения чистого препарата фруктозы, хитин — D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина — соединений, используемых в химическом синтезе, из маннанов дрожжей можно получать маннозу.

Полисахариды некоторых бактерий, например леван *Vac. rotulifera*, оказались полезными в сельском хозяйстве. При внесении в почву они повышают выживаемость семян культурных растений, способствуя сохранению в них влаги. Альгинатными пленками покрывают корни и семена растений для предохранения их от высыхания во время хранения и перевозок.

Возможности практического применения полисахаридов микроорганизмов полностью еще не раскрыты. Полустороннее изучение гликанов в этом плане открывает новые перспективы и, несомненно, приведет к расширению соответствующей области микробиологической промышленности.

## 20.7. ПРОМЫШЛЕННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОБНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Расширение спектра микробных полисахаридов, имеющих практическое значение, обусловило успехи в области организации их производства. В настоящее время микробиологическая промышленность многих стран выпускает ряд ценных экзогликанов: декстран (СССР и другие страны), ксантан (США, Франция), пуллулан (Япония), склероглюкан или «политран» (США), занфло (США), курдлан (Япония). Уже решены или решаются вопросы внедрения в производство ряда других полисахаридов, детально изученных в лабораторных условиях, проверенных на практике и производимых в полупромышленном масштабе.

Производство различных полисахаридов не универсально. Для каждого гликана оно имеет свои особенности, определяемые физиологией продуцента, локализацией и физико-химическими свойствами полимера, областью его применения.

Получение экзополисахаридов имеет преимущества перед получением внутриклеточных, так как экзогликаны образуются, как правило, в значительно большем количестве, легче отделяются от биомассы и очищаются от примесей. Однако при производстве экзогликанов имеются свои технологические трудности. Накопление полисахарида в среде приводит к ограничению доступа кислорода к клеткам. У аэробных микроорганизмов это снижает энергетический баланс и тормозит синтез полисахарида. Повышенная вязкость среды делает невозможным отделение полисахарида от клеток продуцента из нативной культуральной жидкости. Ее приходится разбавлять в десятки раз, а после удаления клеток концентрировать до первоначального или меньшего объема. Решение этих проблем связано с дополнительными затратами.

Приведем основные этапы производства наиболее широко применяемых сейчас полисахаридов — декстрана и ксантана.

Плазмозаменители из декстранов выпускают под названиями: клинический декстран, полиглюкин, синкол, макродекс, плазмодекс, хемодекс и др. Для получения декстранов используют штаммы *Leuconostoc mesenteroides*. Ферментацию ведут на среде с 10—30 % сахарозы, декстраном — «затравкой», дрожжевым экстрактом, минеральными солями. Создают условия, способствующие синтезу той формы декстрана, которая используется в качестве плазмозаменителя: линейного глюкана, имеющего более 90%  $\alpha$ -1,6-связей, с молекулярной массой 60—80 тыс. Для этого ограничивают содержание в среде магния, стимулирующего синтез разветвленных декстранов, вносят «затравку» в виде декстрана, имеющего молекулярную массу 20—30 тыс. Такой акцептор обеспечивает преимущественное образование необходимого полимера.

Наивысшей биологической активностью обладают декстраны, содержащие менее 70%  $\alpha$ -1,6-гликозидных связей, т. е. более разветвленные. Синтезу биологически активных декстранов способствует, кроме магния, замена сахарозы мелассой. Оптимальное значение pH для роста продуцента лежит в пределах 6,5—8,0, а для накопления декстрансахаразы — около 7,0. Обычно значение pH среды задают в интервале 7,0—8,0.

Бактерии расщепляют сахарозу на глюкозу и фруктозу. Фруктоза сбраживается по типу гетероферментативного молочнокислого брожения с образованием молочной и уксусной кислот, маннита и CO<sub>2</sub>. Глюкоза полимеризуется в декстран. Процесс идет быстро и продукт можно выделить уже через 24 ч.

Декстран выделяют из культуральной жидкости, например, метанолом. Можно, используя определенные приемы, осаждают фракции клинического декстрана с молекулярной массой 60—



80 тыс. даже из смеси декстранов разной молекулярной массы. Можно осадить весь продукт, растворить его в воде и изолировать требуемый декстран фракционированием. При необходимости выделенный декстран деполимеризуют (ферментативно, термической обработкой или ультразвуком). Для очистки декстран неоднократно растворяют в воде, переосаждают метанолом и фракционируют.

Поскольку декстрансахараза в значительной степени выделяется в среду и синтез полимера идет вне клетки, декстраны получают и ферментативным путем. Для этого продуцент выращивается в условиях, обеспечивающих наиболее высокую активность внеклеточного ферментного комплекса. В период максимальной активности декстрансахаразы культуральную жидкость отделяют от клеток и консервируют, снижая значение рН до 5,0—5,2. При такой кислотности и температуре около 15 °С декстрансахараза, содержащаяся в культуральной жидкости, сохраняет активность не менее месяца. В СССР разработана технология получения частично очищенной декстрансахаразы. Ферментационная среда должна содержать сахарозу и декстран-«затравку». Процесс синтеза продолжается около 8 ч. Ферментативный способ удобнее микробиологического, так как он поддается более надежному контролю и регулированию, позволяет одним только варьированием исходных концентраций сахарозы и фермента, а также температуры процесса сразу получать декстран необходимой молекулярной массы. Это значительно упрощает и удешевляет последующие технологические операции. Широкое применение в промышленности может найти использование иммобилизованных декстрансахараз.)

В нашей стране в 1983 г. выпущена первая промышленная серия конъюгатов модифицированного декстрана со стрептокиназой — «стрептодеказа» — пролонгированная с помощью декстрана форма стрептокиназы.

Ксантан, продуцируемый *Xanthomonas campestris*, выпускают под названиями: биополимер Хс, келцан, ксантан, келтрол. Бактерии культивируют на среде, содержащей 1—5 % углеводов (кукурузный крахмал, сахар-сырец, меласса и др.), органическое соединение азота, двузамещенный фосфорнокислый калий и микроэлементы, рН среды 6,5—7,2. Инкубацию проводят в аэробных условиях, при 28 °С, в течение 72 ч. Для улучшения свойств полисахарида к среде во время ферментации добавляют формальдегид. Добавка позволяет получать гликан с повышенной устойчивостью к различным неблагоприятным факторам, в том числе к температуре и засолению. Полимер используют в виде раствора вязкой культуральной жидкости или в виде порошка, высушенного в струе горячего воздуха. В последнем случае полисахарид отделяют от клеток центрифугированием и очищают осаждением этанолом, метанолом или ацетоном в присутствии электролита.

Интенсивные поиски продуцентов полисахаридов типа ксан-

тана ведутся в различных странах. Активные продуценты среди бактерий рода *Xanthomonas* найдены в Советском Союзе. Разрабатывается технология получения отечественного ксантана в промышленном масштабе.

Нередко нативные полисахариды не обладают желаемыми качествами. Они могут быть, например, недостаточно активны или, будучи высокоэффективными, плохо растворимы или токсичны, что препятствует их применению, и т. д. Чтобы улучшить действие полисахаридных препаратов, устранить или снизить нежелательные явления, т. е. получить препарат с нужными свойствами, выделенные полисахариды иногда подвергают химической модификации. Так, декстран сульфатируют, чтобы придать ему антикоагулирующую активность. Обработка нативного гликана *A. faecalis* var. *tyxogenes* солюбилизирующими агентами позволяет получить производные, образующие гели без предварительного нагревания. Растворимость гликана *A. pullulans* и маннана *R. rubra* удается повысить карбоксиметилированием. Снижение токсичности противоопухолевого препарата белково-липо-полисахаридного комплекса из культуральной жидкости *Serratia piscatorum* достигается обработкой его щелочью. Получение производных полисахаридов связано с дополнительными технологическими операциями.

Все более широкое применение для производства экзогликанов находит метод непрерывного культивирования продуцентов. С его помощью в ряде стран уже получают многие перспективные в практическом отношении полисахариды (ксантан, курдлан и др.). Этот способ весьма эффективен и экономичен, поскольку позволяет длительно получать продукт в период его максимального накопления и наиболее полно использовать субстрат. Подсчитано, что процент конверсии углеродного субстрата в экзополисахариды при проточном культивировании в 2—3 раза выше, чем при периодическом. Обычно в качестве лимитирующего фактора в хемостате используют азот, а также фосфор и серу. Это обеспечивает интенсивное накопление экзогликанов. Благодаря правильному подбору условий ксантан получают при непрерывном культивировании продуцента в течение многих сотен часов.

В настоящее время разрабатывается производство ряда других практически ценных полисахаридов. У нас в стране на опытной установке Красноярского завода медпрепаратов получают аубазидан и суспензии сульфата бария на аубазидане. Создается опытно-промышленная установка для наработки маннана, развиваются работы по получению продигозана и группоспецифических полисахаридов менингококков (вакцин).

Перед микробиологическим производством полисахаридов стоит ряд задач. Одна из важнейших — замена дорогостоящих сахаров — традиционного источника углерода для получения многих полисахаридов, более дешевым сырьем. В связи с этим ведутся поиски микроорганизмов, растущих и образующих поли-

сахариды при использовании углеводов, этанола, метанола. Спирты как источники углерода несомненно удобнее углеводов, так как они хорошо растворимы в воде, что значительно упрощает технологию выделения и очистки продукта. Использование для культивирования микроорганизмов возможно более простых по составу сред — синтетических или диализованных, необходимо при получении высокоочищенных антигенов. Дешевый субстрат — гидролизат торфа — предлагается использовать для производства пуллулана.

Необходимы поиск новых продуцентов полисахаридов с полезными свойствами, особенно внеклеточных, и селекционно-генетические исследования перспективных микроорганизмов с целью получения вариантов с повышенной продуктивностью гликанов. Метод экспериментальной селекции активных штаммов нередко оказывается более быстрым и экономичным в сравнении с поиском таковых в природных условиях. Так, в результате действия низкой температуры с последующим облучением быстрыми нейтронами удалось отобрать варианты *X. campestris*, обладающие повышенным синтезом ксантана.

Поскольку микроорганизмы являются поистине неиссякаемыми источниками полисахаридов, можно не сомневаться, что среди этих полимеров будут обнаруживаться вещества, оригинальные в химическом отношении и представляющие большую ценность для практики.

# 3 Использование брожений и других процессов метаболизма

## Глава 21 СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ

Основные возбудители спиртового брожения — дрожжи, играют большую роль в жизни человека. Дрожжи традиционно используют в хлебопечении, для получения спирта и многих других продуктов. По значимости для народного хозяйства с ними могут конкурировать только молочнокислые бактерии. Пожалуй, нет на земном шаре ни одного человека, который бы в своей повседневной жизни не пользовался «трудами» этих микроорганизмов.

На Востоке в качестве возбудителя спиртового брожения при производстве рисового пива (сакэ) применяется *Aspergillus oryzae*. Спиртовое брожение могут вызывать также некоторые бактерии (*Zyotomonas mobilis*, *Z. anaerobica*, *Sarcina ventricula*, *Erwinia amylovora*). Однако получение спирта с помощью этих микроорганизмов существенного промышленного значения пока не имеет.

Термином «дрожжи» обозначают одноклеточные эукариотные микроорганизмы, которые в зависимости от наличия и типа полового процесса относят к трем классам грибов: Ascomycetes, Basidiomycetes и Deuteromycetes. Термин «дрожжи» в строгом смысле не имеет таксономического значения.

К классу Ascomycetes относят дрожжи, образующие при половом размножении сумки (аски) с эндогенными спорами. К нему принадлежат представители родов дрожжей, используемых в бродильных производствах, — *Saccharomyces* и *Shizosaccharomyces*. Класс Basidiomycetes включает дрожжи, формирующие телиоспоры (телейтоспоры) и базидиоподобные спорофоры с экзогенными половыми спорами (споридиями). К Deuteromycetes, или несовершенным грибам, относят дрожжи, у которых не обнаружен половой цикл. Считают, что организмы, принадлежащие к этой группе, произошли от высших грибов в результате утраты ими половых функций.

В процессе эволюции дрожжи хорошо приспособились к обитанию в различных местах, содержащих чаще всего углеводы. Они растут на поверхности сладких плодов, в нектаре цветков, в сокотечениях деревьев, на поверхности листьев, в лесной подстилке и почве. Встречаются дрожжи и в водоемах. Содер-

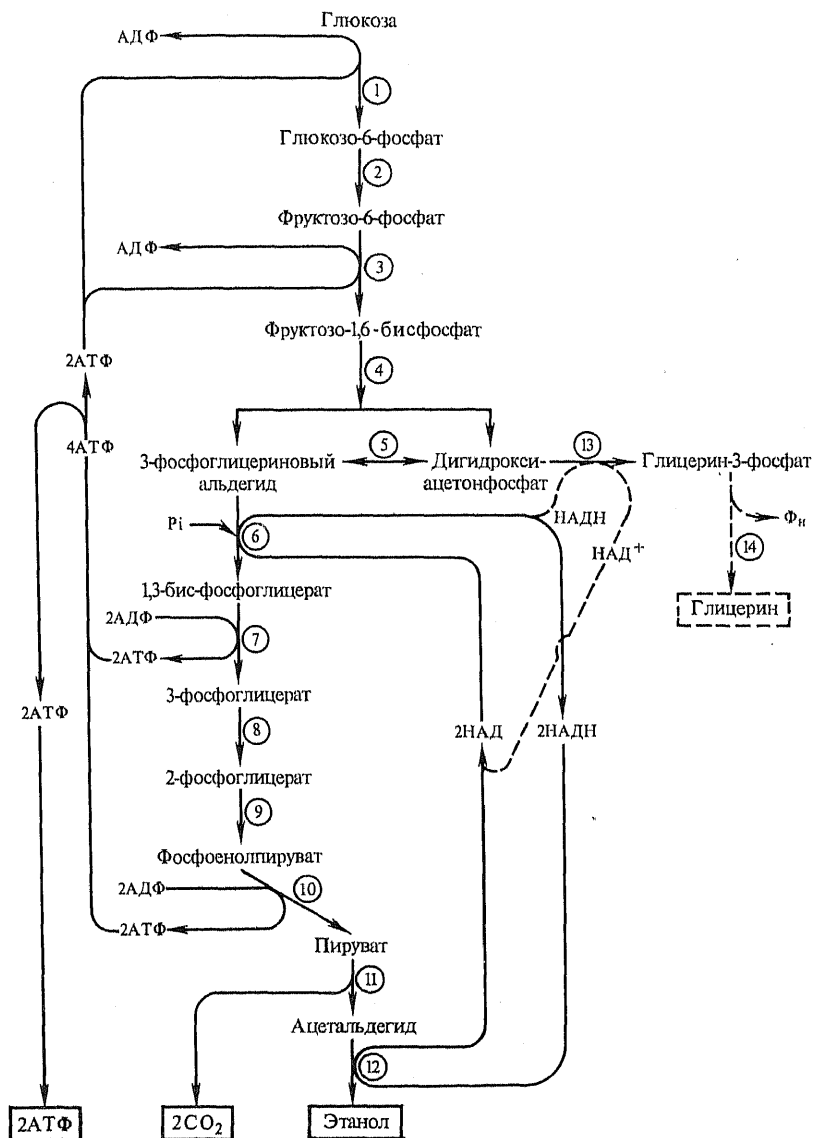


Рис. 21.1. Схема анаэробного разложения углеводов (фруктозо-бис-фосфатный путь):

1 — гексокиназа, 2 — глюкозофосфатизомераза, 3 — фосфофруктокиназа, 4 — альдолаза, 5 — триозо-фосфат-изомераза, 6 — глицеральдегидтрифосфатизомераза, 7 — фосфоглицераткиназа, 8 — фосфоглицеромутаза, 9 — енoлаза, 10 — пируваткиназа, 11 — пируватдекарбоксияза, 12 — алкогольдегидрогеназа, 13 — глицерофосфатдегидрогеназа, 14 — фосфатаза

жаты они в пищеварительном тракте человека и животных. Большинство дрожжей сапрофиты, но среди видов, находящихся во внутренних органах и на кожных покровах человека, имеются патогенные или условно патогенные формы, например возбудитель кандидомикозов — *Candida albicans*. Некоторые дрожжи вызывают болезни растений.

### 21.1. ФИЗИОЛОГИЯ ДРОЖЖЕЙ И ХИМИЗМ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ

Из соединений углерода дрожжи, как правило, лучше всего используют гексозы. Некоторые виды хорошо растут на средах с пентозами. Из полисахаридов чаще всего утилизируют инулин и крахмал. Известны дрожжи, растущие на средах с углеродородами и некоторыми спиртами, в том числе метанолом и этанолом, а также органическими кислотами и другими углеродными субстратами.

В качестве источника азота дрожжи используют обычно соли аммония, аминокислоты, небольшие пептиды, реже нитраты и нитриты. Некоторые виды нуждаются в одном или более витаминах (чаще в биотине и тиамине), другие — способны все необходимые для роста витамины синтезировать сами.

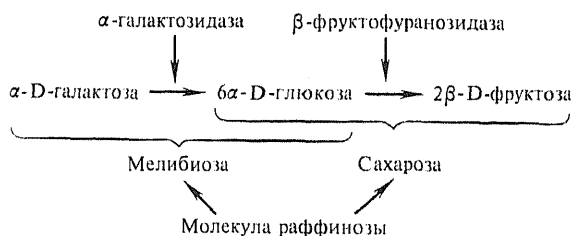
Большинство дрожжей растет в границах рН от 3,0 до 8,0, оптимальные значения рН от 3,5 до 6,5. Общий диапазон температур для роста дрожжей довольно широк: от 0 (даже — 7 °С) до 48—50 °С. Оптимальная температура для роста большинства видов 28—30 °С, но некоторые расы дрожжей, например, используемые в пивоварении, имеют более низкий температурный оптимум. Известны также облигатно психрофильные дрожжи, не растущие при температуре выше 18—20 °С. Многие дрожжи — факультативные анаэробы. В условиях анаэробноза они получают энергию в результате сбраживания углеводов, а в присутствии молекулярного кислорода — за счет аэробного дыхания.

Спиртовое брожение у дрожжей до образования пировиноградной кислоты отличается от гликолиза у высших организмов лишь последними этапами, на которых вместо молочной кислоты образуется этиловый спирт. Обусловлено это наличием у дрожжей пируватдекарбоксилазы, катализирующей превращение пирувата в ацетальдегид, который затем восстанавливается в этанол (рис. 21.1).

Гликолитическим путем (или путем Эмбдена — Мейергофа — Парнаса) его также называют фруктозобисфосфатным (ФБФ-путь), осуществляется разложение глюкозы, галактозы, фруктозы и маннозы. Олигосахариды вначале гидролизуются соответствующими ферментами до гексоз.

По-разному способны утилизировать дрожжи трисахарид раффинозу (табл. 21.1).

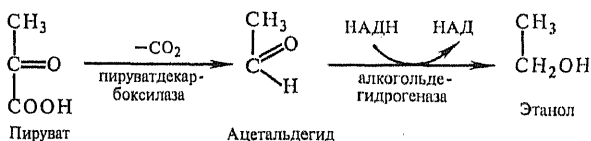
Способность утилизировать раффинозу определяется наличием в клетках дрожжей ферментов, расщепляющих сахар:



Существовало мнение, что дрожжи используют пентозы лишь в аэробных условиях. В последнее время установлено, что некоторые из них способны к росту в анаэробных условиях на средах, содержащих ксилозу или ксилулозу; последние подвергаются брожению с образованием этанола. Это имеет важное практическое значение для производств, перерабатывающих в спирт древесину и отходы сельскохозяйственных растений.

Разложение пентоз и высших спиртов осуществляется дрожжами через пентозофосфатный и ФБФ-пути. Спирты вначале дегидрируются до соответствующих гексоз и пентоз.

Некоторые дрожжи (*Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*) используют сахара только в аэробных условиях. Неспособность сбраживать глюкозу связывают с отсутствием у этих организмов пируватдекарбоксилазы или НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы — ферментов, осуществляющих превращение пирувата в этанол.



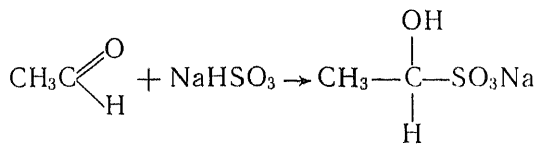
Брожение предполагает строгое равновесие процессов окисления и восстановления. Поэтому НАД, восстановленный на одном из этапов брожения, должен окисляться на другом этапе. Окисление НАДН происходит одновременно с восстановлением ацетальдегида в этанол. Такой процесс Нейберг назвал первой формой брожения. Суммарная реакция его:



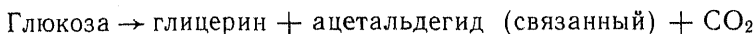
Т а б л и ц а 21.1. Варианты использования раффинозы дрожжами

Сбраживаемый сахар			Степень сбраживания молекулы раффинозы
галактоза	глюкоза	фруктоза	
+	+	+	Полное
—	+	+	На 2/3 (в остатке галактоза)
—	—	+	» 1/3 (в остатке мелибиоза)
+	—	—	» 1/3 (в остатке сахароза)

Ход брожения может заметно меняться в зависимости от конкретных условий. Если в культуру бродящих дрожжей добавить бисульфит натрия, который связывает ацетальдегид, он исключается из последующего процесса и блокируется:

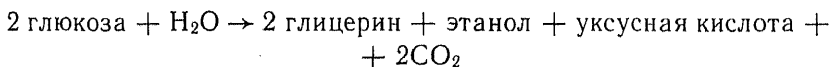


В таких условиях акцептором электронов (водорода) от НАДН становится дигидроксиацетонфосфат, превращающийся в глицерин-3-фосфат, а затем в глицерин (вторая форма брожения по Нейбергу). Суммарная реакция соответствует уравнению



Суммарное количество синтезированной АТФ при такой форме брожения равно нулю и, следовательно, процесс не может обеспечить рост клеток, но его используют в промышленности для получения глицерина.

Сходный вариант спиртового брожения наблюдается при выращивании дрожжей в щелочной среде. В этих условиях ацетальдегид окисляется НАД-зависимой дегидрогеназой в уксусную кислоту. Образовавшийся на этой стадии НАДН используется для восстановления эквивалентного количества ацетальдегида в этанол. Одновременно НАДН, получающийся при окислении 3-фосфоглицеринового альдегида, используется для восстановления дигидроксиацетонфосфата в глицерин-3-фосфат, который затем превращается в глицерин (третья форма брожения по Нейбергу). Суммарная реакция выражается уравнением



Такой химизм процесса благоприятен для клеток, поскольку образующаяся уксусная кислота снижает рН среды, после чего вновь возобновляется нормальное спиртовое брожение.

В начальной стадии спиртового брожения дигидроксиацетонфосфат также выполняет роль акцептора электронов до момента, пока не накопится ацетальдегид, необходимый для окисления НАДН. Этим объясняется наличие в начале брожения своеобразного периода индукции, во время которого появляется глицерин (рис. 21.2). Одновременно 3-фосфоглицериновый альдегид превращается, согласно реакциям ФБФ-пути, в пировиноградную кислоту, последняя затем декарбоксилируется в ацетальдегид. Но ацетальдегид не может восстанавливаться в спирт, так как НАДН использован для образования глицерина из дигидроксиацетонфосфата. Поэтому при образовании в процессе брожения одной молекулы глицерина накапливается одна молекула пиро-



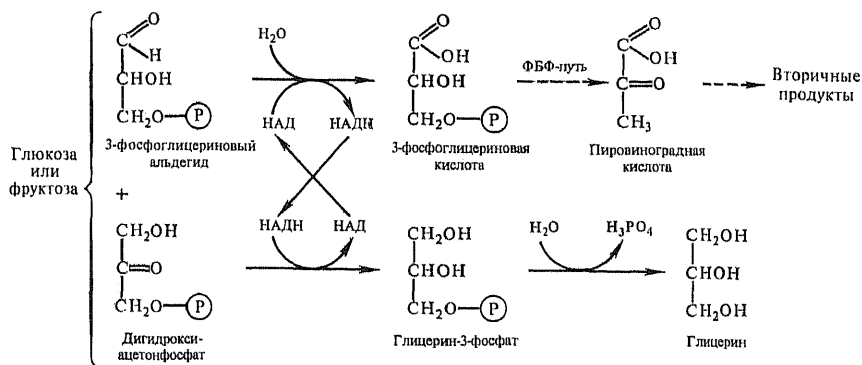


Рис. 21.2. Схема глицеринпировиноградного брожения

виноградной кислоты или ацетальдегида, которая не превращается в этиловый спирт. Спиртовое и глицеринпировиноградное брожение тесно связаны. Вначале преобладает глицеринпировиноградное брожение, но даже в период бурного брожения наряду со спиртом обнаруживаются другие продукты.

В присутствии молекулярного кислорода дрожжи быстро переключаются с брожения на аэробное дыхание. При этом пировиноградная кислота, образующаяся из глюкозы и других субстратов, окисляется через цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  (рис. 21.3). Кроме того, ЦТК обеспечивает клетки рядом метаболитов, необходимых для дальнейших биосинтетических реакций. В энергетическом отношении дыхание более выгодно, чем брожение. Поэтому в аэробных условиях дрожжи растут лучше и образуют большую биомассу. При выращивании дрожжей в аэробных условиях на средах с этанолом или ацетатом помимо ЦТК важное значение имеет функционирование у них глиоксилатного шунта (рис. 21.3).

Подавление брожения в аэробных условиях носит название эффекта Пастера. Он связан, видимо, с различием энергетического заряда клеток в аэробных и анаэробных условиях. Дыхательная система и субстратное фосфорилирование конкурируют за АДФ. Кроме того, значение имеет аллостерическая регуляция фосфофруктокиназы. Фермент ингибируется АТФ и активируется АМФ. В анаэробных условиях содержание АТФ низкое, а активность фермента высока, в аэробных — отношение АТФ : АМФ повышается и активность фосфофруктокиназы снижается. Известно также, что аллостерическим ингибитором фосфофруктокиназы является цитрат — промежуточный продукт ЦТК.

Спиртовое брожение может происходить в условиях значительной аэрации при высоком содержании глюкозы в среде (1,5—2,0 %). Подавление аэробного дыхания при высокой концентрации глюкозы (высокой скорости ее усвоения) называется эффектом Крэбтри или катаболитной репрессией. Этот эффект

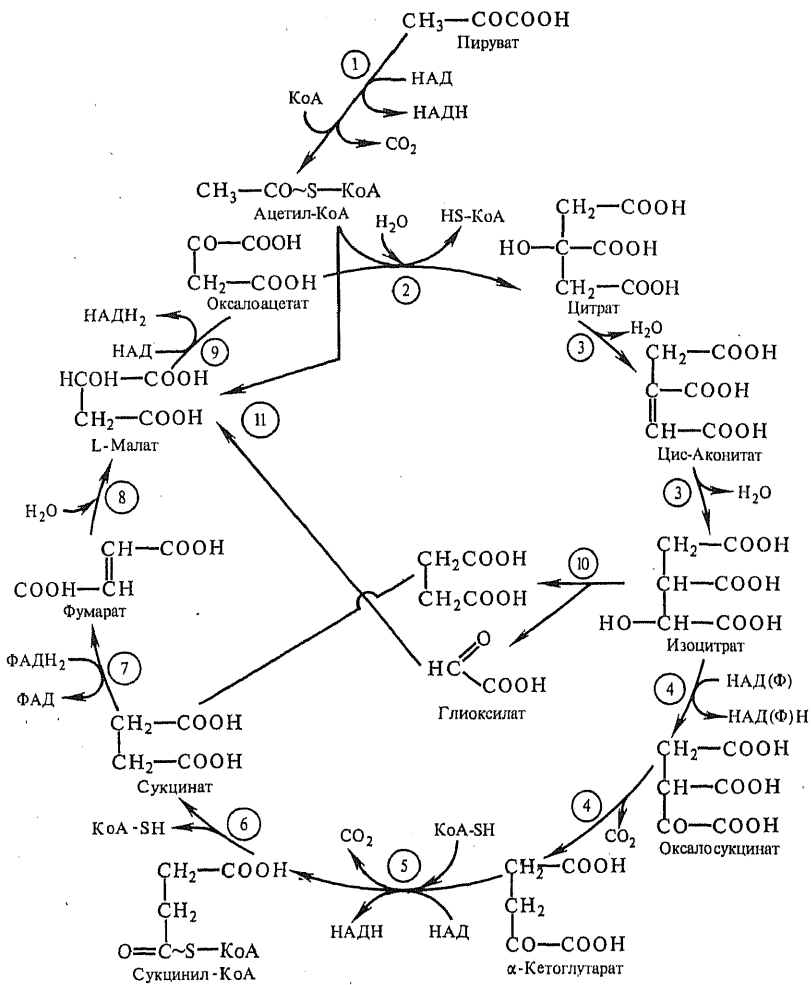
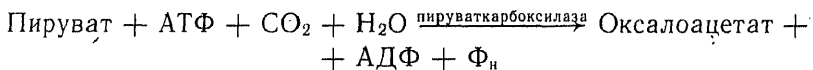


Рис. 21.3. Цикл трикарбоновых кислот и глиоксилатный цикл:

1 — пируватдегидрогеназный комплекс, 2 — цитратсинтаза, 3 — аконитаза, 4 — изоцитратдегидрогеназа, 5 —  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа, 6 — сукцинаттиокиназа, 7 — сукцинатдегидрогеназа, 8 — фумараза, 9 — малатдегидрогеназа, 10 — изоцитрат-лиаза, 11 — малат-синтаза

не наблюдается при выращивании дрожжей на средах, содержащих менее усваиваемые сахара. Катаболитная репрессия аэробного дыхания не только снижает получение дрожжами энергии, но подавляет биосинтез промежуточных продуктов ЦТК и глиоксилатного цикла. В таких условиях необходимые для биосинтеза кислоты ЦТК образуются путем карбоксилирования пирувата:

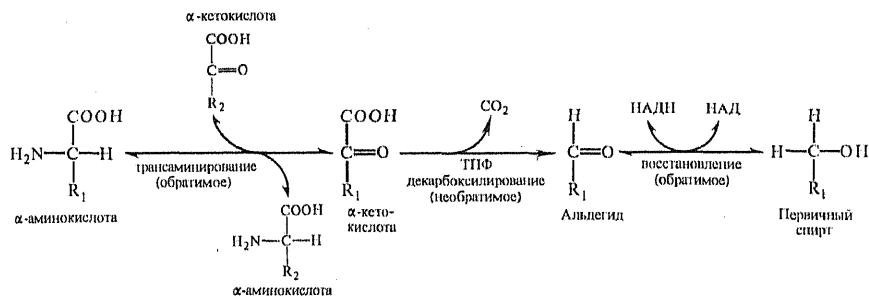


Выше уже указывалось, что в начале спиртового брожения преобладает глициринопировиноградное брожение, приводящее к образованию глицерина и пировиноградной кислоты. Однако пировиноградная кислота обнаруживается, как правило, в небольших количествах, поскольку основная ее часть идет на образование различных *вторичных продуктов*. К ним относятся уксусная, молочная, янтарная, пропионовая, муравьиная и некоторые другие кислоты, ацетон, диацетил, ацетоин, 2,3-бутандиол, различные альдегиды и сложные эфиры.

При сбраживании дрожжами сахаров обычно накапливается небольшое количество D(—)-молочной кислоты. Исключением является *Sacch. veronae*, синтезирующий L(+)-молочную кислоту. К продуктам брожения, образующимся из пировиноградной кислоты в небольшом количестве, относятся также лимонно-яблочная и диметилглицериновая кислоты.

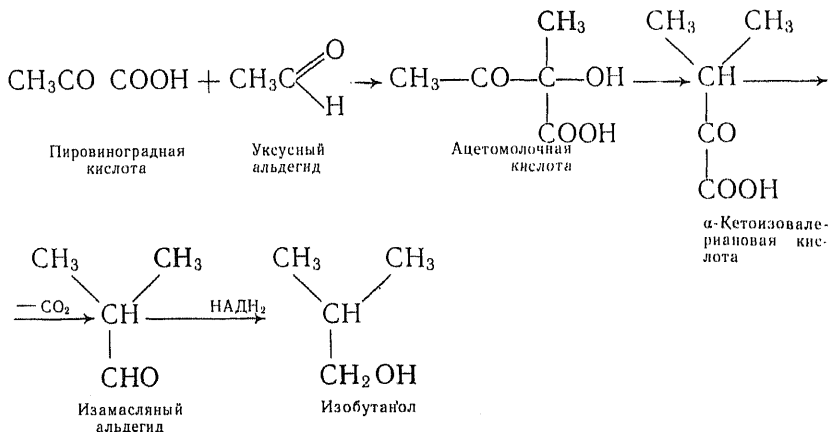
Кроме вторичных продуктов при спиртовом брожении образуются *побочные продукты* — высшие спирты, известные под названием сивушных масел. Почти половину общего количества высших спиртов составляют два изоамиловых спирта: 3-метилбутанол-(1) и 2-метилбутанол-(1). Наряду с ними в сивушном масле содержатся изобутиленовый, *n*-бутиловый, *n*-пропиловый и ароматические спирты ( $\beta$ -фенилэтиловый, *n*-оксифенилэтиловый). Эти продукты синтезируются из соответствующих кетокислот, образующихся в результате метаболизма углеводов, или из аминокислот. Поэтому вторичные и побочные продукты нельзя строго разграничить. Они существенно влияют на вкус и аромат готового продукта; накопление их не коррелирует с образованием этанола и сброженные растворы, содержащие одинаковое количество спирта, могут отличаться по вкусовым и ароматическим качествам.

Образование высших спиртов включает дезаминирование аминокислоты в кетокислоту, которая декарбоксилируется в альдегид; последний восстанавливается в спирт:



Однако не все высшие спирты синтезируются из аминокислот. Второй путь их образования можно рассматривать как биосинтез из продуктов метаболизма углеводов. Так, при конденсации

пировиноградной кислоты с уксусным альдегидом или с ацетил-КоА образуется ацетомолочная кислота, которая превращается в 2-кетоизовалериановую кислоту. В результате декарбоксилирования этой кислоты получается изомасляный альдегид, восстанавливающийся в изобутанол:



Полагают, что некоторые высшие спирты могут синтезироваться обоими путями (из аминокислот и углеводов), другие — только из продуктов метаболизма углеводов.

При спиртовом брожении образуются также серусодержащие вещества — сероводород и сульфиты. Последние могут быть в форме ионов бисульфита ( $\text{HSO}_3^-$ ) или сернистой кислоты ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ). Синтез этих веществ связан со способностью дрожжей восстанавливать  $\text{SO}_4^{2-}$  в  $\text{S}^{2-}$  через сульфит ( $\text{SO}_3^{2-}$ ). Восстановление сульфатов в сульфиты зависит от свойств штамма дрожжей. На образование  $\text{H}_2\text{S}$  влияет интенсивность брожения, а также присутствие ионов меди и цинка.

Из других серусодержащих веществ в незначительном количестве могут образовываться меркаптаны (этилмеркаптаны, метилмеркаптаны) — летучие вещества с неприятным запахом. Выделение  $\text{CO}_2$  при брожении способствует удалению этих веществ из среды.

## 21.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ДРОЖЖЕЙ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Дрожжи, используемые для получения спирта, относятся в основном к роду *Saccharomyces*. Систематика рода *Saccharomyces* неоднократно подвергалась пересмотру, номенклатура видов часто изменялась в зависимости от позиций авторов, придерживающихся тех или иных концепций в систематике дрожжей.

В последнем руководстве по дрожжам (N. Kreger-van-Rij, 1984) к роду *Saccharomyces* отнесено семь видов, размножаю-

щихся вегетативно преимущественно в диплоидной фазе: *Sacch. cerevisiae*, *Sacch. kluyveri*, *Sacch. exiguus*, *Sacch. dairenensis*, *Sacch. servazzii*, *Sacch. tellustris*, *Sacch. unisporus*. Как синонимы *Sacch. cerevisiae* рассматриваются *Sacch. bayanus*, *Sacch. carlsbergensis* и ряд других промышленно важных дрожжей.

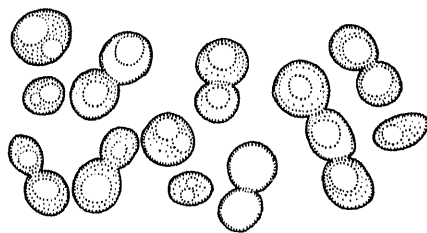


Рис. 21.4. *Saccharomyces cerevisiae*

Наибольшее значение имеет *Sacch. cerevisiae*. К этому виду относятся расы дрожжей, используемые в хлебопечении, спиртовом производстве, пивоварении, виноделии, производстве кваса. Поэтому приводим характеристику вида.

**Saccharomyces cerevisiae Hansen.** На солодовом сусле в трехсуточной культуре при 28 °С клетки имеют сферическую, эллипсоидальную или несколько удлинённую формы; располагаются единично или парами, иногда образуют короткие цепочки или мелкие грозди (рис. 21.4). В зависимости от размера клеток штаммы этого вида можно разделить на три морфологические группы.

К первой группе относятся штаммы, имеющие самые крупные клетки (3,5—10,5×5,0—21,0 мкм), ко второй — с наименьшими (2,5—7,0×11,0—19,0 мкм) к третьей — промежуточные (3,5—8,0×5,0—11,5—18,0 мкм). Некоторые штаммы образуют удлинённые клетки, достигающие 30 мкм и более.

Колонии у этих дрожжей пастообразные, кремовые или коричневато-кремовые, обычно с довольно ровной, гладкой, иногда слегка пузырчатой или покрытой точками поверхностью, с блестящими или тусклыми секторами. Край колоний цельный, иногда лопающийся, изредка образуется примитивный псевдомицелий.

Аскообразование легко вызвать при высевах дрожжей на агар с ацетатом. Аски обычно содержат от одной до четырех спор шаровидной или эллипсоидальной формы. Сбраживает глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу и на 1/3 раффинозу. В аэробных условиях использует глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, на 1/3 раффинозу. Способность к использованию L-сорбозы, трегалозы, мелецитозы, инулина, L-арабинозы, D-рибозы, глицерина, D-маннита, D-сорбита, α-метил-D-глюкозида и молочной кислоты варьирует. Не ассимилирует целлобиозу, лактозу, мелибиозу, крахмал, ксилозу, D-арабинозу, L-рамнозу, эритрит, рибит, дульцит, салицин, янтарную и лимонную кислоты, инозит. Не использует в качестве источника азота NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Штаммы имеют различную способность расти на средах в отсутствие витаминов.

В странах Африки для получения алкогольных напитков используют делящиеся дрожжи *Schizosaccharomyces* (*S. pombe* и *S. octosporus*).

В пищевой промышленности дрожжи, не принадлежащие к

сахаромицетам, играют, как правило, отрицательную роль, нарушая ход технологического процесса и вызывая порчу сырья и готовой продукции. Характеристика родов этих дрожжей приводится в табл. 21.2.

Штаммы *Sacch. cerevisiae* подразделяют на расы *низового и верхового брожения*. К расам низового брожения относится большинство винных и пивных дрожжей, к расам верхового — спиртовые, хлебопекарные и некоторые пивные. Дрожжи низового брожения функционируют в производстве при температуре 6—10 °С и ниже (до 0 °С), а верхового — обычно при 14—25 °С.

В конце брожения низовые дрожжи оседают на дно, формируя плотный осадок, верховые — всплывают на поверхность и образуют «шапку». Способность последних подниматься на поверхность обусловлена тем, что клетки после почкования остаются соединенными в небольшой цепочке; пузырьки углекислого газа поднимают их на поверхность. Оба свойства, однако, не абсолютны.

По поведению в бродящей среде дрожжи разделяют также на *хлопьевидные и пылевидные*. В основе этого разделения лежит различие в их флокуляционных свойствах (флокуляция — обратимая агрегация, или агглютинация, клеток).

Хлопьевидные дрожжи в конце брожения слипаются в комки («флокулы») и либо оседают на дно, либо поднимаются на поверхность. Пылевидные дрожжи в течение всего процесса брожения находятся во взвешенном состоянии. Флокулируют дрожжи как низового, так и верхового брожения. Клетки хлопьевидных дрожжей крупнее и тяжелее, чем пылевидных; последние особенно подвержены автолизу. Пылевидные дрожжи дают меньший прирост биомассы, но обладают более высокой бродильной активностью и полнее сбраживают сусло, образуют больше дицетила и высших спиртов. Хлопьевидные дрожжи лучше создают аромат напитков. Способность дрожжей к хлопьеобразованию не является стойким признаком, и штаммы могут ее постепенно утрачивать.

Во второй половине прошлого века кустарные бродильные производства были преобразованы в крупные, индустриальные. Одна из существенных трудностей, с которой столкнулась при этом промышленность, — развитие инфекции, наносившей особенно ощутимый урон. *Применение чистых культур* специально селекционированных микроорганизмов — важный этап борьбы за качество и чистоту процесса брожения.

Чистые культуры дрожжей размножают в производственных лабораториях на оптимальных для их роста средах, пересевая во все возрастающие емкости. В стадии высокой физиологической активности культуры передают в цех, где продолжают выращивать в дрожжерастительных аппаратах на обогащенных производственных субстратах и затем используют в технологическом процессе. В цехах создают условия, необходимые для жизнедеятельности дрожжей в заданном направлении и позволяющие

Таблица 21.2. Основные свойства дрожжей (кроме *Saccharomyces*), обнаруженных в пищевых производствах

Род	Вегетативное размножение	Форма клеток	Наличие псевдомицелия	Форма аскоспор	Способность к брожению	Ассимиляция нитратов	Потребность в витаминах
<i>Brettanomyces</i>	Почкование	Эллипсоидальная, цилиндрическая, удлиненная	+	—	+/-	+/-	+
<i>Candida</i>	Многостороннее почкование	Шаровидная, овальная, цилиндрическая, удлиненная, лимоновидная	+	—	+/-	+/-	+/-
<i>Hanseniaspora</i>	Биполярное почкование	Лимоновидная, овальная	+	Шляповидная, шлямовидная, шаровидная с бороздчатой поверхностью и ободком по центру	+	—	+
<i>Hansenula</i>	Многостороннее почкование	Сферическая, эллипсоидальная, цилиндрическая	+	Шляповидная, полусферическая, сатурновидная	+/-	+	+/-
<i>Pichia</i>	То же	Сферическая, коротко-овальная, цилиндрическая	+	Сферическая, шляповидная, сатурновидная	+/-	—	+/-
<i>Schizosaccharomyces</i>	Деление	Шаровидная, цилиндрическая	Истинный мицелий	Шаровидная, овальная	+	—	+
<i>Saccharomycodes</i>	Биполярное почкование	Лимоновидная, удлиненная	+/-	Шаровидная с гладкой поверхностью	+	—	+

подавить рост вредных микроорганизмов. Их развитие ингибируется рядом воздействий (введением антисептических веществ, большим засевом маточных дрожжей и др.), а также стремятся сохранить «естественную чистоту культуры».

На заводах в процессе длительного культивирования, особенно при непрерывных способах брожения, в результате спонтанного мутагенеза в дрожжевой популяции могут накапливаться мутанты, более приспособленные к условиям производства по сравнению с исходной расой.

Отбор новых рас дрожжей, как правило, проводят из ферментеров, в которых процесс брожения проходил с наиболее высокими показателями. Выделенные штаммы исследуют в лабораторных и производственных условиях. Расы, дающие наилучшие показатели брожения, становятся производственными и широко применяются в практике.

Иногда дрожжи, обладающие ценными производственными свойствами, удавалось выделять и из природных субстратов, условия развития в которых содействовали отбору нужных свойств. Так, в частности, в Средней Азии была выделена раса *Sacch. cerevisiae* Ркацители-6, широко используемая для производства вина в различных эколого-географических районах Советского Союза.

Многие попытки селекционировать дрожжи бродильных рас при искусственном воздействии мутагенных факторов оканчивались неудачей. Мутанты, проявляющие ценные свойства в лабораторных условиях, обычно не выдерживали конкуренции в производственных условиях и вытеснялись.

В последние годы при селекции рас дрожжей для ряда отраслей промышленности (производство спирта из мелассы, хлебопечение) с успехом применяют метод гибридизации.

Методы генетической инженерии открывают новые пути для получения высокоэффективных рас дрожжей.

## 21.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ В ПРОМЫШЛЕННОСТИ

### 21.3.1. Получение этилового спирта

В эпоху промышленного прогресса спирт широко применяют как растворитель и химическое сырье для производства синтетического каучука. В настоящее время в нашей стране большая часть этилового спирта используется на технические нужды, остальная — в медицине и для других целей.

Истощение запасов нефти и газа поставило перед наукой важнейшую задачу — разработать способы получения новых видов топлива, в первую очередь восполнить нехватку бензина. Недостаток в нем особенно остро ощущается в странах Америки и Западной Европы. Изыскание новых энергетических ресурсов — одна из наиболее актуальных проблем современности. Этиловый спирт — горючее, которым частично можно заменить



бензин, его можно добавлять к бензину (10 % и больше). Смесь спирта и бензина (газоголь) используется как топливо для автомобильного транспорта. Полагают, что при этом уменьшается загрязнение окружающей среды выхлопными газами, происходящее при неполном сгорании бензина, так как спирт полностью окисляется до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . По-видимому, производство моторного этанола путем брожения займет значительное место в странах, имеющих предпосылки для получения дешевого растительного сырья: почвенно-климатические условия, благоприятные для высоких урожаев сельскохозяйственных культур, а также быстрорастущих древесных пород. Имеется, кроме того, и значительное количество площадей для их выращивания.

В процессе спиртового брожения, как отмечалось выше, наряду с основным продуктом брожения — этанолом образуются побочные продукты; глицерин, высшие спирты, сивушные масла, альдегиды, органические кислоты, эфиры, углекислый газ. Большинство из них находит практическое использование. Сивушное масло и эфирно-альдегидную фракцию выделяют при ректификации этилового спирта и выпускают в виде технических продуктов. Углекислый газ улавливают, очищают от сопутствующих примесей и превращают в жидкую углекислоту. Ее используют в разных целях, в том числе для газирования воды, пива и безалкогольных напитков; применяют при сварочных работах как защитный агент против окисления швов, а также в литейном и других производствах. Сухой лед, получаемый из сжиженного углекислого газа, применяют в качестве хладагента в пищевой промышленности, медицине, машиностроении и энергетике. Выделенная после брожения биомасса дрожжей утилизируется в хлебопечении, а на барде после отгонки спирта выращивают кормовые дрожжи.

Сырьем для производства спирта служат разнообразные растительные материалы, содержащие в достаточном количестве сбраживаемые сахара или другие углеводы, которые можно осадить. Наиболее широко используются крахмалосодержащие материалы — зерно (рожь, пшеница, кукуруза, ячмень, овес, просо) и картофель, сахаросодержащие материалы — меласса (отход сахарного и крахмало-паточного производства), дефектная сахарная свекла, а также древесина и отходы сельскохозяйственных растений. Дальнейшее увеличение производства спирта будет идти в основном по пути увеличения мощностей предприятий, использующих непищевое сырье.

Процесс производства спирта из *крахмалистого сырья* включает ряд стадий. Вначале сырье измельчают и разваривают с целью извлечения и растворения крахмала. Поскольку крахмал не подвержен действию ферментов дрожжей, способных сбраживать только дисахариды и моносахариды, охлажденную разваренную массу обрабатывают амилолитическими ферментами солода (пророщенного зерна) или грибов (*Aspergillus oryzae*, *Asp. niger* и др.). Осахаренная масса (затор) содержит смесь

углеводов, состоящую из мальтозы, глюкозы и декстринов. Кроме того, в нем имеются пептиды, аминокислоты, фосфорорганические соединения, минеральные соли и микроэлементы.

Следующая стадия — сбраживание осахаренной массы. На спиртовых заводах СССР применяют периодический и непрерывно-поточный способы брожения. Для этого используют естественно-чистые культуры дрожжей; последние систематически ведут на производственных заторах в специальном дрожжевом отделении. Для подавления в них размножения бактерий пастеризованный и охлажденный до 30 °С затор подкисляют серной кислотой до pH 3,8—4,0. Такие значения pH менее благоприятны для развития дрожжей, чем pH 4,5—5,0, но медленное размножение дрожжей компенсируется возможностью получения практически чистой культуры в нестерильных условиях.

Спиртовые дрожжи, применяемые при переработке крахмалистого сырья, должны обладать высокой бродильной активностью; быстро и полностью сбраживать сахара, а также использовать другие компоненты питательной среды в анаэробных условиях, быть устойчивыми к продуктам своего обмена (особенно к спирту), хорошо противостоять развитию инфекции. Уже около 70 лет применяют *Sacch. cerevisiae*, раса XII. Эти дрожжи хорошо сбраживают глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, на  $\frac{1}{3}$  раффинозу, несколько слабее галактозу. В среде накапливают до 10—11 об. % спирта. Раса XII — верхнебродящая, хорошо распределяющаяся во всем объеме затора, пылевидная, не образует хлопьев. Оптимальная температура ее развития от 30 до 38 °С, максимальная 38 °С, минимальная температура 5 °С. Значение pH во время брожения поддерживают в пределах 3,8—4,0. Используют также другие расы дрожжей, но не так широко. После сбраживания заторов остаются неиспользованными около 0,1 % галактозы, 0,4 % декстринов и 0,5 % пентоз.

Проводится селекционная работа по получению рас дрожжей с более высокими производственно ценными свойствами, в частности, способных интенсивно использовать галактозу и декстрины. В последние годы большое внимание уделяется селекции термотолерантных рас, дающих в промышленном производстве ряд преимуществ (ускорение микробиологических процессов, уменьшение расхода хладоагента и др.).

Разрабатываются методы получения этанола на различных субстратах с использованием иммобилизованных клеток микроорганизмов.

*Меласса* — побочный продукт сахарного производства (содержит около 80 % сухих веществ и 20 % воды). Сухие вещества представлены сахарами, безазотистыми органическими, азотсодержащими и минеральными веществами. Основной сахар мелассы — сахароза. В сухих веществах ее 45—50 %. Содержится также 0,1—0,5 % инвертного сахара (смесь глюкозы и фруктозы) и 0,5—2 % раффинозы. Все остальные сухие вещества мелассы объединяют общим названием несахара. Они определяют свойст-

ва мелассы как сырья для спиртового производства. Азотсодержащие вещества мелассы представлены в основном продуктами распада белковых веществ — аминокислотами и бетаином — органическим основанием, дающим при разложении амины. Содержит она витамины группы В и биотин, необходимые для роста дрожжей. Нормальная доброкачественная меласса имеет слабощелочную или нейтральную реакцию (рН 7,2—8,9).

К дрожжам, используемым для сбраживания мелассных растоворов, предъявляются в основном те же требования, что и к расам для производства спирта на крахмалистых средах. Кроме того, они должны обладать способностью переносить высокие концентрации сухих веществ, содержащихся в мелассе, и, возможно, более полно сбраживать рафинозу. Технологические схемы предусматривают использование выделенных после брожения дрожжей в качестве хлебопекарных, поэтому они должны отвечать требованиям, предъявляемым к последним.

В производстве широкое применение нашла раса *Sacch. cerevisiae* Я, а при использовании дрожжей в качестве хлебопекарных — раса В (венгерская). Дрожжи этих рас хорошо сбраживают сахарозу, глюкозу и фруктозу, рафинозу только на  $\frac{1}{3}$ . При большом содержании рафинозы в мелассе недобор спирта может быть значительным.

Для селекции рас дрожжей с требуемыми свойствами был применен метод гибридизации. В результате скрещивания расы Я с дрожжами, использующимися в пивоваренном производстве и способными образовывать  $\alpha$ -галактозидазу, были получены диплоидные гибриды (67 и 73), применяемые в настоящее время на ряде заводов Советского Союза. Они сбраживают рафинозу примерно на 60—70 %, тогда как дрожжи рас Я и В — только на 30 %. В последние годы для сбраживания сусла из свеколосахарной и тростниковой мелассы используют расу V-30. Она сбраживает рафинозу на  $\frac{2}{3}$ , обладает высокой генеративной способностью, а получаемые прессованные хлебопекарные дрожжи лучшего качества, чем дрожжи расы В.

Сырьем для получения технического спирта могут служить гидролизаты древесины и других растительных отходов. Древесина хвойных и лиственных пород содержит от 40 до 75 % полисахаридов. Различают легко- и трудногидролизуемые полисахариды. Легкогидролизуемые полисахариды состоят из гемицеллюлоз и пектиновых веществ. Трудногидролизуемые полисахариды содержат целлюлозу с небольшой примесью гемицеллюлоз.

Растительное сырье под давлением подвергают кислотному гидролизу. Полученный гидролизат содержит 3,2—3,5 % редуцирующих сахаров, преимущественно глюкозу, в небольших количествах галактозу и маннозу, а также пентозы — ксилозу, арабинозу, рамнозу.

Для сбраживания древесных гидролизатов используют ряд рас *Sacch. cerevisiae* и *Schizosaccharomyces*. Последние более полно сбраживают галактозу, чем сахаромикеты, и поэтому дают

более высокий выход спирта. Брожение проводят по непрерывно-поточному способу при высокой концентрации биомассы (17—25 г/л).

Присутствующие в гидролизате вредные примеси играют роль антисептиков — подавляют развитие посторонних микроорганизмов. Поэтому на гидролизных спиртовых заводах отсутствуют установки для размножения чистых и производственных культур дрожжей, а одни и те же дрожжи используют на протяжении многих месяцев.

Зрелая бражка, полученная в результате брожения, содержит 1,0—1,5% этанола и побочные продукты брожения, несброженные сахара и другие органические вещества. При перегонке бражки и ректификации гидролизного спирта не удастся полностью избавиться от этих примесей; гидролизный спирт (ректификат) содержит до 0,05—0,1 % метанола и несколько большее количество кислот, сложных эфиров и альдегидов, чем ректификат из пищевого сырья.

При традиционном способе получения этанола из гидролизатов древесины и отходов сельскохозяйственных растений значительная часть моносахаридов, в основном ксилозы, остается неиспользованной. В последние годы выявлены дрожжи *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* (син. *Pichia stipitis*) и другие, способные сбраживать ксилозу с образованием этанола. Использование таких дрожжей может обеспечить утилизацию до 90 % сахаров, образующихся при гидролизе растительной массы. Разрабатываются промышленные методы производства этанола с применением ксилососбраживающих дрожжей.

Сульфитные щелока являются отходами целлюлозного производства. Для извлечения целлюлозы древесину обрабатывают при повышенной температуре варочным раствором, обычно представляющим смесь сернистой кислоты с водными растворами бисульфитов и моносульфитов —  $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$ ,  $\text{Mg}(\text{HSO}_3)_2$ ,  $\text{NH}_4\text{HSO}_3$  и  $\text{NaHSO}_3$ . При этом целлюлоза извлекается в неповрежденном виде, а гидролизуются только гемицеллюлозы. Лигнин, входящий в состав древесины, образует с сернистой кислотой водорастворимые лигносульфоокислоты. Суммарная концентрация сахаров достигает 3,0—3,5%, из них 62—68% сбраживаемые, рН 1,5—1,0.

Сульфитные щелока сбраживают расами *Sacch. cerevisiae*, которые хорошо используют галактозу, обладают флокулирующими свойствами и сорбируются волокнами целлюлозы. Благодаря наличию в щелоках ряда антисептических веществ нет необходимости в процессе производства размножать дрожжи в специальных аппаратах. Отбродившие дрожжи вновь идут в производство.

Зрелая бражка содержит 0,5—1 % этилового спирта и много летучих примесей (альдегиды, эфиры, высшие спирты, метанол, фурфурол, сернистый ангидрид, сероводород). В сульфитном спирте остаются трудноотделяемые сернистые соединения, зна-

чительное количество альдегидов и эфиров, а также 2—8 % метанола. Сульфитный спирт является самым дешевым. Его стоимость примерно в три раза ниже пищевого.

### 21.3.2. Производство хлебопродуктов

Производство хлеба включает сложный цикл микробиологических и биохимических процессов, происходящих в тесте с момента смешивания муки с водой и заканчивающихся выпечкой.

В состав муки, используемой для выпечки пшеничного и ржаного хлеба, входят компоненты, необходимые для развития многих микроорганизмов. Кроме крахмала в муке содержится до 0,7—1,8 % (в пересчете на сухое вещество) сбраживаемых сахаров — глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы, раффинозы, существенно влияющих на первые стадии брожения теста. Образующиеся при гидролизе крахмала амилолитическими ферментами муки углеводы (мальтоза и др.) — основные субстраты, обеспечивающие процесс брожения и хорошее газообразование при изготовлении теста. Азотсодержащие вещества муки состоят главным образом из белков. В незначительном количестве содержатся и небелковые азотистые вещества — свободные аминокислоты и амиды. Кроме того, протеиназы муки обогащают тесто водорастворимыми азотсодержащими соединениями. В состав муки входит до 2 % минеральных веществ, в том числе микроэлементы.

Мука всегда содержит значительное количество различных микроорганизмов. Вносятся они и с добавками к тесту. Важнейшую роль в брожении теста играют дрожжи и молочнокислые бактерии (см. гл. 22), для которых в этом случае имеются все необходимые условия: влажность (40—50 %), незначительное содержание молекулярного кислорода и наличие питательных веществ. Микробиологические процессы и связанные с ними биохимические изменения в тесте определяют пористость, окраску, прочность среза и сохранение свежести хлеба, придают ему вкус и аромат.

При приготовлении теста из пшеничной муки обычно применяют хлебопекарные *прессованные дрожжи*. Их производят на специализированных дрожжевых заводах; в качестве питательной среды используют мелассу с добавлением необходимых питательных компонентов. Дрожжи после выращивания при аэрации отделяют от питательной среды сепарированием, промывают и прессуют. Влажность их составляет 75 %, поэтому они не могут храниться длительное время.

Для получения хлебопекарных дрожжей используют быстрорастущие расы верхового брожения. Они должны иметь крупные клетки (не менее  $7,0 \times 11,0$  мкм), хорошо сбраживать сахара при высокой концентрации сухих веществ в тесте, быть солеустойчивыми и устойчивыми к вредным примесям мелассы, иметь высокую скорость генерации ( $\mu = 0,2 \text{ ч}^{-1}$ ), обладать высокой

подъемной силой и мальтазной активностью. Подъемная сила отражает активность бродильных ферментов клетки, ее зимазного комплекса, а мальтазная активность свидетельствует о скорости сбраживания мальтозы.

В хлебопечении применяют также сухие дрожжи, которые готовят высушиванием прессованных до влажности 7—10%. В отечественной промышленности используют разные расы *Sacch. cerevisiae*. На многих хлебозаводах используют смесь различных рас. На некоторых заводах нашли применение гибридные дрожжи. В настоящее время для приготовления пшеничного и ржаного теста широко используют закваски, состоящие из дрожжей и молочнокислых бактерий.

Ржаное тесто часто готовят на густых заквасках, обеспечивающих его разрыхление и кислотонакопление. Их изготавливают с помощью чистых культур гомо- и гетероферментативных молочнокислых бактерий и дрожжей.

Жидкие закваски — полуфабрикат, при получении которого на осахаренных заварках или жидких водно-мучных смесях при 28—30 °С непрерывно-поточным способом одновременно размножаются мезофильные гетероферментативные молочнокислые бактерии и дрожжи, попавшие туда спонтанно (например, с мукой) или внесенные специально. При использовании жидких заквасок в тесте протекает не только спиртовое, но и активное молочнокислое брожение, при этом рН теста снижается до 4,7—4,8.

Жидкие дрожжи — полуфабрикат, в котором (в отличие от жидкой закваски) основным компонентом, ведущим брожение в тесте, являются микроорганизмы. Для достижения этого осахаренная и охлажденная до 50 °С мучная заварка заквашивается бактериями *L. delbrueckii* (рН 3,7—3,9). На закисшем заторе при 28 °С в другой емкости культивируют дрожжи, используемые для разрыхления теста. В настоящее время более половины пшеничного хлеба (особенно из муки второго сорта) изготавливается на жидких дрожжах, масштабы применения которых возрастают.

Порчу хлебопекарных изделий могут вызывать неосмофильные и осмофильные виды дрожжей. Неосмофильные дрожжи обуславливают три вида порчи. Аспорогенные дрожжи при попадании в тесто могут понизить качество хлеба и придать ему нежелательный запах. *Sacch. cerevisiae* и другие бродящие дрожжи, заражая хлеб после выпечки, вызывают появление сильного запаха («фруктового», «ацетонового» и др.). Виды дрожжей, образующие гифы, могут давать на поверхности хлеба хорошо видимый рост. На темных сортах хлеба возможно появление белого налета «меловой плесени», порчу чаще всего вызывают *Huiphopichia burtonii*.

Осмофильные дрожжи (*Zygosacch. rouhii*, *Zygosacch. bisporus*) опасны для кондитерских хлебопекарных изделий, при изготовлении которых компоненты с высоким содержанием сахара (джемы, мармелад, фруктовые наливки и др.) могут портиться (засбраживать).

### 21.3.3. Производство пива

Пиво — слабоалкогольный напиток — получают путем сбраживания охмеленного сусла специальными расами дрожжей. Вкус и аромат его создают экстрактивные вещества, извлеченные из солода, горькие и ароматические вещества хмеля, а также этиловый спирт, углекислый газ и другие продукты брожения. Сортные различия пива определяются типом используемого солода, количеством и видом добавляемых неосоложенных продуктов. Процесс производства пива включает ряд стадий: изготовление солода из ячменя, получение охмеленного сусла, сбраживание сусла, дображивание и созревание молодого пива, фильтрацию и розлив.

Пивные дрожжи, используемые в пивоваренной промышленности, обладают высокой флокуляционной способностью, медленно и полно оседают при осветлении молодого пива в конце главного брожения и готового — в конце дображивания. Они активно сбраживают глюкозу и фруктозу, медленнее — мальтозу и еще медленнее — трисахарид мальтотриозу. Декстрины не сбраживаются и играют важную роль в создании полноты и вкуса пива. Пивные дрожжи в незначительном количестве накапливают высшие спирты, диацетил и сернистые соединения, а также обеспечивают насыщенность пива углекислотой. В настоящее время в СССР в пивоваренной промышленности применяют главным образом дрожжи *Sacch. cerevisiae* низового брожения (наиболее широко используют расы 776, 41, 44, S-Львовская, 11, 8а(М), а также расы Р и F).

При производстве пива могут развиваться посторонние виды дрожжей. Они ухудшают процесс брожения и осветления пива, вызывают его помутнение, придают посторонний вкус и запах. Описано около 30 видов «диких дрожжей», инфицирующих пиво. Однако детальное изучение свойств многих из них показало, что многочисленные «виды» в большинстве случаев являются мутантами культурных дрожжей. В настоящее время предложено рассматривать такие «виды» как синонимы *Sacch. cerevisiae*.

### 21.3.4. Производство вин

Виноградное вино — напиток, получаемый в результате спиртового брожения сока винограда (с мезгой или без нее). Ассортимент вин, выпускаемых промышленностью, очень богат. Виноградные вина разделяют на сортовые, вырабатываемые из одного сорта винограда, и купажные, приготовляемые из смеси сортов. Тихие вина, выпускаемые без выдержки на первом году, называются ординарными, выдержанные не менее 1,5 лет и сохраняющие из года в год свои качества — марочными. Высококачественные вина получают в отдельных винодельческих районах по специальной технологии. Технология приготовления вин различна. При производстве тихих (сухих) вин виноград, достигший

полной зрелости, дробят, настаивают на мезге, прессуют, отделяют и отстаивают сусло. Полученное сусло подвергают сбраживанию. Ранее его сбраживали на «диких дрожжах», попадающих преимущественно с ягодами. Это не всегда гарантировало высокие показания брожения. В настоящее время процесс брожения проводят на чистых культурах *Sacch. cerevisiae*. Раньше эти расы дрожжей называли *Sacch. vini*.

Винодельческая промышленность располагает большим количеством высококачественных рас дрожжей, позволяющих быстрее и полнее сбраживать и лучше осветлять сусло, улучшать вкус и аромат вина.

Посторонние виды дрожжей, развиваясь в вине, могут вызвать его болезни (помутнение, образование пленки, порчу вкуса).

**Шампанское** — продукт вторичного брожения вина в герметически закрытых сосудах, при котором происходит насыщение его углекислотой, формирование своеобразного гармоничного вкуса и тонкого букета, игристых и пенистых свойств. Для приготовления шампанского используют сухие высококачественные, преимущественно белые вина, в которые добавляют ликер (обычно из расчета содержания 2,2 % сахара).

При классическом французском способе вино с добавлением ликера сбраживают в толстостенных бутылках. В Советском Союзе разработана новая технология приготовления шампанского по непрерывному способу. Она запатентована и используется в ряде зарубежных стран. Шампанизацию при этом проводят в батарее больших герметизированных резервуаров при 10—15 °С и давлении до 0,5 МПа. Шампанское охлаждают до —5 °С, при необходимости добавляют ликер и разливают под давлением в бутылки. Процесс изготовления шампанского в бутылках продолжается три года, а по новой технологии — около трех недель.

В условиях шампанского производства жизнедеятельность дрожжей проходит «на пределе их физиологических возможностей». Шампанские расы *Sacch. cerevisiae* должны быть активны в жестких условиях производства и образовывать ценные продукты метаболизма, обуславливающие высокое качество напитка. Расы, используемые в бутылочной шампанизации, должны образовывать зернистый или уплотняющийся комками, легко спускающийся на пробку и не прилипающий к стеклу осадок; для шампанизации в непрерывном потоке применяют дрожжи с пылевидной структурой осадка.

Производимые в Советском Союзе вино и шампанское экспортируются в ряд зарубежных стран.

### 21.3.5. Производство хлебного кваса

Хлебный квас — национальный русский напиток — продукт незаконченного спиртового и молочнокислого брожения. Квас изготавливали на Руси с древних времен. Существует много на-



родных способов его приготовления. В настоящее время квас готовят в промышленных условиях.

Сырьем для производства кваса обычно служат ржаной и ячменный солод, ржаная мука, вода, сахар. Ржаной солод и ржаную муку предварительно запаривают и вводят ячменный солод, под воздействием ферментов последнего происходит гидролиз некрахмальных полисахаридов, белков и крахмала. Полученное сусло после фильтрации сгущают, упаривают и нагревают до 105—115 °С. При этом образуются меланоидины, придающие ему интенсивную окраску и аромат ржаного хлеба. Для сбраживания квасного сусла применяют смешанные культуры дрожжей *Sacch. cerevisiae* и молочнокислых бактерий.

Закваску из дрожжей и молочнокислых бактерий предварительно разделяют и размножают на стерильном квасном сусле и затем переводят в чан, заполненный пастеризованным суслом с сахарным сиропом. Вначале в чан задают только разводку молочнокислых бактерий, а позже разводку дрожжей. В процессе брожения в квасе накапливается 0,3—0,5 % спирта. Квас охлаждают, снимают с осадка, купажируют сахарным сиропом и подают на розлив. В готовом квасе при хранении количество спирта не должно превышать 1,2 об. %.

Помутнение и прокисание кваса могут вызвать различные виды микроорганизмов. Дрожжи *Candida krusei* и *C. guilliermondii* окисляют спирт, способствуют накоплению органических кислот, образуют неприятный привкус. В порче кваса могут принимать участие также уксуснокислые бактерии.

### 21.3.6. Использование дрожжей в молочной промышленности

Дрожжи — неизменные обитатели молока и молочных продуктов. Свежевыдоенное молоко не содержит дрожжей, но они появляются уже через несколько часов (до 13 % и более от общего числа микроорганизмов). Дрожжи в молоке представлены видами *Candida* (до 90 %), а также *Pichia*, *Rhodotorula*, в небольшом количестве сахаромикетами.

Микробиологические основы приготовления молочных продуктов приведены в гл. 22, посвященной молочнокислым бактериям. Мы остановимся только на описании основных видов дрожжей, играющих положительную роль в приготовлении молочных продуктов, а также вызывающих снижение их качества и порчу.

Дрожжи — необходимые компоненты заквасок, используемых для получения кефира, кумыса, курунги и других национальных напитков. Особенно важны дрожжи, сбраживающие лактозу с образованием спирта, — *Kluyveromyces lactis*, *Kl. fragilis* и *Candida pseudotropicalis* (несовершенная форма *Kl. fragilis*).

Спиртовое брожение лежит в основе получения ацидофильно-дрожжевого молока и различных напитков из сыворотки. С этой

**Т а б л и ц а 21.3. Ухудшение качества и порча молочных продуктов дрожжами**

Вид дрожжей	Продукт	Вызываемый процесс
<i>Candida pseudotropicalis</i>	Сливки	Вспенивание, дрожжевой привкус
То же	Сметана, ряженка, простокваша	Вспучивание, нарушение структуры сгустка
<i>Geotrichum candidum</i>	Сметана	Плесневение
<i>Candida molishiana</i>	Йогурт	Дрожжевой привкус, неприятный запах
<i>Candida lactis-condensi</i>	Сгущенное молоко	Бомбаж, дрожжевой привкус
<i>Candida lipolytica</i>	Маргарин	Гидролиз жира, дрожжевой и мыльный вкус и запах
<i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Rhodotorula</i> spp.	Сыры	Вспучивание, вкусовые дефекты (сладкий, фруктовый, дрожжевой, острый, прогорклый); цветные пятна

Примечание. По современной классификации дрожжи рода *Torulopsis* отнесены к роду *Candida*.

целью используют как лактозосбраживающие виды дрожжей, так и виды, не способные использовать этот сахар, например *Sacch. cerevisiae*. При этом образование спирта происходит за счет незначительного количества глюкозы, содержащейся в сыворотке.

При созревании сыров роль дрожжей неоднозначна. Одни виды стимулируют молочное брожение, способствуют усилению протеолиза белков и увеличению содержания карбонильных соединений, влияющих на вкусовые качества сыра. Другие виды вызывают вспучивание сыров, появление вкусовых дефектов и цветных пятен.

Дрожжи могут вызывать ухудшение качества и порчу различных кисломолочных продуктов, сгущенного молока, маргарина, майонеза. Характер порчи определяется особенностями метаболизма дрожжей и составом продукта (табл. 21.3).

#### **21.4. ДРОЖЖИ — ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИИ НА ПРОИЗВОДСТВЕ**

Дрожжи могут наносить значительный урон ряду отраслей пищевой промышленности.

При *производстве сахара* дрожжи вызывают разложение сахарозы, ослизнение соков и сиропов, образуют органические кислоты, ухудшают процесс фильтрации, снижают качество полупродуктов и готовой продукции. При производстве сахара из свеклы дрожжи попадают на сахарный завод с поврежденными

корнеплодами и остающейся на них почвой. Увеличение количества микроорганизмов происходит при хранении большой сахарной свеклы. На пораженной свекле количество дрожжей может достигать нескольких тысяч клеток в одном грамме.

В диффузионном соке под воздействием высокой температуры (70—75 °С) количество дрожжей резко снижается до единиц клеток в 1 г. Из субстратов сахарного производства были выделены дрожжи, обладающие высокой термоустойчивостью. Так, *Kluyveromyces marxianus*, энергично сбраживающие и ассимилирующие сахарозу, способны расти при температуре до 50 °С и концентрации сахарозы до 75 %. При оптимальной температуре некоторые штаммы могут развиваться даже при 80 % сахара.

В сахаре-сырце сахароза находится в виде кристаллов, окруженных тонкой пленкой мелассы, в которой растворены или суспендированы остаточная сахароза и другие вещества. В пленке могут обитать осмофильные дрожжи (*Zygosacch. bisporus*, *Zygosacch. rouxii*, *Zygosacch. bailii*, *Torulasporea delbrueckii*). Количество клеток дрожжей в 10 г свекловичного сахара может варьировать от 1 до 20.

Порчу растительных пищевых продуктов могут вызывать разные микроорганизмы, в том числе дрожжи. Последние, как правило, обсеменяют свежие продукты в незначительном количестве. При нейтральной или слабокислой реакции среды на них вначале развиваются бактерии, дрожжи — позже. Преимущества для своего развития дрожжи получают при рН ниже 5,5; некоторые виды способны расти даже при рН 1,5—2,0.

В порче продуктов животного происхождения — мяса, птицы, рыбы — роль дрожжей незначительна. Вредны в этих случаях виды дрожжей, обладающие протеолитической и липолитической способностью, особенно устойчивые к высокой концентрации NaCl.

Дрожжи, развивающиеся в рассолах при квашении различных овощей и фруктов, образуют при доступе воздуха пленку на поверхности или размножаются в глубинных слоях.

Наиболее постоянные компоненты пленок различных рассолов — представители рода *Debaryomyces* — характеризуются высокой солеустойчивостью, кислотоустойчивостью и способностью ассимилировать большой набор источников углерода. Дрожжи, размножающиеся в глубинных слоях (виды *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Candida*), обладают значительной бродительной активностью и сбраживают сахара, выделяющиеся с клеточным соком. Их представители вызывают вздутие и образование полостей в плодах.

Дрожжи — основные возбудители порчи плодово-ягодных соков и безалкогольных напитков. Развитию дрожжей в них благоприятствует ряд факторов: наличие хорошо сбраживаемых сахаров (фруктоза, глюкоза, сахароза), азотсодержащих и других необходимых соединений, а также низкое рН среды и отно-

сительно анаэробные условия, содействующие подавлению конкурентных видов бактерий. Характерные особенности отдельных видов дрожжей, портящих соки и напитки, — приспособленность их к развитию при низких температурах (при 0 °С), осмофильность и способность адаптироваться к консервирующим веществам, применяемым в промышленности.

Инфицирование недостаточно пастеризованного виноградного сока при хранении вызывают чаще всего представители родов *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Candida*. На ранних стадиях хранения сока преобладают виды, образующие спирт при сбраживании сахаров, на более поздних — главным образом *Candida*, вызывающие изменение его вкуса. В основном те же дрожжи выявляются в яблочном, апельсиновом, земляничном, черничном, вишневом и других соках.

Некоторые дрожжи (*Sacch. cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*) при длительном хранении соков способны накапливать до 6,0—7,0 об. % спирта, а также летучие и нелетучие кислоты.

Условия производства безалкогольных напитков благоприятствуют развитию дрожжей, ауksотрофных в отношении витаминов группы В. Особенно многообразен состав дрожжей, обнаруживаемых на линиях розлива: доминируют виды родов *Candida*, *Hansenula*, в меньших количествах выявляются представители родов *Saccharomyces*, *Pichia* и *Torulopsis* (*Candida*).

Быструю порчу (брожение напитков в бутылках) вызывает *Sacch. cerevisiae*.

В медленной порче в течение нескольких недель хранения участвуют виды, обладающие более слабой бродильной активностью (*Brettanomyces intermedius* (син. *Dekkera intermedia*), *Zygosacch. bailii* и др.).

Развитие дрожжей отрицательно сказывается на качестве напитков: снижается содержание сахара, частично он сбраживается в спирт; продукты жизнедеятельности дрожжей ухудшают вкус напитков, а образующаяся в результате брожения углекислота может вызвать разрыв бутылок.

## Глава 22 МОЛОЧНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

Многие направления практического использования молочнокислых бактерий возникли в глубокой древности, когда человек стихийно начал применять их в повседневной жизни. Первые научные исследования этих микроорганизмов были проведены Л. Пастером; результаты их опубликованы в 1857 г. С тех пор молочнокислые бактерии постоянно привлекают к себе внимание исследователей. На основе их использования создаются и развиваются крупные отрасли народного хозяйства. Успешно разрабатываются также способы борьбы с теми молочнокислыми бактериями, которые наносят урон пищевой и бродильной промышленности.

## 22.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Основным свойством молочнокислых бактерий, позволяющим объединить их в одну физиологическую группу, является способность существовать за счет брожения, накапливая при этом в качестве главного продукта молочную кислоту.

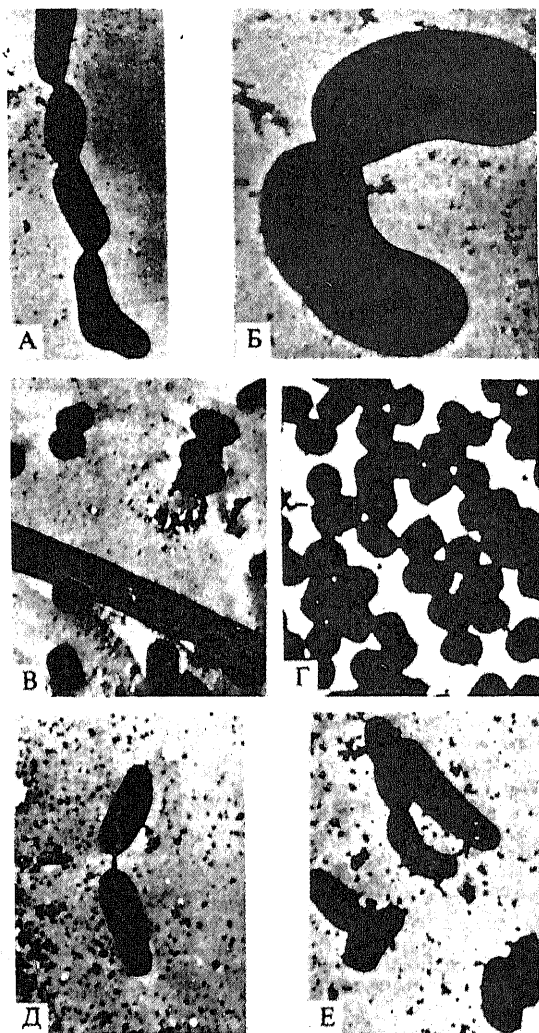


Рис. 22.1. Электронно-микроскопические фотографии клеток, выращенных в жидкой среде. А — *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis*,  $\times 7500$ ; Б — *L. curvatus*,  $\times 24\,000$ ; В — *L. brevis*,  $\times 7800$ ; Г — *L. cellbiosus*,  $\times 7800$ ; Д, Е — *L. coprophilus*,  $\times 7800$

Молочнокислые бактерии, как правило, неподвижны, не образуют спор, положительно окрашиваются по Граму, не восстанавливают нитраты в нитриты, не образуют пигментов, обладают небольшой протеолитической активностью. Цитохромы и каталазу не образуют, но некоторые продуцируют пероксидазу, разлагающую  $H_2O_2$ .

Молочнокислые бактерии делят на две большие группы — гомоферментативные и гетероферментативные. Гомоферментативные в результате брожения образуют главным образом молочную кислоту и лишь ничтожные количества других продуктов (летучих кислот, этилового спирта и углекислоты). Гетероферментативные, помимо молочной кислоты, образуют углекислый газ, уксусную кислоту и (или) этиловый спирт, используя на это до 50% сбраживаемых гексоз.

Молочнокислые бактерии относят к родам *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* и *Pediococcus*.

Т а б л и ц а 22.1. Классификация бактерий рода *Lactobacillus* (по Sharpe, 1979)

№ признака	I Гомоферментативные		II Гетероферментативные	
1 <sup>a</sup>	—		+	
2	—		+	
3	+		—	
4 <sup>a</sup>	<i>Thermobacterium</i>	<i>Streptobacterium</i>	<i>Betabacterium</i>	
5 <sup>a</sup>	+	b	эти признаки различны у разных видов	
6 <sup>a</sup>	—	+	+	
7 <sup>a</sup>	—	+	+	
			Все образуют DL-молочную кислоту из глюкозы	
			II а	II б
				Ацидофильные, устойчивые к этанолу, не сбраживающие большинство углеводов
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. hilgardii</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. trichodes</i>
	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. xylosum</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. fructivorans</i>
	<i>L. lactis</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. desidiolosus</i>
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. coryniformis</i>	<i>L. viridescens</i>	<i>L. heterohiochii</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. confusus</i>	
	<i>L. jensenii</i>			
	<i>L. ruminis</i> } ана-эро-	<i>L. yamanashiensis</i>		
	<i>L. vitulinus</i> } бы			

П р и м е ч а н и я: (—) — признак отрицателен; (+) — признак положителен; а — признак, который следует использовать на начальных этапах идентификации; б — признак варьирует; 1 — образование  $CO_2$  из глюкозы; 2 — для роста требуется тиамин; 3 — имеется альдолаза; 4 — рост при 45°C; 5 — рост при 15°C; 6 — сбраживание рибозы; 7 — образование  $CO_2$  из глюконата.

Род *Lactobacillus* объединяет палочковидные бактерии, форма которых весьма разнообразна — от коротких коккообразных до длинных нитевидных (рис. 22.1). Род, в соответствии с предложением Орла-Иенсена (1919, 1943), подразделяется на три подрода: *Streptobacterium*, *Thermobacterium* и *Betabacterium*. Они различаются рядом признаков (табл. 22.1). Например, термобактерии, в противоположность стрепто- и бетабактериям, растут при 45°C и не растут при 15°C, колонии чаще шероховатые, клетки длинные, нитевидные. Бетабактерии в отличие от двух других подродов образуют газ на средах с углеводами. Среди представителей рода *Lactobacillus* есть гомо- и гетероферментативные виды (табл. 22.1).

Род *Leuconostoc* объединяет гетероферментативные кокковидные бактерии, которые бывают овальными или яйцевидными. Род включает виды *Leuc. cremoris*, *Leuc. dextransicum*, *Leuc. lactis*, *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. oenos*. Лейконостоки по форме клеток иногда сложно отличить от гетероферментативных лактобацилл (бетабактерий). В таких случаях следует помнить, что их представители (не бетабактерии) часто сбрасывают трегалозу, не образуют NH<sub>3</sub> из аргинина и продуцируют D(—)-молочную кислоту из глюкозы.

К роду *Pediococcus* относят гомоферментативные кокковидные бактерии. Деление их клеток происходит в двух плоскостях, в результате чего часто образуются тетрады или гроздьи. Род включает виды *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextransicum*, *P. halophilus*.

Род *Streptococcus* объединяет гомоферментативные бактерии сферической или овальной формы, делящиеся в одной плоскости и располагающиеся парами или цепочками. Стрептококки разделяют на фекальные, молочные, стрептококки ротовой полости (оральные) и пиогенные.

#### Группы стрептококков

Фекальные (энтерококки)	Молочные	Оральные	Пиогенные
<i>S. avium</i> <i>S. bovis</i> <i>S. durans</i> <i>S. equinus</i>	<i>S. cremoris</i> <i>S. lactis</i> <i>S. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	<i>S. milleri</i> <i>S. mitior</i> <i>S. mutans</i> <i>S. salivarius</i>	<i>S. acidominimus</i>  <i>S. agalactiae</i> <i>S. anginosus</i>
<i>S. faecalis</i> (с разновидностями <i>S. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> и <i>S. faecalis</i> subsp. <i>zymogenes</i> ) <i>S. faecium</i> <i>S. faecium</i> subsp. <i>casseliflavus</i>	<i>S. raffinolactis</i> <i>S. thermophilus</i>	<i>S. sanguis</i>	<i>S. disgalactiae</i> <i>S. equi</i> <i>S. equisimilis</i>  <i>S. pyogenes</i> <i>S. uberis</i> <i>S. zooepidemicus</i>

### 22.1.1. Условия работы и питательные потребности

Многие виды молочнокислых бактерий растут не только в анаэробных условиях, но и при доступе молекулярного кислорода. Однако в присутствии  $O_2$  у них не происходит переключения с брожения на аэробное дыхание и не изменяется способ синтеза АТФ (только путем субстратного фосфорилирования). Поэтому молочнокислые бактерии относят к категории аэротолерантных анаэробов.

Характерное свойство молочнокислых бактерий — высокая спиртоустойчивость: некоторые виды могут расти на средах с 15—18% этилового спирта, а единичные — даже при 24%. Способность расти в средах с низким значением рН также свойственна этим микроорганизмам: многие растут при рН от 5,5 до 8,8, некоторые при рН 2,9—3,2. Это дает им возможность преобладать в кислых субстратах. Границы температур, в которых возможна жизнедеятельность молочнокислых бактерий, довольно широки. Для многих видов оптимальная температура 30—40°C, но имеются и термофилы, растущие при 50°C и выше. Некоторые молочнокислые бактерии способны расти при сравнительно низкой температуре (до 3°C).

По потребности в питательных веществах молочнокислые бактерии относятся к наиболее сложным микроорганизмам. Из соединений углерода могут использовать незначительное количество веществ, служащих бактериям источником энергии (моно- и дисахариды, органические кислоты).

Молочнокислые бактерии, как правило, нуждаются в сложных органических соединениях азота. Они растут на средах с подобранными смесями аминокислот, ферментативными или кислотными гидролизатами белков — мяса, лактальбумина, казеина, различных сортов муки. Потребность в наборе и количестве отдельных аминокислот варьирует у различных видов. Большинству необходимы аргинин, цистеин, глутаминовая кислота, лейцин, фенилаланин, триптофан, тирозин, валин. Только некоторые молочнокислые бактерии (стрептококки) могут расти на средах, содержащих аммонийные соли в качестве единственных источников азота.

Большинству молочнокислых бактерий необходимы витамины (рибофлавин, тиамин, пантотеновая, никотиновая, фолиевая кислоты, пиридоксаль и др.). Этим в значительной мере объясняется влияние на рост бактерий добавок к средам различных растительных экстрактов (картофель, морковь, кукуруза и др.), дрожжевого автолизата и других витаминсодержащих соединений. Выраженная потребность отдельных штаммов молочнокислых бактерий в определенных витаминах и аминокислотах используется для определения этих соединений в разнообразных средах до восьми витаминов и до восемнадцати аминокислот).

Рост молочнокислых бактерий стимулируют и некоторые пепти-



ды, пурины (аденин, гипоксантин, гуанин) и пиримидины (урацил, тимин и др.), жирные кислоты (уксусная, олеиновая), а также лимонная кислота (часто вводится в среды для выращивания бактерий).

### 22.1.2. Брожение углеводов

Гомоферментативные молочнокислые бактерии сбраживают глюкозу по фруктозобисфосфатному пути, или пути Эмбдена — Мейергофа — Парнаса (рис. 22.2), сходному со спиртовым. Пируват, однако, не декарболируется до ацетальдегида, как при спиртовом брожении, а используется непосредственно как акцептор электронов (водорода). Образование D(—)-молочной кислоты определяется наличием у молочнокислых бактерий D-лактатдегидрогеназы, L(+)-молочной кислоты — наличием L-лактатдегидрогеназы, а DL-молочной кислоты — синтезом двух лактатдегидрогеназ различной стереоспецифичности.

У гетероферментативных бактерий отсутствуют такие ферменты пути Эмбдена — Мейергофа — Парнаса, как фруктозо-1,6-бисфосфатальдолоза и триозофосфатизомераза.

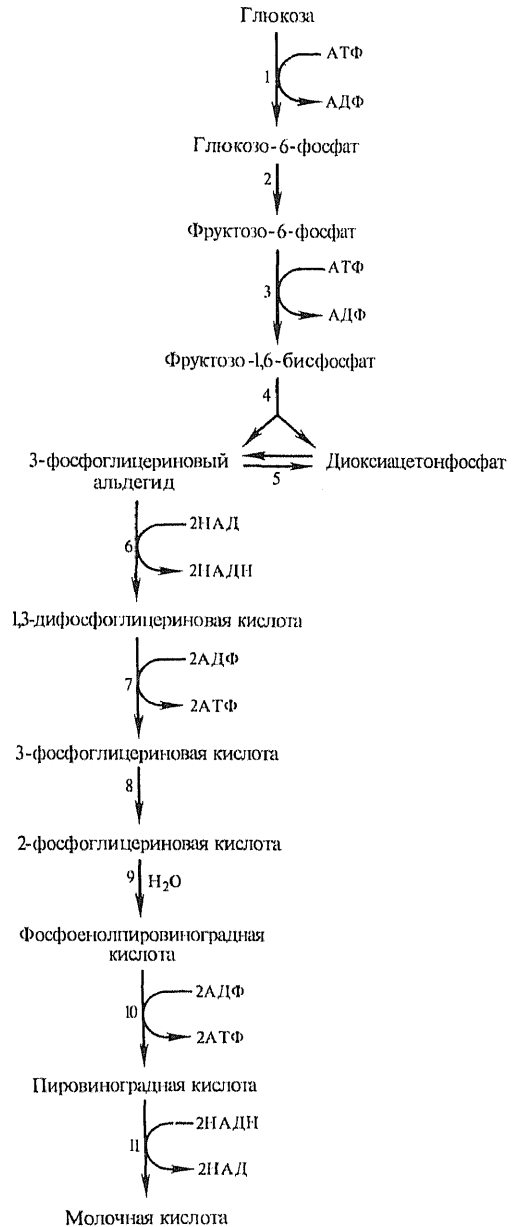


Рис. 22.2. Гомоферментативное молочнокислое брожение.

Ферменты: 1 — гексокиназа, 2 — глюкозофосфатизомераза, 3 — фосфофруктокиназа, 4 — фруктозобисфосфатальдолоза, 5 — триозофосфатизомераза, 6 — дегидрогеназа 3-фосфоглицеринового альдегида, 7 — 3-фосфоглицераткиназа, 8 — фосфоглицеромутаза, 9 — энולהза, 10 — пируваткиназа, 11 — лактатдегидрогеназа

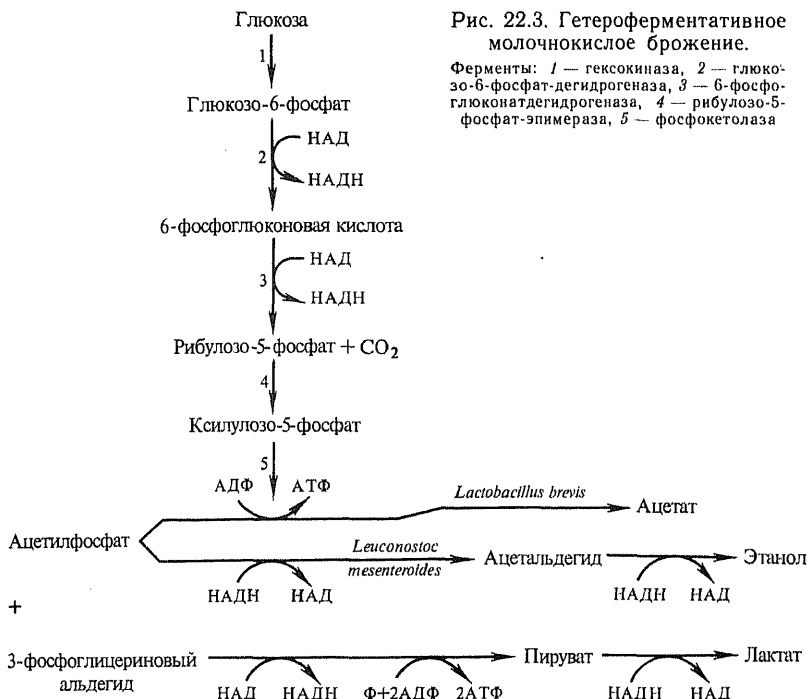


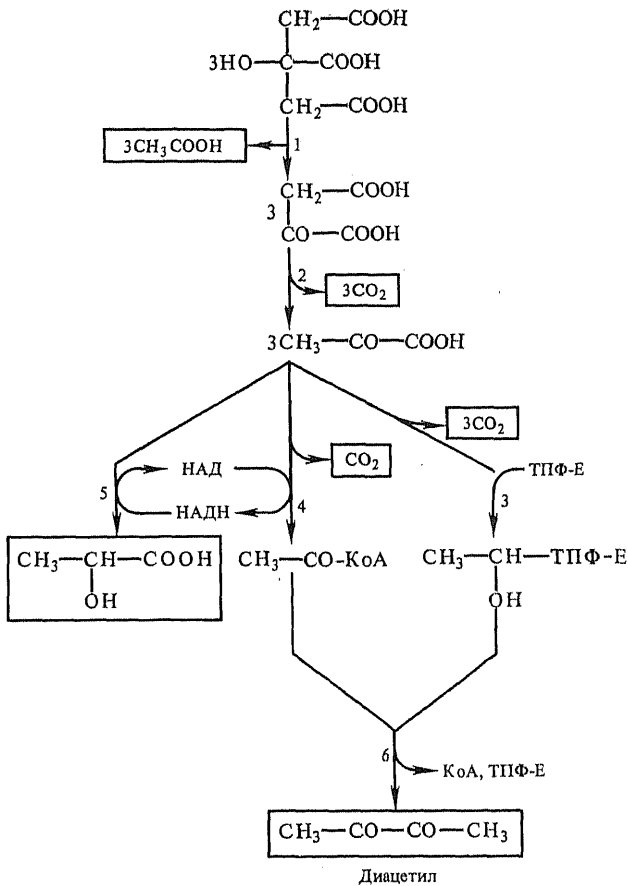
Рис. 22.3. Гетероферментативное молочнокислое брожение.

Ферменты: 1 — гексокиназа, 2 — глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, 3 — 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, 4 — рибулозо-5-фосфат-эпимераза, 5 — фосфокетолаза

Начальное превращение глюкозы идет по пентозофосфатному пути до образования рибулозо-5-фосфата. Под действием эпимеразы последний превращается в ксилулозо-5-фосфат, который в реакции, катализируемой пентозофосфаткетолазой, расщепляется на 3-фосфоглицериновый альдегид и ацетилфосфат (рис. 22.3). Дальнейшее превращение 3-фосфоглицеринового альдегида происходит, как при гомоферментативном молочнокислом брожении (см. рис. 22.2). Из ацетилфосфата у одних бактерий образуется ацетат (реакция сопровождается синтезом АТФ), у других — восстанавливается до этанола через промежуточное образование ацетил-КоА и ацетальдегида. При гомоферментативном брожении на один моль сброженной глюкозы образуется два моля АТФ, при гетероферментативном — один моль АТФ.

Кроме глюкозы молочнокислые бактерии сбраживают и другие сахара. Так, многие гомо- и гетероферментативные виды (*L. plantarum*, *L. brevis* и др.) интенсивно используют пентозы, иногда даже активнее, чем глюкозу. Пентозы превращаются в D-ксилулозо-5-фосфат, затем расщепляющийся при участии фосфокетолазы — ключевого фермента гетероферментативного брожения — на ацетилфосфат и 3-фосфоглицериновый альдегид, дающие в итоге молочную и уксусную кислоты.

Гетероферментативные молочнокислые бактерии сбраживают фруктозу, поскольку у них имеется маннитдегидрогеназа,



Суммарное уравнение:  $3 \text{ цитрат} \rightarrow \text{лактат} + 3 \text{ ацетат} + 5\text{CO}_2 + \text{диацетил}$

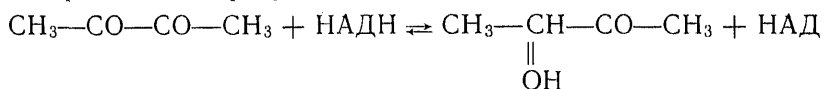
Рис. 22.4. Образование молочнокислыми бактериями диацетила из цитрата (По Готшалку, 1982).

Ферменты: 1 — цитрат-лиаза, 2 — оксалоацетатдекарбоксилаза, 3 — неохарактеризованный фермент, 4 — пируватдегидрогеназный комплекс, 5 — лактатдегидрогеназа, 6 — диацетилсинтаза, TPP-E — фермент, содержащий тиаминпирофосфат

осуществляющая восстановление фруктозы до маннита. Продукты сбраживания фруктозы — лактат, ацетат, маннит и углекислый газ.

Гомоферментативные (*S. lactis* subsp. *diacetylactis* и др.) и гетероферментативные (*Leuc. dextranicum* и др.) молочнокислые бактерии сбраживают лимонную кислоту с образованием, помимо других продуктов, диацетила — ароматического вещества, обуславливающего характерный приятный запах сливочного масла. В реакции, катализируемой цитрат-лиазой — ключевым ферментом брожения цитрата, последний распадается на ацетат и оксалоацетат (рис. 22.4). Ацетат выделяется во внешнюю

среду, а оксалоацетат декарбоксилируется с образованием пирувата. Диацетил синтезируется в результате реакции ацетил-КоА с «активным ацетальдегидом» (комплекс фермент — оксиэтил-тиаминпирофосфат). При восстановлении диацетила ацетоиндегидрогеназой образуется ацетоин:



### 22.1.3. Выделение и хранение

Сложные питательные потребности самих молочнокислых бактерий создают значительные трудности при их выделении и особенно количественном учете в различных природных и производственных субстратах. К тому же многие представители этой группы бактерий растут очень медленно и «заглушаются» сопутствующими микроорганизмами. Достаточно сложно и хранение чистых культур, так как они легко теряют свою активность и производственно ценные свойства.

Для выделения молочнокислых бактерий используют среды, обеспечивающие в должной мере их питательные потребности и угнетающие рост посторонних микроорганизмов. Последнее достигается применением различных веществ, например азида натрия, ацетата таллия, сорбиновой и уксусной кислоты, этилового спирта, а также снижением рН среды. Выделение молочнокислых бактерий (особенно, когда они превалирующие в субстрате), учет и культивирование их успешно осуществляют, например, на среде МРС следующего состава (%): дрожжевой экстракт — 0,5; мясной экстракт — 1,0; пептон — 1,0; глюкоза — 2,0; лимоннокислый аммоний — 0,2; уксуснокислый натрий — 0,5; твин-80 — 0,1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,02;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  — 0,05; рН 6,2—6,6. Готовят среду МРС на гидролизованном молоке, разведенном в два раза дистиллированной водой. Применяют также среду МРС-1: на 1 л среды (в отличие от среды МРС) добавляют 0,2 г цистеина, 50 мл дрожжевого автолизата и 100 мл печеночного экстракта.

Молочнокислые бактерии можно выделять также на среде другого состава (%): растительный (капустный, морковный) отвар — 10; дрожжевой автолизат — 1,0; пептон — 1,0; глюкоза — 2,0; этиловый спирт — 8—16 (подавляет рост посторонних им микроорганизмов). Спирт следует вносить в засеянную испытуемым субстратом жидкую среду через 18—24 ч культивирования. Из жидкой среды производят высеивание на агаризованную среду того же состава, но без спирта, в которую добавляют 4% измельченного мела. Молочнокислые бактерии при росте на данной среде образуют вокруг колоний зоны просветления, обусловленные превращением нерастворимого углекислого кальция в растворимый лактат кальция. Известны и многие другие среды.

Выделение некоторых молочнокислых бактерий следует проводить в атмосфере, содержащей 90%  $H_2$  и 10%  $CO_2$ .

Для длительного хранения молочнокислые бактерии замораживают при температуре жидкого азота; при посеве уколом в столбик, например, полужидкой среды МРС-1, содержащей до 0,25% глюкозы или посева в другие среды (молоко с мелом и др.), а также на питательных средах того или иного состава, к которым добавляют 8—12% этилового спирта.

## 22.2. РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ВЗАИМООТНОШЕНИЯ С ДРУГИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Молочнокислые бактерии — одна из широко распространенных в природе групп микроорганизмов — содержатся в филлосфере (на листьях, цветах, стеблях растений, овощах и фруктах). Среда обитания молочнокислых бактерий — почва, где они в наибольшем количестве концентрируются в верхних горизонтах, аккумулируются они и в ризосфере дикорастущих и особенно культурных растений.

Обитают молочнокислые бактерии в желудочно-кишечном тракте человека и животных. В большом количестве они содержатся в толстом кишечнике. Особенно богат ими кишечник долгожителей (старше 90 лет).

В природе необходимые для своей жизнедеятельности питательные вещества молочнокислые бактерии находят у живых (выделениях корней и надземных органов) и отмерших растений; в продуктах метаболизма почвенных и ризосферных микроорганизмов; в пищеварительном тракте человека и животных, используя его выделения и обитающих в нем микроорганизмов.

Необходимо подчеркнуть, что молочнокислые бактерии обитают почти во всех растительных и животных материалах, которые человек вовлекал в сферу своей хозяйственной деятельности и содержащих достаточное количество сбраживаемых углеводов, продукты распада белков, витамины (табл. 22.2). Развиваясь в природных и производственных субстратах, молочнокислые бактерии вступают в разнообразные взаимоотношения с другими микроорганизмами.

Антагонизм молочнокислых бактерий обусловливается действием молочной кислоты, которую они продуцируют. Однако среди молочнокислых бактерий удалось обнаружить и явления специфического антагонизма. Они образуют антибиотики: *S. lactis* синтезирует низин, *S. cremoris* — диплококцин, *L. acidophilus* — ацидофилин и лактоцидин, *L. plantarum* — лактолин, *L. brevis* — бревин и др.

Наиболее полно изучен низин — полипептид с молекулярной массой 3500, по аминокислотному составу и другими свойствами сходный с субтилином. Низин бактериостатически действует на пропионовокислые бактерии, стафилококки, но не подавляет рост грамотрицательных бактерий, микромицетов, дрожжей.

Т а б л и ц а 22.2. Видовой состав молочнокислых бактерий, выявляемых в производственных субстратах

Сырое молоко и молочные продукты	Квашеные растительные продукты, силос	Растительные консервы, пиво, вино, квас, садр, саке	Субстраты и оборудование сахарных, спиртовых и ацетионовых бутылочных заводов	Мясные и рыбные продукты	Бродящие зерновые заборы	Ржаное тесто	Комбикорм
<i>S. cremoris</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. damnosus</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>S. lactis</i>
<i>S. lactis</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>P. ceus</i>	<i>Leuc. dextranonicum</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>S. faecalis</i>
<i>S. lactis</i> subsp. <i>diacetilactis</i>	<i>Leuc. paramesenteroides</i>	<i>Leuc. oenos</i>	<i>L. brevis</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>L. fermentatum</i>	<i>L. casei</i>	<i>S. faecium</i>
<i>S. raffinolactis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. roides</i>	<i>L. fermentatum</i>	<i>L. leichmannii</i>	<i>Leuc. dextranonicum</i>
<i>S. thermophilus</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>Leuc. dextranonicum</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. leichmannii</i>	<i>L. leichmannii</i>	<i>L. brevis</i>
<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. confusus</i>	<i>Leuc. dextranonicum</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. mannii</i>		<i>L. casei</i>
<i>Leuc. cremonis</i>	<i>L. coryniformis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. buchneri</i>			<i>L. delbrueckii</i>
<i>Leuc. dextranicum</i>	<i>L. confusus</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. fermentatum</i>	<i>L. casei</i>			<i>L. fermentatum</i>
<i>Leuc. lactis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. plantarum</i>			<i>L. fermentatum</i>
<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. leichmannii</i>	<i>L. viridescens</i>			<i>L. plantarum</i>
<i>Leuc. paramesenteroides</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. plantarum</i>				
<i>L. brevis</i>		<i>L. fermentum</i>					
<i>L. bulgaricus</i>		<i>L. fructivorans</i>					
<i>L. casei</i>		<i>L. rans</i>					
<i>L. curvatus</i>		<i>L. heterohydrophilus</i>					
<i>L. helveticus</i>		<i>L. hilgardii</i>					
<i>L. lactis</i>		<i>L. homiochilii</i>					
<i>L. plantarum</i>		<i>L. plantarum</i>					
<i>L. xylosum</i>		<i>L. trichodes</i>					
		<i>L. viridescens</i>					
		<i>L. yamamashiensis</i>					

Из *S. lactis* subsp. *diacetylactis* получено антибиотическое вещество, отличающееся от других антибиотиков — пептидов, синтезируемых молочнокислыми бактериями, внеклеточной локализацией, активностью против ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий. *L. fermentum* и *L. brevis*, выделенные от здоровых взрослых людей, продуцируют лизоцим.

В кишечном тракте долгожителей Абхазии обнаружено значительное число молочнокислых бактерий — антагонистов по отношению к видам родов *Klebsiella*, *Shigella*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*. Особенно высоким антагонизмом обладали *S. faecium*, а также *S. thermophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*. Большое содержание молочнокислых палочек и кокков, обладающих значительной физиологической активностью и особенно антагонизмом, положительно коррелирует с хорошим состоянием здоровья и играет, видимо, определенную роль в создании феномена долголетия человека. В последние годы установлено, что ряд видов молочнокислых бактерий стимулирует образование интерферона.

Молочнокислые бактерии (особенно *S. faecium* и *L. salivarius*), выделенные от домашних птиц, в большинстве оказывали сильное угнетающее действие на возбудителей коли-бактериозов этих животных. Аналогичные наблюдения были описаны и для молочнокислых бактерий насекомых и рыб. Оказывающее действие против некоторых возбудителей инфекции оказывают молочнокислые бактерии, обитающие в организме человека и животных и образующие пероксид водорода. Некоторые лактобациллы и педиококки активно подавляют развитие *Pseudomonas fragi* и других психрофильных грамотрицательных бактерий в пищевых продуктах, хранящихся при 5—7°C, именно за счет образования пероксида.

И. И. Мечников был первым, кто привлек внимание к использованию антагонистических свойств молочнокислых бактерий в борьбе с гнилостными микроорганизмами кишечного тракта. Для нормализации состава микроорганизмов пищеварительного тракта и борьбы с рядом кишечных заболеваний (диспепсия, энтероколиты, дизентерия и др.) все шире начинают использовать молочнокислые бактерии, обладающие антагонистическими свойствами по отношению к условно-патогенным и патогенным микробам. Применяют изготовленные на них кисломолочные продукты и сухие препараты. Положительные результаты дали кисломолочные продукты, изготовленные с использованием *L. acidophilus*, и сухие препараты *L. plantarum*. Промышленный выпуск продуктов и препаратов, изготовленных с использованием чистых и ассоциативных культур молочнокислых бактерий, обладающих описанными выше свойствами, неуклонно расширяется. В ряде исследований показано их оздоравливающее влияние на организм не только человека, но и сельскохозяйственных животных.

Есть сведения о положительном действии молочнокислых бак-

терий при лучевых поражениях (они содействуют выведению радионуклидов).

Различные виды молочнокислых бактерий могут вступать между собой в муталистические взаимоотношения. Например, при исключении из среды некоторых факторов роста (витаминов группы В и аминокислот), необходимых для двух штаммов, они могут расти в симбиозе, так как каждый из них продуцирует биологически активные вещества, используемые другим. Наличие мутализма среди молочнокислых бактерий послужило основой для разработки методов изучения синтеза ряда факторов роста.

Молочнокислые бактерии и дрожжи, видимо, давно приспособились к совместному развитию в одних и тех же субстратах. Человек с незапамятных времен использует деятельность этих микроорганизмов для приготовления многих продуктов питания (ржаного хлеба, кефира, кумыса, мацони, йогурта, кваса и др.). В этих продуктах совместная деятельность обеих групп микроорганизмов, развивающихся в определенных отношениях, обуславливает определенное их качество. В процессе роста дрожжи обогащают среду рядом продуктов своего метаболизма и делают ее более благоприятной для развития молочнокислых бактерий. Последние в присутствии дрожжей могут развиваться на средах, непригодных для их самостоятельного роста. Подкисление среды молочнокислыми бактериями дает дрожжам преимущество в борьбе с конкурентными видами. Молочнокислые бактерии обладают системой протеолитических ферментов; расщепляя сложные азотсодержащие соединения, они благоприятствуют питанию дрожжей. Некоторые виды дрожжей обладают способностью ассимилировать и органические кислоты, образуемые молочнокислыми бактериями. Но определенные виды дрожжей и молочнокислых бактерий могут проявлять и антагонистические свойства.

## **22.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

### **22.3.1. Молочная промышленность**

Свежее молоко при обычных условиях получения содержит микроорганизмы (несколько тысяч в 1 мл), источником которых может быть вымя, кожа животных, посуда и аппаратура, воздух и обслуживающий персонал. При плохих санитарных условиях количество бактерий в молоке может достигнуть сотен тысяч и миллионов в 1 мл.

В молоке, полученном при соблюдении санитарных правил преобладают микрококки и небольшое количество энтерококков. Загрязненное молоко обсеменено энтеробактериями, молочнокислыми и гнилостными бактериями. Длительное хранение молока при температуре выше 10°C ведет к смене развития в нем определенных групп микроорганизмов, которая очерчивается несколькими фазами.



Бактерицидная фаза характеризуется тем, что после дойки в молоке не отмечается размножение бактерий благодаря действию таких веществ, как лактенин 1 и лактенин 2. Продлить эту фазу можно путем немедленного охлаждения молока после доения.

*Фаза смешанной микрофлоры* характеризуется развитием всех групп микроорганизмов, имеющихся в молоке. К концу фазы молочнокислые бактерии преобладают над остальными микроорганизмами.

*Фаза молочнокислых бактерий* определяется преимущественным развитием данных микроорганизмов, вызывающих сквашивание молока. При хранении его молочнокислые стрептококки отмирают, а количество молочнокислых палочек постепенно увеличивается.

*Фаза дрожжей и мицелиальных грибов* наступает при развитии этих микроорганизмов в молоке, имеющем высокую кислотность. Последняя постепенно снижается благодаря жизнедеятельности грибов, что создает благоприятные условия для развития гнилостных микроорганизмов, разлагающих белки молока.

Для сохранения молока применяют тепловую обработку, включающую пастеризацию или стерилизацию. Пастеризацию проводят при различных режимах, например, при 63—65°C в течение 30 мин, при 74—76°C в течение 15—20 с и при 85—87°C без выдержки. Эффективный способ повышения стойкости молока — стерилизация, обычно осуществляемая при 105—115°C в течение около 30 мин.

Молочнокислое брожение играет ведущую роль при получении многих кисломолочных продуктов, масла, сыра.

Для обеспечения активного брожения применяют жидкие или сухие закваски, в состав которых входят чистые культуры определенных видов молочнокислых бактерий. Подбирая компоненты заквасок, необходимо учитывать специфические свойства приготавливаемого продукта: характер взаимоотношения между компонентами заквасок; устойчивость молочнокислых бактерий к присутствующим в молоке естественным ингибиторам, обуславливающим его бактерицидность; устойчивость к антибиотикам и ряду дезинфицирующих веществ, находящихся в молоке.

Важно, чтобы молочнокислые бактерии заквасок были устойчивы к бактериофагам. Фаги стрептококков молочной группы широко распространены в сборном сыром молоке, пастеризованном молоке, сыворотке сырного чана, пахте. В производственных заквасках обнаружены фаги, активные в отношении лактобацилл (например, *L. helveticus*, *L. lactis*), используемых при приготовлении сыров, а также йогурта. Естественным источником бактериофагов являются почва и растения, а в молоко они попадают из кормов, с кожи и вымени животных и т. д. В производственных условиях инактивация фага достигается нагреванием молока при 90°C не менее 30 мин. Чередование заквасок, включающих неродственные по фагочувствительности

штаммы, — обоснованное мероприятие по борьбе с накоплением фага в производстве.

Приготовление кисломолочных изделий (в СССР производится около тридцати видов) основывается на использовании специфических для каждого изделия заквасок. Так, например, при получении простокваши обыкновенной применяют *Streptococcus lactis*, *S. lactis* subsp. *diacetilactis*. Эти виды, а также *S. cremoris* вводят в закваски и для получения сметаны. Творог изготавливают с применением *S. lactis* и *S. lactis* subsp. *diacetilactis*; для ускоренного получения продукта используют равные количества и термофильных *S. thermophilus* и мезофильных стрептококков; сквашивание ведут при 38—40°C.

В СССР на использовании термофильных стрептококков и лактобацилл (*L. bulgaricus*) основано приготовление напитков «Южный», «Снежок», ряженки, варенца. Йогурт также изготавливают с применением этих бактерий.

Ацидофильное молоко и ацидофильную пасту получают сквашиванием пастеризованного молока *L. acidophilus*. Ряд продуктов — кефир, кумыс, чал, курунга и др. — готовят с использованием многокомпонентных заквасок, в которые кроме молочнокислых бактерий вводят дрожжи, а часто и уксуснокислые бактерии. В кумысе выявляют обычно *Lactobacillus bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Saccharomyces lactis*, *Sacch. cartilagenosus*, *Acetobacter aceti*.

Для производства кефира в качестве закваски используют «кефирные грибки», а также искусственные закваски. Считают, что тело грибка представляет собой переплетение нитевидных грамположительных бактерий; на поверхности грибка в уплотненном слое находятся дрожжи и молочнокислые стрептококки, а во внутреннем рыхлом ячеистом слое — уксуснокислые бактерии. В состав подобранных для кефира заквасок вводят молочнокислые бактерии, дрожжи и уксуснокислые бактерии; последние способствуют созданию густой консистенции закваски и кефира, а также специфического вкуса.

В закваски для приготовления кислосливочного масла вводят *S. lactis*, *S. cremoris* как кислотообразователи, а *S. lactis* subsp. *diacetilactis* как продуцент ароматических веществ (ди-ацетила, ацетонина); последние иногда накапливаются до 10—30 мг/л молока. При получении масла поточным способом при 30°C хорошие результаты дает применение закваски, состоящей из *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* и *S. lactis* subsp. *diacetilactis*, а также закваски, включающей *S. thermophilus* и *S. lactis* subsp. *diacetilactis*.

Созревание сыров происходит под воздействием сычужного фермента и протеаз молочнокислых бактерий, которые уже с момента прессования сырной массы являются основными среди микроорганизмов, входящих в сыры. Установлена ведущая роль молочнокислых бактерий в протеолитическом расщеплении белков в процессе созревания сыров. Они играют также некоторую

роль в созревании сыра, расщепляя жир молока. Имеется прямая зависимость между степенью созревания сыра, его вкусом, ароматом и содержанием в нем свободных аминокислот, накапливаемых протеолитически активными молочнокислыми бактериями. Считают, что ведущая роль в образовании характерного вкуса и запаха сыра все же принадлежит продуктам превращения аминокислот. Лейцин и валин могут служить предшественниками 3-метилбутанола и 2-метилпропаната — соединений, придающих специфический вкус сыру чеддер. Определенная роль в создании вкуса сыра принадлежит органическим (в том числе летучим) кислотам, образуемым молочнокислыми бактериями. Газообразующие штаммы последних (не только пропионовокислые бактерии) создают в некоторых сырах рисунок — глазки. Роль молочнокислых бактерий в сыре сводится и к подавлению развития нежелательных микроорганизмов (маслянокислых бактерий). Для сырных заквасок подбирают протеолитически активные штаммы молочнокислых бактерий, состав последних определяется технологией приготовления сыра.

### **22.3.2. Производство хлебопродуктов**

Существенную роль в создании вкуса и аромата хлеба, особенно ржаного, а также его усвояемости играют различные виды гомо- и гетероферментативных молочнокислых бактерий. В результате сбраживания сахаров в тесте они образуют углекислый газ, молочную и уксусную кислоты, а также этиловый спирт. Гомо- и гетероферментативные лактобациллы осуществляют, кроме того, протеолиз белков муки, способствуя накоплению в заквасках и тесте азотсодержащих водорастворимых веществ, играющих определенную роль и в создании аромата хлеба. Образованные молочнокислыми бактериями кислоты, не влияя на дрожжи, подавляют гнилостные, маслянокислые, уксуснокислые бактерии и представителей энтеробактерий.

В практике хлебопечения издавна используют способствующие поднятию теста закваски, включающие штаммы гомо- и гетероферментативных молочнокислых бактерий. Основы их применения в хлебопечении изложены в гл. 21.

### **22.3.3. Биологическое консервирование**

Молочнокислое брожение используется человеком для консервирования различных растительных продуктов питания — *квашения*. Этот способ их хранения обладает рядом достоинств: в продукты, как правило, не вводятся химические консерванты и они не подвергаются большим термическим воздействиям. Сохранение продукта достигается благодаря развитию в нем молочнокислых бактерий. Вещества, образующиеся в процессе их жизнедеятельности (особенно молочная кислота), оказывают подавляющее воздействие на микроорганизмы — потенциальные

возбудители порчи (гнилостные, маслянокислые и др.). Квашенные овощи и фрукты приобретают приятные органолептические свойства и оказывают полезное воздействие на организм человека.

Молочнокислое брожение находит широкое применение и для биологического консервирования различных кормовых растительных материалов — силосования. В настоящее время в нашей стране оно приобрело крупные, по сути промышленные масштабы.

*Силосование* — сложный микробиологический процесс. С растительной массой в силосохранилище попадает огромное количество разнообразных микроорганизмов. Во время силосования на отмерших растениях многие из них начинают бурно размножаться. Питательной средой для микроорганизмов при этом служат главным образом соки растений. Одна из основных задач техники силосования — создание условий для жизнедеятельности молочнокислых бактерий и подавления вредных микроорганизмов.

После закладки растительной массы в силосные сооружения и плотной утрамбовки аэробные бактерии начинают быстро отмирать. Активно размножаются бактерии, способные к росту в анаэробных условиях, — представители энтеробактерий, *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* и *Lactobacillus*. В первые дни после закладки в силосе из группы молочнокислых бактерий доминируют кокки (педиококки, *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. faecalis* subsp. *liquefaciens*, *Leuc. mesenteroides*). Появляются в этот период и молочнокислые палочки — *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermenti*, *L. plantarum*. Особо важную роль играют стрептококки; они способны конкурировать с грамотрицательными бактериями в начальный период силосования.

В период силосования от 8 до 15 сут доминирующие в начале брожения стрептококки вытесняются, увеличивается количество педиококков, лейконостоков и гомоферментативных, а позже гетероферментативных лактобацилл. В основной и конечной стадиях брожения силосов ведущую роль играют палочковидные молочнокислые бактерии (*L. brevis*, *L. plantarum*) и педиококки.

Постепенное уменьшение общего числа бактерий, начинающееся после 15 сут силосования, охватывает период приблизительно в 60 сут. Количество микроорганизмов за это время снижается до 1 млн. в 1 г (в период 1—8 сут при 22—40°C может достигать миллиарда).

Направленность микробиологических процессов в растительной массе, заложенной в силосные сооружения, определяется рядом факторов. В силосе с небольшим количеством сахара рост молочнокислых бактерий прекращается в более ранние сроки, чем в силосе с высоким содержанием сахара. Внесение дополнительных питательных веществ (мелассы, сахарной муки, муки и солода) в силосную массу, состоящую из малосахарис-

тых растительных материалов, для направленного стимулирования развития этих микроорганизмов давно успешно используется в практике.

В последние годы большое внимание уделяется приготовлению *сенажа*. Биологическому консервированию в силосных сооружениях при этом подвергается измельченная растительная масса, предварительно подсушенная (подвяленная) чаще всего до 55—65% влажности. Относительная сухость, создаваемая в сенаже, замедляет развитие молочнокислых бактерий, а также оказывает губительное влияние на рост нежелательных микроорганизмов.

Применение заквасок чистых культур молочнокислых бактерий особенно результативно при силосовании относительно трудносилосируемых растений.

Штаммы молочнокислых бактерий, селекционированные для силосования, размножают в производственных условиях, готовят из них высушенные препараты и вносят вместе с небольшим количеством воды в измельченную растительную массу в момент закладки ее в силосное сооружение.

Для силосования используют штаммы (*L. plantarum*, *L. casei*, *S. lactis* subsp. *diastaticus* и др.), обладающие значительной ферментативной активностью. Хорошие результаты достигаются при использовании препаратов, в состав которых входит *S. faecium* совместно с *лактобациллами*. При кормлении животных силосом, приготовленным на этих бактериях, лучше подавляется рост вредных микроорганизмов в кишечном тракте, возрастают привесы.

За рубежом предложено несколько патентных препаратов, в состав которых, помимо молочнокислых бактерий, включены другие микроорганизмы и ферменты. Сообщается о эффективном использовании их при силосовании.

*Квашение капусты* осуществляется в присутствии поваренной соли. Ее добавляют к нарезанной капусте в количестве 1,5%. Добавка соли позволяет извлечь сок из растительных тканей, подавить развитие нежелательных микроорганизмов и этим способствует жизнедеятельности молочнокислых бактерий.

В подготовленной для квашения капусте через несколько часов при самопроизвольном брожении развиваются энтеробактерии и другие виды, способствующие образованию ряда продуктов (муравьиной, уксусной кислот, небольшого количества молочной и янтарной кислот, этанола и газообразных соединений), придающих ей специфический запах. Вскоре начинают быстро размножаться молочнокислые гетероферментативные кокки (*Leuc. mesenteroides* и др.); они становятся преобладающими к концу 2—3-х суток брожения. Именно эти организмы считают ответственными за запах доброкачественного продукта. Кроме молочной кислоты кокки образуют уксусную кислоту, этиловый спирт, эфиры, CO<sub>2</sub>, маннит; присутствие последнего придает капусте горьковатый привкус.

Через 4—6 сут брожения кокковые формы сменяются в основном гомоферментативными молочнокислыми палочками (*L. plantarum* и др.), которые накапливают до 1,5—2% кислоты и доводят процесс молочнокислого брожения до конца. *L. plantarum* используют маннит и этим устраняют горький привкус капусты.

Применение заквасок молочнокислых бактерий при квашении капусты, так же как и при силосовании кормов, дает положительные результаты. При удачном подборе заквасок и правильном их применении улучшаются органолептические свойства капусты, при длительном хранении в ней лучше сохраняются питательные вещества и витамины. Закваску равномерно разбрызгивают по шинкованной капусте во время ее загрузки в емкости. Брожение проводят при 22—24°C в течение 3—4 сут до накопления 0,6% молочной кислоты, затем капусту герметизируют и хранят при низкой температуре (лучше +1°C).

*Соление огурцов* — один из наиболее широко распространенных приемов их консервирования. Отобранные овощи заливают рассолом (6—8% поваренной соли, в зависимости от размеров огурцов) и добавляют различные специи. Залитые рассолом огурцы в бочках оставляют на специальных площадках для прохождения предварительной ферментации (как правило, при 20—25°C на 24—48 сут). Ферментация считается законченной после накопления в рассоле 0,3—0,4% молочной кислоты. После предварительного брожения бочки с огурцами хранят при низкой температуре в холодильниках, ледниковых буртах или в траншеях со льдом и т. д., где в течение 40—45 сут (дней) происходит дальнейшее накопление молочной кислоты (до 1%). Готовые соленые огурцы кроме молочной кислоты содержат уксусную кислоту и спирт, следы глицерина и маннита, небольшие количества ароматических веществ. Использование при засолке огурцов заквасок молочнокислых бактерий дает положительные результаты, но еще не широко применяются в практике.

*Квашение яблок* также основано на применении молочнокислого брожения. Яблоки в емкостях рекомендуется заливать рассолом, содержащим до 1,5% поваренной соли, 3% сахара, 1% ячменного или ржаного солода (в виде солодового сусли), 0,25% сухой горчицы. В благоприятных температурных условиях (12—19°C) предварительная ферментация проходит в течение 8—10 сут, при этом в рассолах накапливается 0,3—0,4% молочной кислоты. Затем яблоки помещают в погреб или холодильник, где молочнокислое брожение продолжается до образования 0,6—1,5% молочной кислоты. Хорошие результаты дает использование в этом процессе молочнокислых бактерий *L. plantarum* и холодостойкой шампанской расы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Закваски добавляют в количестве 0,5%. Соленые яблоки, приготовленные в производственных условиях с применением чистых культур микроорганизмов, имеют значительно лучшие показатели, чем засоленные без заквасок.

При засолке яблок, помидоров, свеклы, маслин и других овощей спонтанное молочнокислое брожение протекает с участием тех же видов микроорганизмов, о которых упоминалось выше при описании процессов заквашивания других растительных продуктов.

Молочнокислые бактерии развиваются при так называемом «мокром» способе обработки кофе. Определенную роль они играют и в процессе замачивания зерна при производстве кукурузного крахмала. Молочнокислое брожение протекает также при изготовлении кваса (см. гл. 21).

Процессы брожения играют важную роль при производстве таких продуктов питания, как корейское «кимчи», получаемого при сбраживании китайской капусты, редиса и других овощей; индийского «идли» — кислых лепешек из риса и неочищенного черного горошка, филиппинских «путо» — кислых рисовых лепешек, нигерийского «оги» — кислой каши из кукурузы, сорго или проса, «гари» — крапчатого крахмалистого продукта из корней маниока и других национальных пищевых продуктов.

#### 22.3.4. Мясная и рыбная промышленности

Молочнокислые бактерии находятся в мясных продуктах, как прошедших термическую обработку, так и охлажденных. Посолочные ингредиенты, в частности поваренная соль, не подавляют рост тех из них, которые обладают устойчивостью к высокой концентрации соли (16—24% NaCl).

Важна роль молочнокислых бактерий при приготовлении сырокопченых («ферментативных») колбас. Они придают им специфический букет, резко подавляют рост гнилостных микроорганизмов, оказывают благоприятное влияние на консистенцию, связанность и цвет фарша. Количество молочнокислых бактерий возрастает во время созревания колбас. В хорошо высушенной колбасе содержатся почти исключительно лактобациллы. В свиных копченых мясных продуктах (бекон, окорок, грудинка, корейка) после посола также преобладают молочнокислые бактерии; большое число их обнаружено в заливочных рассолах, используемых для сокращенных и длительных посолов окороков.

Селекционированы штаммы педиококков, стрептококков и лактобацилл, применяемые как компоненты заквасок для сухих и сырокопченых колбас. Бактериальная закваска (*S. lactis* и *L. plantarum*) рекомендована к применению при посолке окороков.

Молочнокислые бактерии играют роль в созревании *посоленной рыбы*. Сельдевые после посола в процессе хранения приобретают новый «букет» и новые вкусовые качества, очевидно, благодаря развитию гетероферментативных ароматообразующих кокков. *Leuc. mesenteroides*, *L. plantarum*, *Pediococcus* sp. используют для приготовления национального блюда жителей

Филиппин, включающего мясо, рыбу, а также рис. Микробиологические процессы в рыбных силосах (измельченная рыба, солодовая и зерновая мука) близки к процессам, протекающим в силосах из зеленых кормов.

### 22.3.5. Получение молочной кислоты и декстрана

Молочная кислота широко применяется в ряде отраслей народного хозяйства и медицины. Преимущество микробиологического способа получения ее перед химическим состоит в возможности направленного синтеза определенного изомера кислоты, например изомера L(+). Разделение смеси изомеров молочной кислоты, производимой на основе химического синтеза, технически сложно и существенно удорожает производство.

При производстве молочной кислоты применяют разные виды молочнокислых бактерий, что обусловлено составом сбраживаемого сырья. В СССР пищевую молочную кислоту получают с помощью *L. delbrueckii* на среде, составленной из нескольких компонентов: кормовая или рафинадная патока, солодовые ростки и фосфорнокислый аммоний. Процесс проходит при 49—50°C. Образующуюся молочную кислоту периодически нейтрализуют мелом и выделяют. Весь цикл брожения заканчивается за 7—10 сут.

Для получения молочной кислоты с помощью *L. bulgaricus* возможно использовать молочную сыворотку, а при применении *L. brevis* сырье, содержащее пентозы, — гидролизаты кукурузных кочерыжек, стеблей соломы и др.

Декстран (глюкан), образуемый в большом количестве *Leuc. mesenteroides*, применяются в пищевой промышленности в качестве стабилизатора при приготовлении сахарных сиропов, кондитерских изделий, мороженого и других продуктов. В медицинской практике используют препарат полиглюкан — среднемолекулярную фракцию частично гидролизованного декстрана, растворенную в изотоническом растворе NaCl. Для получения декстрана применяют селекционированные штаммы *Leuc. mesenteroides*. Технологический процесс проводят при выращивании бактерии на очищенных средах с сахарозой. Найдены также штаммы *L. brevis* — активные продуценты D-глюкозоизомеразы.

### 22.4. МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ — ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИИ

Многие пищевые продукты являются благоприятной средой для развития молочнокислых бактерий. Особенно подвержены порче продукты, содержащие питательные компоненты, необходимые для роста молочнокислых бактерий в оптимальных концентрациях, а ингибирующие вещества находятся в них в минимуме или отсутствуют.



### 22.4.1. Пищевые продукты

Консервированные фрукты, овощи, соки, желе и другие *растительные продукты* при недостаточной стерилизации или нарушении герметичности банок могут подвергаться порче как одними молочнокислыми бактериями, так и в ассоциации их с другими микроорганизмами. Высококислотным консервам наиболее опасны лактобациллы, низкокислотным — лейконостоки. Молочнокислые бактерии могут вызвать бомбаж консервных банок, скисание, появление слизи, неприятного привкуса и запаха. Особенно подвержены порче низкокислотные консервы. Возбудителями порчи растительных консервов являются *L. plantarum*, *L. brevis*, *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. dextranicum*.

Порче подвергаются и соленые овощи. Так, развитие *L. brevis* (наряду с энтеробактериями и дрожжами) приводит к образованию огурцов-«дудышей», *L. plantarum* — к формированию пустул на оливках, зеленых томатах, перце и других соленых овощах.

Молочнокислые бактерии могут вызвать скисание *мясных продуктов*, изменение их окраски (позеленение), ослизнение и образование мути в рассолах, использующихся для заливки отдельных сортов мясных изделий. Поверхностное позеленение колбас и появление зеленой сердцевины вызывает *L. viridescens*, растущий при низкой температуре, а также *Leuc. mesenteroides*. Изменение окраски мясных продуктов происходит в результате образования молочнокислыми бактериями пероксида водорода, вступающего в реакцию с пигментом мяса. Лактобациллы и лейконостоки вызывают скисание мясных изделий — свежей свиной колбасы и ветчины — в результате образования кислот даже при температуре около 0°C. Эти микроорганизмы в присутствии сахаров (особенно сахарозы) способны также ослизнять мясные изделия.

Определенное влияние на качество мясных продуктов оказывают энтерококки. Их обнаруживают в свежем мясе, фаршах, в вяленых и копченых продуктах, например в свиных копченях. При высоком содержании энтерококки могут вызвать не только порчу продуктов, но и пищевые отравления, например, мясными консервами, изготовление которых требует применения мягких режимов тепловой обработки (ветчина в желе и др.). *S. faecalis* и *S. faecium* придают продуктам нежелательный вкус и запах.

Молочнокислые бактерии играют ведущую роль и в порче некоторых *рыбных изделий*, вызывая бомбаж презервов и маринадов. При бомбаже рыбных презервов (сельдь в желе, анчоусы, сельдь в майонезе и др.) деформация консервных банок вызывается углекислым газом, который образуют гетероферментативные молочнокислые бактерии, чаще всего *L. brevis* и *L. buchneri*.

Наблюдались случаи отравления рыбными консервами даже при незначительной обсемененности их *L. casei* в результате интенсивного накопления гистамина — продукта декарбоксилирования гистидина.

## 22.4.2. Производство сахара

В субстратах сахарного производства нередко обнаруживается большое разнообразие видов молочнокислых бактерий (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. leichmannii*, *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. dextranicum* и др.). Некоторые из этих бактерий, размножаясь в диффузионном соке, могут вызывать прямые потери сахара путем его разложения. Лейконостоки при этом, сбрасывая и ослизняя сок, образуют из сахарозы декстран. В результате их жизнедеятельности кислотность сока повышается, он становится вязким, малоподвижным. Это может приводить к нарушению технологических процессов производства (особенно фильтрации и кристаллизации).

Молочнокислые бактерии могут инфицировать и фильтр-прессные станции, если фильтрация сока идет медленно. Развиваясь в большом количестве, они забивают слизью поры холста, и прессы выходят из строя. Наличие молочнокислых бактерий в субстратах, нагреваемых до высоких температур (свыше 70°C), объясняется существованием терморезистентных форм.

*Свеклосахарная меласса* — отход сахарного производства — широко используется в качестве ценного сырья во многих отраслях народного хозяйства, в частности микробиологической промышленности. Молочнокислые бактерии — обычные обитатели мелассы. Количество их и видовой состав существенно различаются в нормальных и дефектных мелассах. В нормальных — преобладают палочковидные формы, в дефектных — лейконостоки. В мелассе в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий может снижаться содержание сахара и накапливаться продукты их метаболизма. Поэтому на сахарных заводах мелассу необходимо хранить в закрытых резервуарах, защищать от разбавления водой и загрязнения.

## 22.4.3. Бродильная промышленность

Молочнокислые бактерии — основные возбудители инфекции на многих предприятиях промышленности, особенно использующих дрожжи, к ассоциативному развитию с которыми они хорошо приспособились.

Значительный урон молочнокислые бактерии могут приносить *дрожжевому производству*, основное сырье для которого составляет меласса. При нарушении технологического процесса бактерии, размножаясь совместно с дрожжами, снижают их выход, ферментативную активность, стойкость и подъемную силу. Лейконостоки, образуя декстран, способны агглютинировать (флокулировать) хлебопекарные дрожжи.

Лактобациллы могут инфицировать и производство кормовых дрожжей из мелассной барды. Развиваясь в ней, бактерии резко снижают выход дрожжевой биомассы и вызывают вспенивание бражки, затрудняющее ее сепарирование.

На спиртовых заводах молочнокислые бактерии (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* и др.), размножаясь в производственных субстратах, снижают бродильную активность дрожжей, уменьшают выход спирта и повышают содержание в нем посторонних примесей.

Лактобациллы (*L. brevis*, *L. casei* и др.) и педиококки (*P. damnosus*) могут вызвать ряд пороков пива — помутнение, ослизнение, скисание. В результате накопления ими диацетила пиво приобретает нежелательный привкус и запах. Педиококки, образуя на средах с глюкозой и мальтозой мукополисахариды, вызывают тягучесть солодового сула.

В бражках — продукте ацетоно-бутиловых заводов могут развиваться лактобациллы (*L. brevis*, *L. buchneri*), адаптированные к высоким концентрациям бутилового спирта. Они угнетают жизнедеятельность возбудителя ацетоно-бутилового брожения *Clostridium acetobutylicum*. При этом часть затора остается несброженной, ухудшаются выход и соотношение растворителей, появляется изопропиловый спирт, несвойственные ацетоно-бутилового брожению.

Вино — неблагоприятная среда для развития микроорганизмов. Существенный урон виноделию могут приносить только молочнокислые бактерии (*L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. buchneri*; *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. casei*, *Leuc. oenos*, *P. pentosaceus* и др.). Развиваясь в винах, они сбраживают сахар и вызывают их заболевания — скисание, помутнение, превращение лимонной, винной кислот и глицерина в молочную кислоту, летучие кислоты и CO<sub>2</sub>. При восстановлении гетероферментативными видами фруктозы в маннит вино приобретает неприятный кисло-сладкий вкус. Ожирение (ослизнение) вина вызывают бактерии (преимущественно лейконостоки), образующие из сахара декстран. Однако возбудители яблочно-молочного брожения (в частности, *Leuc. oenos*), вызывающие процесс превращения яблочной кислоты в молочную, используются для снижения высокой кислотности столовых вин. При этом вино становится более гармоничным, резкая кислотность его уменьшается.

В заключение необходимо подчеркнуть, что познание биологии молочнокислых бактерий позволило разработать эффективную биотехнологию их применения в очень многих отраслях пищевой микробиологической и бродильной промышленности, а также отраслей сельского хозяйства и изыскать действенные пути борьбы с теми из них, которые не так давно приносили весьма ощутимый урон народному хозяйству.

## 23.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Пропионовокислые, или пропионовые, бактерии были впервые выделены из сыров в 1878 г. Фитцем и сыроделие — самая древняя биотехнология, использующая эти бактерии. Свое название они получили в связи с образованием при брожении больших количеств пропионовой кислоты. Характеризуются образованием в значительном количестве корриноидов (витамин В<sub>12</sub>) и каталазы, даже при росте в анаэробных условиях.

Представлены бесспорными, неподвижными грамположительными палочками (0,5×0,7—2,0 мкм) и объединены в семейство *Propionibacteriaceae*. Содержание ГЦ в ДНК 65,0—68,0 мол.%. Подразделяют на «классические» и «кожные», последние ранее относили к коринебактериям. «Классические» пропионовокислые бактерии по современной классификации подразделены на четыре вида, вместо одиннадцати ранее описанных (табл. 23.1). Сокращение числа видов произведено главным образом на основании высокой степени гомологии ДНК представителей разных видов, хотя фенотипические свойства их хорошо различимы, чем, видимо, объясняется частое употребление в литературе прежних названий (табл. 23.1).

В последние годы в род *Propionibacterium* предложено включить кокки, имеющие с палочковидными бактериями много об-

Т а б л и ц а 23.1. Некоторые характеристики классических пропионовокислых бактерий (*Propionibacterium*)

Современное название	Прежнее название	Г + Ц (мол. %)	Компоненты клеточных стенок	
			сахара	изомер диаминопимелиновой кислоты (ДАП)
<i>P. freudenreichii</i>	<i>P. freudenreichii</i> <i>P. shermani</i>	65—66	Галактоза, манноза, рамноза	мезо-ДАП
<i>P. thoenii</i>	<i>P. thoenii</i> , <i>P. rubrum</i>	66—67	Комбинации из глюкозы, галактозы и маннозы	L-ДАП
<i>P. jensenii</i>	<i>P. jensenii</i> , <i>P. zeae</i> , <i>P. technicum</i> , <i>P. petersonii</i> , <i>P. raffinosaceum</i>	66—67		
<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. arabinosum</i> <i>P. pentosaceum</i>	66—67		

щих фенотипических свойств и высокую степень гомологии ДНК. Кокки выделяют из молока и сыров на ранних стадиях созревания. В отличие от типичных пропионовых бактерий, кокки растут на поверхности плотных сред.

Кожные пропионовые бактерии включены в род *Propionibacterium* в связи с образованием больших количеств пропионовой кислоты, витамина В<sub>12</sub> и сходством в химическом составе клеточных стенок. Их главный липид, как и у классических пропионовых бактерий, представлен С-15-жирной кислотой с разветвленной цепью. В отличие от аэробных коринебактерий они не синтезируют миколовых кислот. Вместе с тем у кожных пропионовых бактерий имеются существенные отличия (характер мест обитания) от классических пропионовых бактерий. Классические пропионовые бактерии выделяют главным образом из сыров и молочных продуктов, кожные — живут обычно на поверхности кожных покровов человека и в желудке жвачных. Поэтому оптимум температуры, необходимой для роста, 37°C, а для классических пропионовокислых бактерий 28—32°C. Кожные пропионовокислые бактерии обладают протеолитической активностью. В отличие от классических видов они разжижают желатину и гидролизуют казеин. Кроме протеаз образуют и другие экстрацеллюлярные ферменты: гиалуронат-лиазу, липазу, кислотную фосфатазу.

Кожные пропионовые бактерии составляют три вида: *P. acnes*, *P. avidum* и *P. granulosum*. Изучают их главным образом в связи с этиологией и лечением кожных заболеваний, которые эти бактерии могут вызывать.

Представители вида *P. acnes* входят в состав естественных микроорганизмов рубца жвачных. Они снабжают животных витамином В<sub>12</sub>, а также превращают углеводы в пропионовую и уксусную кислоты. Пропионат включается в синтез гликогена, а ацетат участвует в синтезе жиров.

Пропионовокислые бактерии обычно выделяют, используя среду следующего состава (%): триптиказа (BBL) — 1,0; дрожжевой экстракт (Difco) — 1,0; лактат натрия — 1,0; КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> — 0,25; МnSO<sub>4</sub> — 0,0005; агар-агар (Difco) — 1,5; вода дистиллированная. Начальное значение рН — 6,8—7,0. Лактат обуславливает некоторую элективность среды. Бактерии растут в анаэробных условиях; создают их путем внесения в среду восстановителей (например, 0,5% сульфита натрия или 0,05% цистеина + 0,05% твина-80), выращивания в толще среды или помещая чашки с инокулированной средой в анаэроостаты, заполненные на 10—20% углекислотой.

Культуру рекомендуют поддерживать на среде, приготовленной из мяса, в закрытых пробирках в атмосфере углекислоты при комнатной температуре. Жизнеспособность клеток в таких условиях сохраняется в течение многих месяцев. Присутствие глюкозы в среде не способствует сохранению жизнеспособности культуры и вносить ее в среды для хранения не рекомен-

дуются. Классические пропионовокислые бактерии используют глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу и все (кроме *P. freudenreichii*) — лактозу. *P. technicum* и пропионовокислые кокки утилизируют крахмал. Отношение к мальтозе и сахарозе — диагностический признак при дифференциации видов. Ассимилируют углекислоту. На пропионовокислых бактериях была впервые доказана способность гетеротрофов к фиксации  $\text{CO}_2$ .

В качестве источника азота используют соли аммония. *P. acidi propionici* восстанавливает нитраты; у некоторых видов установлена способность к фиксации молекулярного азота.

Используют ряд соединений серы: от сульфата до сульфида.

Потребление пропионовыми бактериями элементарной серы — явление довольно необычное, так как среди гетеротрофных бактерий оно встречается редко. Утилизация серы происходит при непосредственном контакте с клетками и сопровождается восстановлением ее до сульфида.

Обычно имеется потребность в трех витаминах: биотине, пантотеновой кислоте и тиамине, необходимых для осуществления пропионовокислого брожения.

В целом пропионовокислые бактерии обладают хорошими синтетическими способностями и могут расти на простой синтетической среде следующего состава: соединение углерода — 1—2 %; сульфат аммония — 0,3 %;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,2 %;  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  — 1 мг/л; биотин — 0,1 мг/л; тиамин — 100 мг/л; пантотеновая кислота — 1000 мг/л.

Бактерии получают энергию, осуществляя пропионовокислое брожение, химизм которого представлен на рис. 23.1.

Из 1,5 М глюкозы в результате брожения образуется до 2,0 М пропионовой кислоты, 1,0 М уксусной кислоты, 1,0 М  $\text{CO}_2$ , синтезируется до 6 М АТФ.

В брожении участвует 19 ферментов. В качестве кофакторов ферментов выступает тиаминдифосфат в составе пируватдегидрогеназы, биотин — в составе метил-малонил-КоА-транскарбоксилазы, пантотеновая кислота как составная часть КоА, витамин  $\text{B}_{12}$  — в своей коферментной форме как компонент метил-малонил-КоА-изомеразы. Три первых витамина бактерии самостоятельно не синтезируют, витамин  $\text{B}_{12}$  образуют в больших количествах, намного превышающих потребность для изомеразной реакции. Причина его «сверхсинтеза» обсуждается в главе «Витамины».

Наиболее активными кислотообразователями являются штаммы *P. freudenreichii* и пропионовокислые кокки, чаще всего встречающиеся в сырах сортов Советский и Швейцарский. Наиболее активные продуценты витамина  $\text{B}_{12}$  — *P. shermanii*, *P. freudenreichii* и *P. acnes*. Эти же штаммы накапливают наибольшую биомассу. Первые два вида находят широкое применение в промышленности.

Наряду с ферментами, участвующими в брожении, пропионовые бактерии содержат все ферменты цикла трикарбоновых кис-

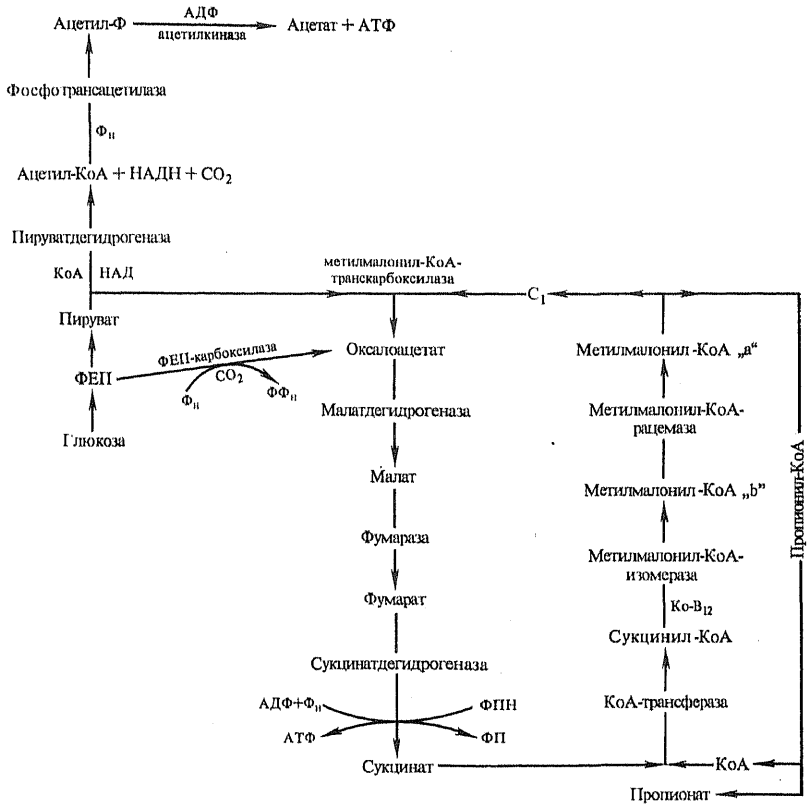


Рис. 23.1. Схема пропионовокислого брожения:  
 ФЕП — фосфоенолпируват; ФП — флавопротенд

лот и компоненты электронтранспортной цепи, в состав последней входят дегидрогеназы, негеминовое железо, менахинон и цитохромы. Содержат бактерии также активные флавооксидазы.

Поэтому кроме субстратного фосфорилирования бактерии способны к окислительному фосфорилированию, сопряженному с переносом электронов с цитохрома на фумарат и образованием из него сукцината.

Несмотря на наличие и функционирование аппарата, обеспечивающего аэробный образ жизни, а также супероксиддисмутазы и каталазы, бактерии проявляют явную тенденцию к анаэробизму. Причина этого явления до конца не выяснена. Предполагают, что анаэробизм пропионовых бактерий вызывается высокой чувствительностью SH-содержащих ферментов к молекулярному кислороду, с одной стороны, и низкой эффективностью окислительного фосфорилирования — с другой. Однако в присутствии кислорода эти бактерии не погибают.

### 23.2. ПРОПИОНОВОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ СЫРА И ДРУГИХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Пропионовокислые бактерии давно уже используются при изготовлении твердых сычужных сыров с высокой температурой (55—58°C) второго нагревания. К таким относятся сыры сортов Советский, Швейцарский, Бийский, Алтайский. В их созревании кроме *P. shermanii* участвуют также *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacterium helveticum*, *L. lactis*. Молочнокислые бактерии превращают лактозу в лактат, осуществляют протеолиз казеина, образуют ароматические вещества. Пропионовые бактерии из лактозы и лактата синтезируют пропионовую, уксусную кислоты и выделяют углекислоту, которая в значительной степени обуславливает рисунок сыра.

Пропионовым бактериям присуща высокая липолитическая активность, способствующая образованию жирных кислот: пропионовая, уксусная, миристиновая, пальмитиновая, стеариновая и олеиновая. Все эти кислоты способствуют созданию аромата сыра. Ароматическим веществом сыра сорта Швейцарский служит также пролин, в большом количестве выделяемый *P. shermanii*, и летучие карбонильные соединения.

Значительная солеустойчивость (до 2,5 % NaCl), термоустойчивость и вместе с тем способность пропионовокислых бактерий расти при 10—14 °C соответствуют особенностям технологии выработки твердых сычужных сыров. Для повышения активности пропионовых бактерий и стабилизации их свойств в процессе сыроделия в СССР предложена и уже применяется многоштаммовая сухая закваска. Ранее применялась жидкая закваска, состоящая из одного штамма *P. shermanii*. При внесении сухой многоштаммовой закваски качество и вкус сыра сорта Советский лучше, чем при использовании жидкой одноштаммовой закваски.

Пропионовые бактерии вносят в закваску определенных сортов кефира. Такой кефир обогащается витамином В<sub>12</sub>. На Украине разработана и внедряется технология нового молочнокислого напитка «Днепровский». Для его получения в состав закваски входят молочнокислые, уксуснокислые и пропионовокислые бактерии.

Есть еще одна область пищевой промышленности, в которой применяются пропионовокислые бактерии: получение порошка яичного белка. Остаточные углеводы белка куриных яиц вступают в реакцию с аминокислотами с образованием меланоидинов, отчего порошок темнеет и приобретает неприятный запах. Применение пропионовокислых бактерий позволило удалить углеводы из жидкой белковой массы, последняя обогащается при этом витамином В<sub>12</sub> и некоторыми свободными аминокислотами. Санитарно-бактериологическое состояние нового продукта улучшается, а срок его хранения увеличивается до 1,5 лет (против шести месяцев). Ранее для обессахаривания яичного белка использовали ферментные препараты — глюкозооксидазы и каталазы, но



это дороже и дает неполное удаление углеводов. Биомасса пропионовых бактерий — хороший белковый препарат с высоким уровнем серусодержащих аминокислот.

В Польше предложено получение обогащенного витамином В<sub>12</sub> пищевого белкового препарата путем сбраживания лактозы сыворотки пропионовыми бактериями с последующим аэробным культивированием *Kluyveromyces fragilis*, утилизирующим продукты метаболизма пропионовокислых бактерий.

### 23.3. ДРУГИЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Пропионовокислые бактерии используются как продуценты витамина В<sub>12</sub> (см. гл. «Витамины»).

Кроме того, они могут служить источником пропионовой кислоты. Способность к осуществлению пропионовокислого брожения сохраняется после иммобилизации клеток в полиакриламидный гель (ПААГ). Иммобилизованные клетки более стабильны в отношении кислотообразования, чем свободные. Образование пропионовой и уксусной кислот может происходить из органического субстрата в безазотистой среде; таким образом, иммобилизованные клетки, по существу, работают как биокатализатор. При периодической реактивации полноценной средой кислотообразующая активность пропионовокислых бактерий увеличивается и может сохраняться на протяжении нескольких месяцев.

Проточная система с иммобилизованными клетками пропионовых бактерий предложена для получения пропионовой и уксусной кислот.

Пропионовая кислота представляет большой практический интерес как консервант (фунгицид). Зерно и комбикорма, обработанные пропионовой кислотой, долго сохраняются даже при влажной погоде и не плесневеют. Пропионовую кислоту можно использовать при хранении сливочного масла (его заворачивают в бумагу, пропитанную пропионовой кислотой), черного хлеба, консервов. Кислота хорошо усваивается и в небольших количествах безвредна для человека.

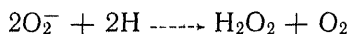
В промышленности пропионовую кислоту сейчас получают в основном из продуктов перегонки нефти, запасы которой, как известно, истощаются. Но для применения в пищевой промышленности предпочтение отдают пропионовой кислоте, полученной биологическим путем.

Уксусная кислота, как известно, также обладает консервирующими свойствами. Поэтому для целей консервирования пропионовую и уксусную кислоты можно не разделять.

На основе бактерий рубца, в состав которых входит *P. acnes*, создан препарат «Пропиовит». В последние годы в связи с применением антибиотиков, сульфамидных препаратов и различных подкормок у сельскохозяйственных животных часто возникает дисбактериоз, что ведет к массовым заболеваниям и гибели молодняка.

Применение бактериальных препаратов способствует восстановлению нормальной микрофлоры. Использование «Пропиовита» при выращивании сельскохозяйственных животных и птиц повышает их сопротивляемость к неблагоприятным воздействиям, увеличивает привесы, сокращает потери от заболеваемости и гибели, стимулирует развитие полезной микрофлоры кишечника.

При контакте с кислородом в клетках пропионовокислых бактерий образуются супероксидные радикалы, которые, однако, не накапливаются благодаря наличию у них супероксиддисмутазы (СОД), осуществляющей следующую реакцию:



Образуемые в реакции пероксиды разлагаются при участии каталазы и пероксидазы, синтезируемых этими бактериями. СОД пропионовых бактерий — термостабильный железосодержащий белок. В форме, очищенной до гомогенного состояния, он рекомендован как лекарственный препарат при лечении воспалительных процессов и лучевой болезни. До настоящего времени СОД получали из эритроцитов крови. Комплекс антиокислительных ферментов: СОД, каталаза и пероксидаза, применяется в ряде стран в пищевой промышленности в целях предотвращения окисления липидов и других ценных компонентов пищевых продуктов. Поэтому бесклеточный экстракт безвредных пропионовых бактерий рекомендован как антиокислительный и витаминный препарат для пищевой промышленности.

Перечень областей применения пропионовокислых бактерий и новых практически важных производств их использования представлен в табл. 23.2.

**Таблица 23.2. Области применения пропионовокислых бактерий в народном хозяйстве**

Существующие производства	Новые предложения
1. Сыроделие	Многоштаммовая сухая закваска пропионовокислых бактерий
2. Производство витамина В <sub>12</sub>	Метод отбора активных продуцентов Метод регулирования уровня витамина В <sub>12</sub> путем изменения концентрации кобальта в среде
3. Сухой препарат для животноводства «Провиовит»	

**Перспективные производства**

4. Получение пропионовой и уксусной кислот
5. Обессахаривание белка куриных яиц
6. Препарат антиокислительных ферментов (каталазы, СОД, пероксидазы)
7. Препарат СОД (супероксиддисмутазы)

## Глава 24 АЦЕТОНО-БУТИЛОВОЕ БРОЖЕНИЕ

Бутиловый спирт — продукт брожения некоторых разновидностей маслянокислых бактерий — обнаружен Пастером в 1862 г. Несколько позднее Бейеринк выделил палочковидную бактерию, сбраживающую глицерин с образованием в числе продуктов брожения бутилового спирта. Более подробно вопросом образования при брожении бутанола занимались Фитц и Бухнер, а Шардингер (1905) установил, что некоторые бактерии при росте на средах с углеводами накапливают ацетон. Но все эти исследования сначала представляли чисто теоретический интерес. Положение, однако, изменилось в 1909 г., когда бутиловым спиртом заинтересовались как возможным исходным продуктом для синтеза каучука (через бутадиев). Первый ацетоно-бутиловый завод был построен в Англии в 1914 г. Брожение происходит с одновременным образованием трех продуктов: бутилового спирта, этилового спирта и ацетона.

В период первой мировой войны еще большее значение приобрел второй продукт брожения — ацетон, необходимый для приготовления взрывчатых веществ. Продукты брожения применяются для нужд нитроцеллюлозной и лакокрасочной промышленности, производства фотопленок, ацетилцеллюлозы, органического стекла и других отраслей химической и фармацевтической промышленности.

Несколько позже заводы по производству растворителей были построены в Канаде, США, Индии.

Создание в СССР производства бутилового спирта и ацетона путем брожения явилось результатом работ коллектива ученых, руководимого Шапошниковым. Проведенные ими исследования позволили в 1935 г. осуществить промышленное получение этих продуктов микробиологическим способом на специальном заводе.

### 24.1. ОСОБЕННОСТИ АЦЕТОНО-БУТИЛОВОГО БРОЖЕНИЯ

Бактерии, образующие в процессе своей жизнедеятельности в значительном количестве ацетон и бутиловый спирт, широко распространены в природе. Они находятся в основном в почве, откуда могут быть довольно легко выделены в виде чистых культур. Относятся к роду *Clostridium*, который включает большое число видов. Из различных клостридиев, способных к образованию в процессе брожения бутанола и ацетона, наиболее активным их продуцентом признан *Clostridium acetobutylicum*, применяемый для производства этих растворителей.

Клетки *C. acetobutylicum* (рис. 24.1) представляют собой палочки (0,6—0,9 × 2,4—4,7 мкм) с перитрихальным жгутикованием. Образуют овальные споры, расположенные субтерминально. Споры выдерживают нагревание при 80 °С в течение

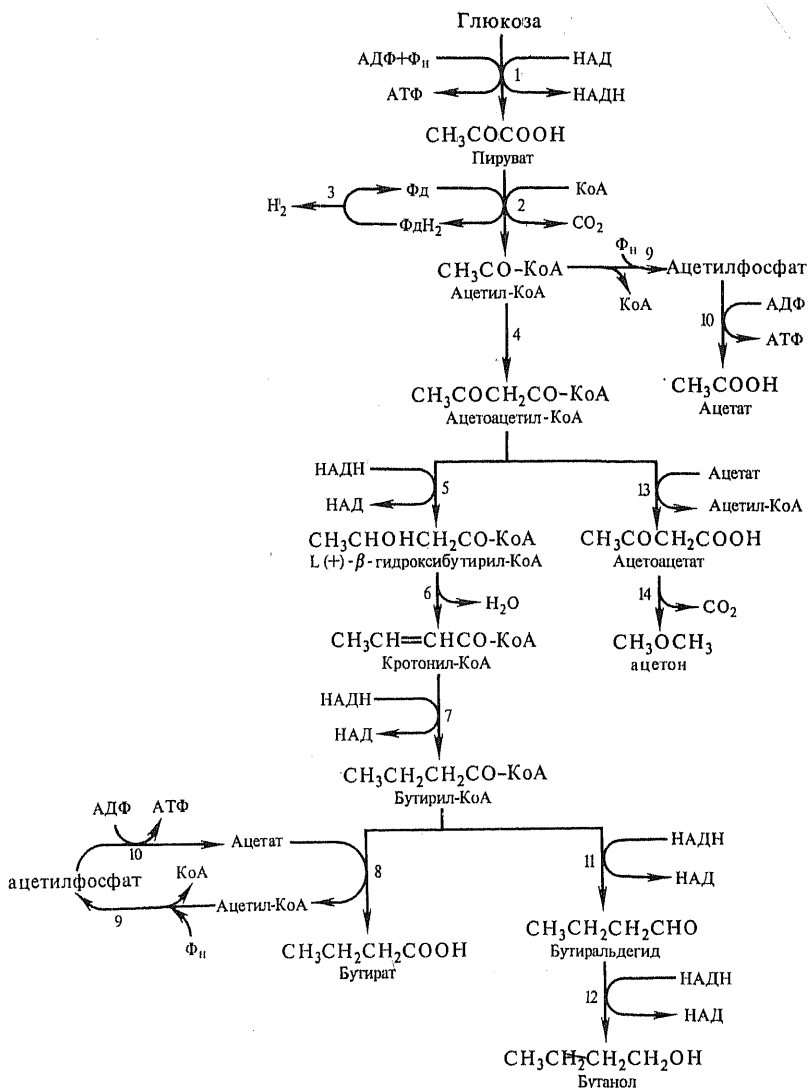


Рис. 24.1. Схема ацетоно-бутилового брожения.

Ферменты: 1 — фосфотрансферазная система фруктозобисфосфатного пути; 2 — пируват: ферредоксин-оксидоредуктаза; 3 — гидрогеназа; 4 — ацетоацетилтрансфераза (тиолаза); 5 — L-(+)-β-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназа; 6 — L-3-гидроксиацетил-КоА-гидролаза (кротоназа); 7 — бутирил-КоА-дегидрогеназа; 8 — КоА-трансфераза; 9 — фосфотрансацетилаза; 10 — ацетаткиназа; 11 — бутиральдегиддегидрогеназа; 12 — бутанолдегидрогеназа; 13 — КоА-трансфераза; 14 — ацетоацетатдекарбоксилаза; Фд — ферредоксин

10—30 мин, при 100 °С — около 4 мин. Рост культур происходит только в анаэробных условиях на довольно простых средах, содержащих различные углеводы. Кроме углеводов *S. acetobutylicum* может сбраживать глицерин, маннит, глюконат, пируват и

некоторые другие вещества. Нуждается в таких витаминах, как биотин и пара-аминобензойная кислота. Бактерия способна к фиксации молекулярного азота. Оптимальная температура для роста 37—38 °С, оптимальное значение рН среды 5,1—6,9.

Благодаря наличию амилалитических ферментов бактерия использует крахмал. Выделяет в среду протеиназы, в результате чего способна разлагать белки. Поэтому *S. acetobutylicum* относят к группе протеолитических клостридиев.

Сбраживание этой бактерией углеводов, как и другими клостридиями, происходит по фруктозобисфосфатному пути, т. е. по пути Эмбдена—Мейергофа—Парнаса (рис. 24.1). Продуктами брожения являются уксусная и масляная кислоты, ацетон, бутанол, этанол, а также  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ . Но состав продуктов и их количества в процессе брожения, а также в зависимости от условий, в которых оно происходит, может меняться.

В результате детального изучения ацетон-бутилового брожения Шапошников (1939) обнаружил, что оно имеет двухфазный характер.

В течение первой фазы происходит активный рост культур и накопление в среде преимущественно органических кислот. Во вторую фазу рН среды снижается, рост культур замедляется, преобладает образование нейтральных продуктов, а именно ацетона, бутанола и этанола. В то же время количество органических кислот в среде может даже уменьшаться (рис. 24.2).

Аналогичная двухфазность, как было установлено в дальней-

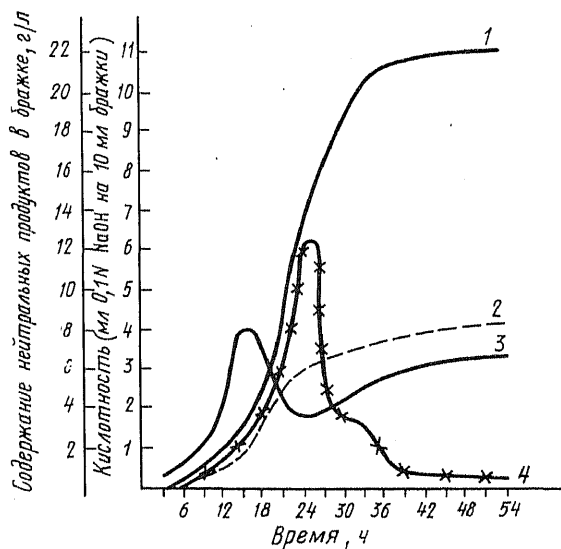


Рис. 24.2. Динамика ацетон-бутилового брожения (по Шапошникову, 1948):

1 — общее количество нейтральных продуктов, 2 — ацетон, 3 — кислотность, 4 — газовыделение

шем, характерна для большинства процессов брожений, а также некоторых других микробиологических процессов, что важно знать для их практического применения (см. гл 1).

Для ацетоно-бутилового брожения четко показано, что его двухфазность связана с рН среды. Если значение рН среды в результате накопления органических кислот падает до 4,5 и ниже, начинается интенсивное образование нейтральных продуктов. В результате этого предупреждается дальнейшее подкисление среды, неблагоприятное для бактерий. Если значение рН среды путем добавления в нее мела или другими способами поддерживать на уровне 5,0 и выше, то образования в большом количестве ацетона, бутанола и этанола не происходит.

Установлено, что при низких значениях рН у *C. acetobutylicum* увеличивается активность ферментов, катализирующих превращение ацетоацетил-КоА в ацетон (рис. 24.2) и больше НАДН используется на восстановление бутирил-КоА до бутанола. Кроме того, бутанол может частично синтезироваться из ранее образованной масляной кислоты, вновь поступающей в клетки из среды и превращающейся в бутирил-КоА. Поэтому для получения в большом количестве нейтральных продуктов важно соблюдать определенные условия процесса брожения.

#### 24.2. ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ СРЕДЫ

Ацетоно-бутиловое брожение в производственных условиях может вестись на разных углеводсодержащих средах. Вначале обычно использовали среды, содержащие кукурузную, пшеничную или ржаную муку. В настоящее время в качестве основного сбраживаемого субстрата нередко применяют мелассу и некоторые другие дешевые вещества. Сбраживаемые углеводы не подвергают предварительному осахариванию. Поэтому содержащие их среды именуются заторами (в отличие от суслу — осахаренной среды спиртового брожения).

Обычно используют заторы, содержащие около 6 % углеводов. Использовать среды с большим количеством сбраживаемых субстратов нецелесообразно, так как образующий при брожении бутанол уже в концентрации 1,5 % подавляет жизнедеятельность бактерий и брожение прекращается. Поэтому часть углеводов, если их много, остается неиспользованной.

В случае, когда в качестве субстрата для брожения применяют муку, ее предварительно взвешивают на автоматических весах, а затем через дозатор направляют на смешение с водой при 50—60 °С. Замес проходит ловушки для улавливания комков, а также случайных примесей и поступает на разваривание в вращающейся стерилизационной колонке, где нагревается паром до 145—160 °С и выдерживается при такой же температуре в трубчатых вертикальных сосудах от 20 до 40 мин, постепенно продвигаясь по ним. Проходя через сепаратор пара, затор подается центробежным насосом в холодильник типа «труба в трубе»,

охлаждается до температуры брожения (35—36 °С) и поступает в бродильное отделение.

Среды, содержащие мелассу или гидролизаты растительных отходов, стерилизуют в более мягких условиях (115—120 °С, 18—20 мин), после чего их смешивают с мучным затором.

Для нормального проведения процесса ацетоно-бутилового брожения важно, чтобы в среде имелись в достаточном количестве белки, как это имеет место в мучных заторах.

#### **24.3. ПОДДЕРЖАНИЕ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ И ПОДГОТОВКА ИНОКУЛЯТА**

Для выращивания чистой культуры *S. acetobutylicum* пользуются запасом спор бактерии, заготовляемым обычно на шестимесячный (и более) период работы завода.

Заготовку спор проводят на 6 %-ном заторе кукурузной или ржаной муки путем массового высева. Для этого около 100 пробирок со свежим стерильным затором засевают культурой бактерии и весь цикл брожения, заканчивающийся образованием спор, проводят при 37 °С. Готовить споры можно и способом разлива. Для каждой новой заготовки используют споры, полученные из культур, давших в производстве наилучшие результаты брожения. Первая половина брожения проводится в одном большом стеклянном сосуде, из которого бражка разливается затем в стерильные пробирки, в которых процесс заканчивается образованием спор. Пробирки со спорами запаивают на газовой горелке и ставят в термостат. Через 48—60 ч бродильные газы спускают, пробирки вновь запаивают и хранят при комнатной температуре. После двухмесячного хранения партия спор подвергается проверке путем пробного брожения. Удовлетворяющие техническим условиям споры признаются пригодными для производства и на них составляют паспорт.

Приготовление требуемого количества чистой культуры бактерий для производства состоит из ряда последовательных переосево, которые ведутся во все увеличивающихся объемах затора. Разведение культуры начинается с посева спорами в аппарате чистой культуры (АЧК) объемом 10 л. Через 28 ч брожения содержимое АЧК стерильно передается в большой инокулятор (БИН) на 3,5 м<sup>3</sup> затора. Стерильный затор для БИН берут непосредственно с производства в горячем состоянии, охлаждают его в БИНе или в холодильнике. Из инокулятора культура бактерий передается в ферментатор-активатор производственной батареи с соблюдением условий стерильности.

Для процесса непрерывного ацетоно-бутилового брожения предложена дополнительная стадия. Это аппарат чистой производственной культуры (АЧПК), емкостью 200 м<sup>3</sup>, который засеивается из БИНа, а спустя 10—12 ч брожения вся культура из него переводится в первый ферментатор производственной батареи и сразу начинается ее загрузка затором.

#### 24.4. БРОЖЕНИЕ

Для понимания специфики ацетоно-бутилового брожения полезно вначале рассмотреть закономерности периодического процесса, хотя в промышленности оно давно ведется в основном полунепрерывным и непрерывным методами. Уже в первые часы после инокулирования затора активной культурой бактерий наблюдается брожение, заметное по пузырькам газа, поднимающихся к поверхности среды. Газовыделение достигает максимума обычно через 24—26 ч, спадая к концу брожения. В период максимального газовыделения происходит характерное расслоение субстрата — на поверхность поднимается рыхлый слизистый слой, в нижнем слое остается мутноватая опалесцирующая жидкость. Вся среда приобретает желтоватую окраску. Это явление в производстве именуется «подъемом» бражки и характеризуется как один из признаков нормального брожения. К концу брожения поднимавшаяся твердая часть субстрата оседает на дно. Наряду с газовыделением, характерным для ацетоно-бутилового брожения, является форма кривой титруемой кислотности. Развитие бактерий характеризуется быстрым нарастанием титруемой кислотности, достигающей максимума (4,0—4,6 мл 0,1 н NaOH на 10 мл бражки) к 12—16 ч брожения, и затем резко снижающегося к 24—25-му часу, после чего снова происходит небольшой подъем кислотности к концу брожения. В процесс повышения кислотности рН среды снижается с 6,0 до 4,1—4,2 и остается на этом уровне с небольшими колебаниями.

Образование ацетона и спиртов начинается примерно с 6-го часа брожения, но наиболее интенсивно происходит после перелома кривой кислотности. В ацетон и спирты превращается 33—35 % углеводов и в конечной бражке содержится около 2 % растворителей.

Полунепрерывный метод брожения в ацетоно-бутиловом производстве, известный под названием батарейного, имеет ряд преимуществ по сравнению с периодическим и прочно укоренился в нашей промышленности. Батарея состоит из 6—8 ферментаторов, последовательно соединенных переточными трубами. Головной из них — активатор, засевают культурой из инокулятора и после перелома кривой кислотности (примерно через 12 ч) начинают загружать мучным затором. Через активатор заполняется вся батарея. Разгрузка батареи (передача бражки на ректификацию) производится с последнего — хвостового ферментатора; после стерилизации он становится активатором следующей батареи, состоящей из тех же ферментаторов, но загружаемых в обратном направлении.

Непрерывное брожение облегчило замену больших количеств муки (до 70 %) более дешевым сырьем: свеклосахарной патокой (мелассой) и гидролизатами отходов растительного сырья.

Для первой фазы брожения целесообразнее применять мучной затор, что обеспечивает быстрый рост бактерий и образование



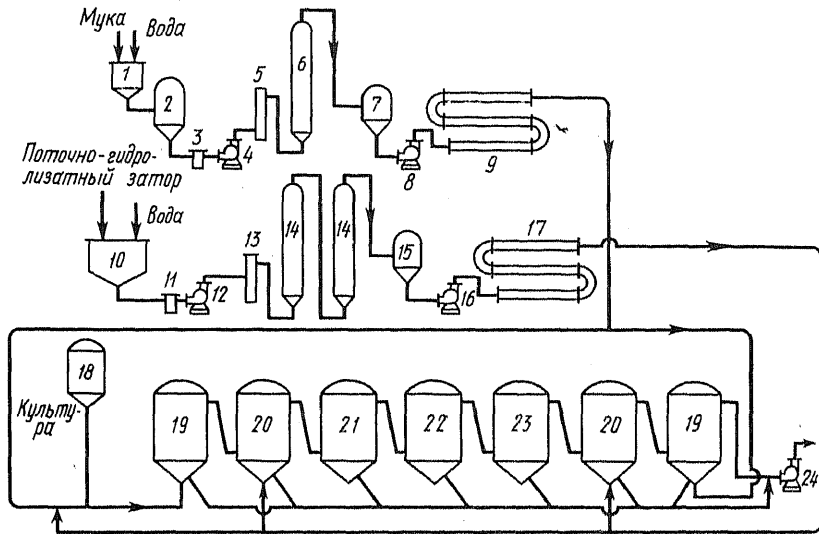


Рис. 24.3. Двухпоточная схема непрерывного ацетон-бутилового брожения. Мучной затор: 1 — заторный чан; 2 — подогреватель затора; 3 — ловушка; 4 — насос; 5 — варочная колонка; 6 — выдерживатель; 7 — паросепаратор; 8 — насос; 9 — холодильник. Паточно-гидролизатный затор: 10 — заторный чан; 11 — ловушка; 12 — насос; 13 — подогревательная колонка; 14 — выдерживатели; 15 — паросепаратор; 16 — насос; 17 — холодильник; 18 — АЧПК; 19, 20 — первый и второй ферментаторы батарей; 21—23 — ферментаторы батарей; 24 — насос для подачи бражки на ректификацию

ферментов для синтеза растворителей.

Мелассу и гидролизаты вводят при переходе брожения во вторую фазу.

Разработана двухпоточная схема непрерывного брожения (рис. 24.3). При этой схеме мучной и паточно-гидролизатный мучной затор направляется в первый (головной) ферментатор батареи, а также на разведение чистой культуры в инокулятор и АЧК; мелассный затор — во второй ферментатор, где происходит переход во вторую фазу брожения.

В результате внедрения способа непрерывного брожения на Нарткалинском ацетоновом заводе при переработке смешанных заторов (с заменой 70 % муки) по сравнению с прежней полунепрерывной схемой брожения мучных заторов производительность заметно возрастала. Весь процесс ацетон-бутилового брожения, будь то периодический, полунепрерывный или непрерывный, ведется в строго стерильных условиях, в герметически закрытых ферментаторах под небольшим избыточным давлением ( $0,4 \cdot 10^5$ — $0,8 \cdot 10^5$  Па), создаваемым газами брожения. Выделяемые при брожении газы удаляются через специальные коммуникации. Газы выбрасываются в атмосферу или направляются на переработку (например, в жидкую углекислоту или сухой лед).

#### **24.5. ИНФИЦИРОВАНИЕ В УСЛОВИЯХ АЦЕТОНО-БУТИЛОВОГО БРОЖЕНИЯ**

Ведение ацетоно-бутилового брожения с применением чистой культуры бактерий в условиях стерильности сред и всего оборудования обусловлено опасностью инфекции. Наибольший ущерб наносят производству молочнокислые бактерии и бактериофаг, быстро и полностью подавляющие рост ацетоно-бутиловых бактерий. Главная причина попадания бактериофага в производство определяется тем, что он легко задерживается в трещинах сварных швов ферментаторов, трубопроводах и других плохо прогреваемых и порой незаметных участках оборудования. Кроме возможного устранения таких участков наиболее эффективной мерой борьбы с бактериофагом является стерилизация при 120 °С не менее 20 мин. В результате внедрения способа непрерывного брожения в ацетоно-бутиловом производстве разработан комплекс мероприятий, позволяющих значительно улучшить условия стерильности и сократить случаи инфицирования в процессе брожения.

#### **24.6. ПЕРЕГОНКА АЦЕТОНО-БУТИЛОВОЙ БРАЖКИ**

Ацетоно-бутиловая бражка кроме ацетона, бутилового и этилового спиртов содержит ряд побочных продуктов, для разделения которых применяют довольно сложную перегонку и ректификацию. Изложим только принципиальные особенности этих операций.

На бражной колонне дистиллат всех (трех) растворителей отделяется от ацетоно-бутиловой барды. Дистиллат укрепляется до концентрации около 50 % и поступает на ацетоновую колонну для отделения ацетона — продукта с наиболее низкой температурой кипения (56,2 °С). Затем на другой колонне отделяют этанол (температура кипения 78,4 °С). Несколько сложнее обстоит дело с выделением и обезвоживанием бутанола. Смесь бутанола и воды образует два слоя: верхний — раствор воды в бутаноле (80 % бутанола и 20 % воды), его называют «богатой смесью» и нижний — раствор бутанола в воде (8 % бутанола и 92 % воды), его называют «бедной смесью». Разделение смесей производится в сосуде — разделителе. Перегонка и обезвоживание бутанола основаны на его свойстве перегонаться вместе с водой (водяным паром) в виде азеотропной смеси, кипящей при 93,4 °С и содержащей 59 % бутанола и 41 % воды. Таким образом, при перегонке «богатой смеси» с верхней части колонны вся вода удаляется в виде азеотропной смеси, а с нижней части отходит безводный бутанол, который затем окончательно очищается на бутаноловой колонне (температура кипения бутанола 117,7 °С). При перегонке «бедной смеси» из нижней части лютерной колонны отходит лютерная вода, а с верхней части — азеотропная смесь, направляемая потом в соответствующий сосуд — разделитель. Основной отход ректификации и всего производства — бар-

да, содержит около 3 % сухих веществ, состоящих главным образом их азотистых соединений сырья. Ранее барда использовалась обычно для откорма скота, но затем на ряде заводов были построены дрожжевые цехи для выращивания на барде кормовых дрожжей.

## **Глава 25 ПОЛУЧЕНИЕ УКСУСА И ДРУГИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УКСУСНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

### **25.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УКСУСНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

Уксуснокислые бактерии относятся к грамотрицательным аэробным хемоорганогетеротрофам. От других бактерий, обладающих указанными свойствами, они отличаются способностью активно осуществлять разнообразные окислительные трансформации первичных спиртов, гликолей, полиолов, альдо- и кетосахаров, а также их производных. К настоящему времени известно более восьмидесяти подобных трансформаций, производимых уксуснокислыми бактериями, в том числе окисление этилового спирта до уксусной кислоты, глюкозы до 2- и 5-кетоглюконовых кислот, превращение глицерина в диоксиацетон и сорбита в сорбозу.

В природе уксуснокислые бактерии обитают на листьях, цветах и плодах многих растений. Их можно обнаружить на пчелах и в созревающем меде, в почвах фруктовых садов и виноградников, в растительных соках, вине и пиве, молоке и кисло-молочных продуктах. Некоторые из них проявляют себя как фитопатогены.

Как установил еще Л. Пастер (1868), «болезни» вина и пива, их порча — результат жизнедеятельности микроорганизмов, в частности уксуснокислых бактерий. На поверхности зрелого винограда, яблок и других плодов, используемых как сырье в виноделии, всегда присутствуют уксуснокислые бактерии. Вследствие размножения клеток и активности синтезируемых ими ферментов в вине снижается содержание спирта и сахаров, происходят изменения в составе органических кислот, оно мутнеет, иногда ослизняется. Аналогичные процессы происходят при развитии уксуснокислых бактерий в пиве. Поэтому в технологии виноделия и пивоварения предусмотрены мероприятия, устраняющие возможность размножения этих бактерий на всех этапах производств.

Осуществляя окислительные трансформации спиртов и сахаров, уксуснокислые бактерии необычайно точно воздействуют лишь на определенные группы атомов в молекулах этих веществ. В некоторых условиях, и прежде всего при высокой концентрации

окисляемых соединений в среде, они образуют значительное количество продуктов трансформаций, что определяет целесообразность их использования в практике.

В настоящее время специализированные промышленные предприятия культивируют уксуснокислые бактерии с целью получения сорбозы как промежуточного соединения в синтезе витамина С, диоксиацетона, пищевого уксуса. В лабораторных условиях с помощью уксуснокислых бактерий получают некоторые редкие сахара и органические кислоты, а также их радиоактивные препараты, необходимые для научных исследований.

К группе уксуснокислых бактерий относят два рода бактерий: *Acetobacter* и *Gluconobacter*. Первый род объединяет ряд видов, среди них *Acetobacter aceti*, *A. xylinum*, *A. rancens* (син. *A. pasteurianus*), *A. peroxydans*. Второй представлен одним видом *Gluconobacter oxydans*. Объекты многих исследований по физиологии и биохимии бактерий *A. suboxydans* и *A. melanogenum* ранее описанные как самостоятельные виды рода *Acetobacter*, в настоящее время рассматривают как подвиды *G. oxydans* или как синонимы этого вида.

Клетки ацетобактеров — прямые или слегка изогнутые палочки (0,6—0,8 × 1,0—3,0 мкм). Клетки глюконобактеров также палочковидные или эллипсоидной формы (0,6—0,8 × 1,5—2,0 мкм). Для бактерий этих родов характерно образование инволюционных форм — гипертрофированных клеток, часто нитевидных со вздутиями. Это явление наблюдается в культурах уксуснокислых бактерий в условиях, не благоприятных для размножения (клетки растут, но не могут делиться).

Считают, что представители рода *Acetobacter* — перитрихи, тогда как *G. oxydans* — лопотрих. Однако имеются наблюдения, свидетельствующие, что у глюконобактеров встречаются клетки с единичными боковыми жгутиками, а ацетобактеры обладают наряду с одним полярным жгутиком тремя — пятью боковыми.

Уксуснокислые бактерии относятся к мезофилам. Оптимальная температура их роста 25—30 °С. Приспособлены к существованию в кислой среде. Максимальная скорость роста отмечается при рН 5,4—5,8. Однако они могут размножаться и производить окислительные трансформации и при рН 3,5—4,5, а отдельные представители — даже при рН 2,5. Уксуснокислые бактерии не разлагают белки, не используют аминокислоты в качестве источника углерода и поэтому не растут на мясоептонных средах. Они лишены внеклеточных протеиназ, амилолитических и липолитических ферментов.

В качестве источника азота уксуснокислые бактерии используют минеральные соли, лучше всего аммонийные. Их рост в синтетических питательных средах часто зависит от наличия витаминов, потребности в которых у разных видов различны. Так, *G. oxydans* нуждается в пантотеновой, пара-аминобензойной и никотиновой кислотах. В промышленности в питательные среды для *G. oxydans* в качестве источника указанных витаминов до-

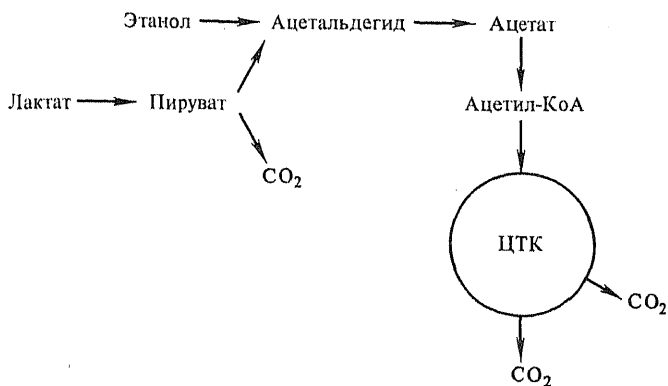


Рис. 25.1. Пути метаболизма этанола и лактата у бактерий рода *Acetobacter*. ЦТК — цикл трикарбоновых кислот

бавляют дрожжевой или кукурузный экстракты. *A. aceti* сам синтезирует все необходимые витамины и поэтому растет в синтетических питательных средах без их добавления.

Для бактерий рода *Acetobacter* лучшим соединением углерода является уксусная кислота. Они хорошо растут также в средах, содержащих этиловый спирт или молочную кислоту, превращая их в уксусную. Ацетобактеры окисляют уксусную кислоту в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК). У некоторых из них функционирует также глиоксилатный цикл (рис. 25.1).

Глюконобактеры хорошо растут в средах, содержащих глюкозу, фруктозу, сорбит или глицерин. Этиловый спирт и уксусную кислоту в качестве источника углерода они не используют и уксусную кислоту не окисляют. *G. oxydans* обладает неполным ЦТК. У этих бактерий отсутствует сукцинатдегидрогеназа и, соответственно, янтарная кислота не превращается в фумаровую. Другие ферменты ЦТК у *G. oxydans* имеются, но проявляют низкую активность по сравнению с аналогичными ферментами у бактерий рода *Acetobacter*. Поэтому считают, что ЦТК не имеет значения в энергетическом обмене у *G. oxydans*, функционируя только как механизм, обеспечивающий биосинтез органических кислот, из которых образуются аминокислоты (рис. 25.2).

Уксуснокислые бактерии не способны расти за счет анаэробного превращения углеводов. Энергией они обеспечиваются в процессе аэробного дыхания. Диссимиляция моносахаридов и многоатомных спиртов происходит по пентозофосфатному окислительному пути (рис. 25.2). Для *G. oxydans* пентозофосфатный путь имеет важное значение, компенсируя нефункционирующий полный ЦТК. Дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата этих бактерий проявляют активность не только с НАДФ, как у большинства организмов, но и с НАД. Благодаря этому в окислительных реакциях пентозофосфатного пути, катализируемых указанными ферментами, образуется восстановленный НАД,

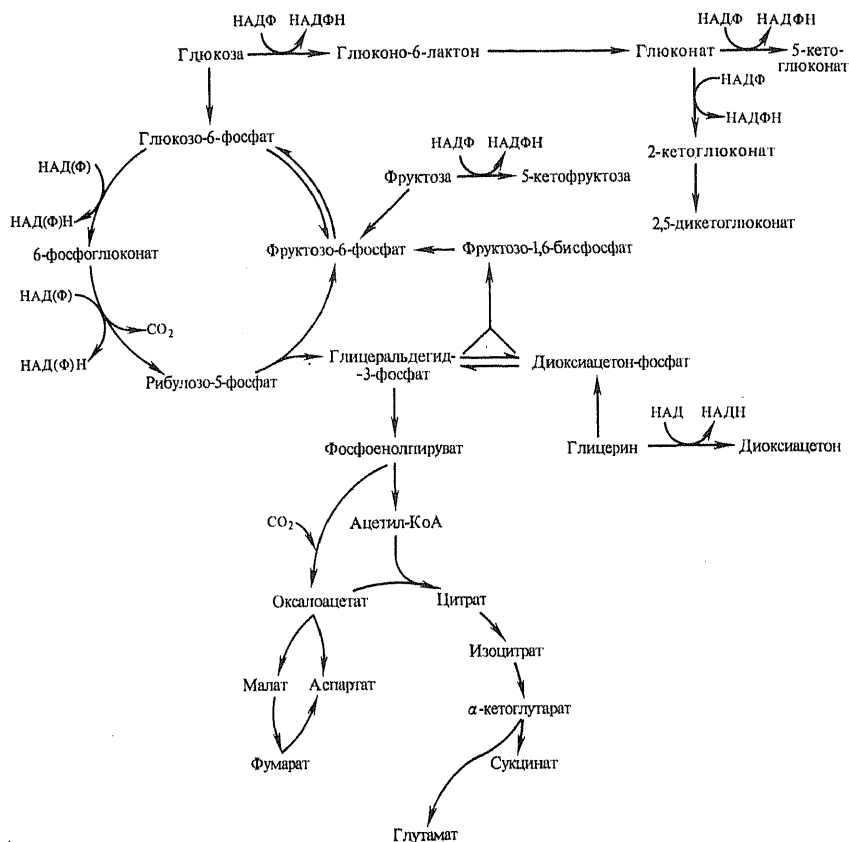


Рис. 25.2. Пути метаболизма глюкозы, фруктозы и глицерина у *Gluconobacter oxydans*

от которого электроны транспортируются в дыхательную цепь. Функционирование последней ведет к окислительному фосфорилированию и, следовательно, к образованию АТФ.

Наряду с превращением моносахаридов и многоатомных спиртов по пентозофосфатному пути уксуснокислые бактерии осуществляют их окислительные трансформации и без фосфорилирования (рис. 25.2).

С целью выделения уксуснокислых бактерий из различных источников (пиво, вино, уксус, фрукты и др.) накопительные культуры получают в пивном сусле, дрожжевой воде или в водном растворе дрожжевого экстракта с 0,5 % этанола или 1 % глюкозы. Исходное значение рН — 5,5. Ввиду того, что эти питательные среды не достаточно селективны для уксуснокислых бактерий, после стерилизации к ним добавляют пенициллин (20 МЕ/мл) и нистатин (200 МЕ/мл) с целью подавления роста

грамположительных бактерий и грибов. При необходимости можно использовать и другие аналогично действующие антибиотики. Посевы инкубируют при 30 °С в течение 72 ч.

Выделение чистых культур уксуснокислых бактерий из питательных обычно производят общепринятыми методами на двух агаризованных средах: дрожжевой воде с 3 % глюкозы и с 3 % этанола. В обе среды добавляют 0,5 % СаСО<sub>3</sub>. После семи суток инкубирования посевов отбирают колонии: на среде с глюкозой с отчетливыми зонами растворения мела вследствие образования глюконовой кислоты, на среде с этанолом — с белым диффузным ореолом, возникающим в результате вторичного образования СаСО<sub>3</sub> ввиду окисления бактериями Са-ацетата. Посевы из отобранных колоний производят на те же жидкие или агаризованные питательные среды; если с глюкозой, то с добавлением СаСО<sub>3</sub>, если со спиртом, то без мела. Известны и другие относительно простые методы выделения уксуснокислых бактерий.

Целесообразно в заключении рассмотреть отличительные признаки родов *Acetobacter* и *Gluconobacter*.

#### Отличительные признаки родов *Acetobacter* и *Gluconobacter*

	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
Тип метаболизма	Дыхательный	
Рост на МПА	—	—
Разжижение желатины	—	—
Рост при рН 8,2	—	—
» » рН 3,2	+	+
» в синтетической среде с этанолом, не содержащей витамины	±	—
То же в среде с уксусной кислотой	+	—
То же, с глюкозой	—	+
» с фруктозой	—	+
» с маннитом	—	+
» с лактозой	—	—
Окисление уксусной кислоты	+	—
То же, молочной кислоты до СО <sub>2</sub> и Н <sub>2</sub> О	+	—
То же, глицерина до диоксиацетона	±	+
То же, глюконовой кислоты до 5-кетоглюконовой кислоты	±	+
Восстановление нитратов	—	—
<i>Ферменты:</i>		
оксидаза	—	—
лецитиназа	—	—
липаза	—	—
аргининдигидролаза	—	—
протеиназы	—	—
амилазы	—	—
Синтез целлюлозы	±	—

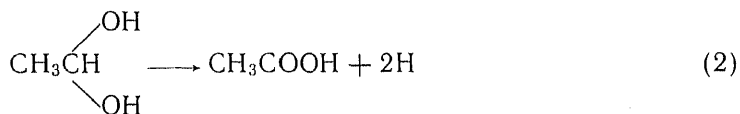
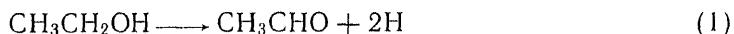
Примечания: (+) — всегда положительный ответ;  
 (—) — всегда отрицательный ответ;  
 (±) — у разных видов *Acetobacter* ответы различаются.

## 25.2. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ТРАНСФОРМАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Окислительные трансформации этилового спирта в уксусную кислоту, сорбита в сорбозу и многие другие происходят не только в растущих культурах уксуснокислых бактерий, но и при инкубации суспензии их неразмножающихся клеток в растворах окисляемых веществ.

Уксуснокислые бактерии обладают дегидрогеназами двух типов, которые различаются по локализации в клетках и физико-химическим свойствам. Одни из них связаны с системой внутриклеточных мембран и не требуют для своей активности пиридин-нуклеотидов, другие — растворимые — зависят от НАД и НАДФ. Мембранно-связанные ферменты действуют в кислой среде, растворимые — в щелочной.

Окисление этилового спирта до уксусной кислоты (микробиологическая трансформация) происходит путем двух реакций. В первой из них, катализируемой алкогольдегидрогеназой, образуется уксусный альдегид (в гидратной форме). Во второй реакции образовавшийся уксусный альдегид при участии ацетальдегиддегидрогеназы превращается в уксусную кислоту:

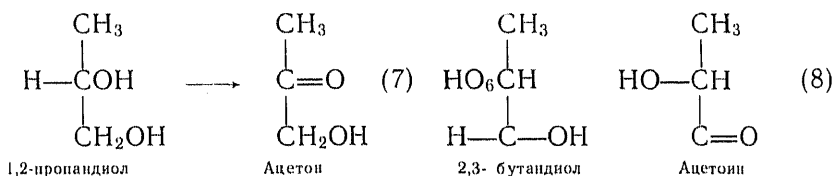
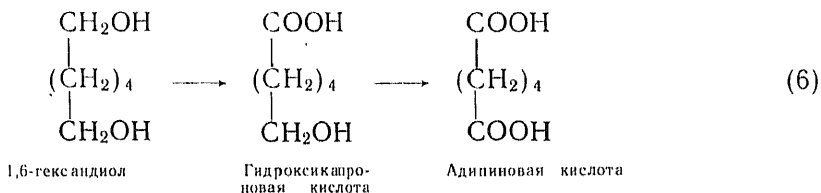
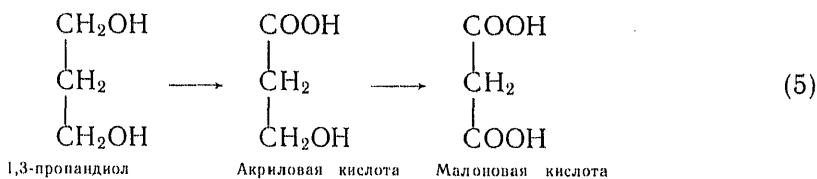


Активность мембранно-связанной алкогольдегидрогеназы *A. aceti* и *G. oxydans* в 300 раз выше активности растворенного фермента. Оптимум pH мембранно-связанной алкогольдегидрогеназы *A. aceti* — 4,0, а растворенной — 8,0. Поэтому считают, что основная роль в трансформации спирта в уксусную кислоту в промышленных условиях (при pH 2,5—3,0) принадлежит мембранно-связанным ферментам уксуснокислых бактерий. Указанные ферменты выделены и очищены. Предложен новый микрометод определения количества этилового спирта, основанный на использовании мембранно-связанной алкогольдегидрогеназы уксуснокислых бактерий в реакции *in vitro*.

Уксуснокислые бактерии окисляют не только этиловый спирт, но и другие первичные алифатические спирты с длиной цепи углеродных атомов не более шести, однако количество образующихся при этом кислот — муравьиной, пропионовой, масляной, изомаляной и изовалерьяновой — невелико.

Много органических соединений уксуснокислые бактерии образуют в результате окислительных трансформаций алифатических гликолей. Они окисляют как первичные, так и вторичные спиртовые группы этих веществ; при этом возникают кислоты или кетосоединения. Ниже приведены примеры таких реакций.

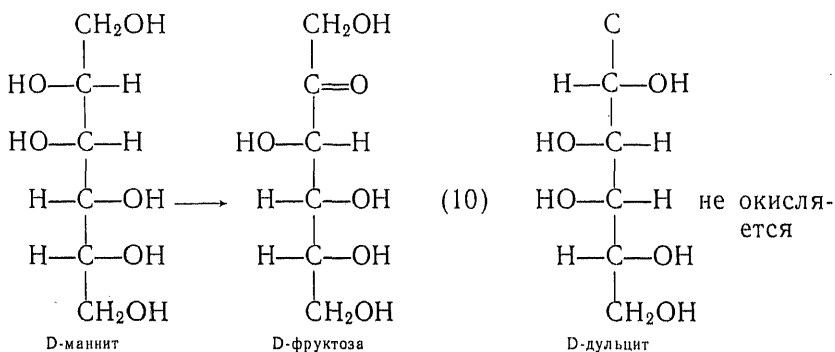
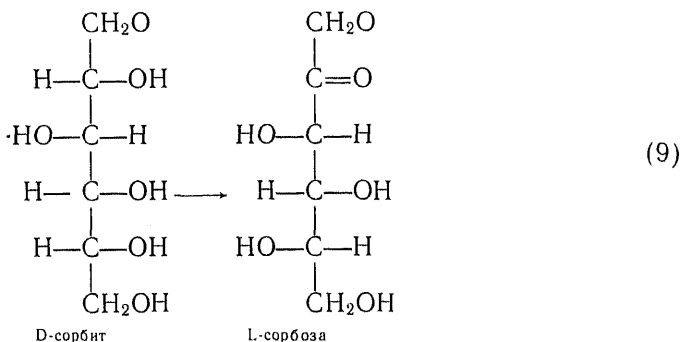




Некоторые гликоли и их производные подавляют рост уксуснокислых бактерий. Однако отмытые клетки, выращенные в среде с другими соединениями углерода, производят окислительные трансформации таких веществ. Из разных видов уксуснокислых бактерий выделены ферменты, катализирующие неполное окисление гликолей. Они специфичны по отношению к гликолям и не катализируют окисление альдосахаров, а также полиолов.

Уксуснокислые бактерии превращают многие полиолы (многоатомные спирты) в кетосоединения, проявляя при этом исключительную чувствительность к их строению. Как установил Г. Бертран (1904), уксуснокислые бактерии дегидрируют только ту вторичную спиртовую группу полиола, которая находится в цис-положении с соседней спиртовой группой. Позднее было выяснено, что уксуснокислые бактерии окисляют полиолы лишь в

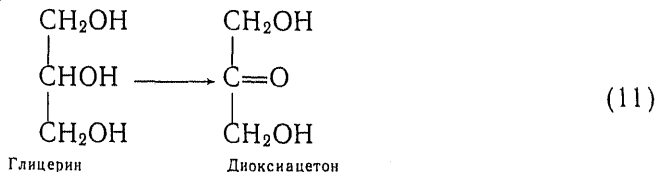
том случае, когда их находящиеся в цис-положении гидроксильные группы имеют D-конфигурацию. Указанные закономерности окисления полиолов бактериями получили название правила Бертрана — Хадсона. Соответственно уксуснокислые бактерии окисляют D-сорбит (9), D-маннит (10) и не окисляют D-дульцит:



Трансформация D-сорбита в L-сорбозу катализируется мембранно-связанной полиолдегидрогеназой, наиболее активной при pH 5,0, и растворимой — НАДФ-зависимой, активной при pH 8,0 и выше.

Исключением из правила Бертрана—Хадсона является превращение D-сорбита в D-фруктозу, происходящее в культурах *G. oxydans* при участии НАД-зависимой полиолдегидрогеназы. Фруктоза образуется из сорбита лишь в небольшом количестве.

Окислительная трансформация глицерина (11) происходит при участии двух глицеролдегидрогеназ: растворимой НАД-зависимой (оптимум pH — 10,5) и мембранно-связанной (оптимум pH около 6,0):

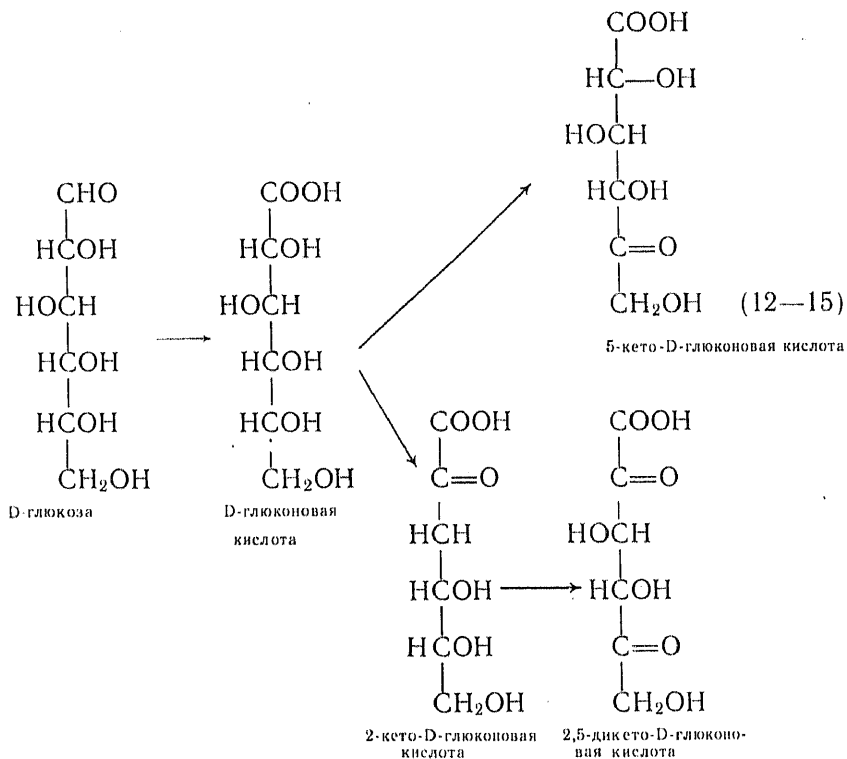


Моносахариды — альдогексозы и альдопентозы — уксуснокислые бактерии окисляют до сахарокарбоновых кислот. Глюкозу они превращают в глюконовую, маннозу в манноновую, галактозу в галактоновую, ксилозу в ксилоновую кислоты. Почти все представители уксуснокислых бактерий образуют из D-глюкозы D-глюконовую кислоту (12). Наиболее интенсивно эту окислительную трансформацию осуществляет глюконобактер.

Из D-глюкозы возникает D-глюконо-лактон, который затем гидролизует с образованием D-глюконовой кислоты. В реакции окисления глюкозы принимают участие две дегидрогеназы, одна из них НАДФ-зависимая.

Окисление глюкозы уксуснокислыми бактериями не останавливается на стадии образования глюконовой кислоты. Последняя окисляется до 2- и 5-кето-D-глюконовых кислот (13, 14). Эти реакции катализируются НАДФ-зависимыми 2- и 5-кетоглюконатредуктазами.

Некоторые штаммы *G. oxydans* осуществляют окислительную трансформацию 2-кетоглюконовой кислоты до 2,5-дикето-D-глюконовой (15):



Из фруктозы уксуснокислые бактерии также образуют 2- и 5-кетоглюконовые кислоты предположительно через манноновую



Впервые аскорбиновая кислота была синтезирована в 1934 г. М. Райхштейном и А. Грюсснером (Швейцария) и с того времени синтез этого соединения в промышленности проводят по разработанной ими схеме путем следующих реакций: 1) каталитическое гидрирование D-глюкозы до D-сорбита; 2) микробиологическая трансформация сорбита в L-сорбозу; 3) конденсация сорбозы с диацетоном (ацетонирование сорбозы); 4) окисление диацетонсорбозы до диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоты; 5) гидролиз последнего соединения и получение таким путем 2-кето-L-гулоновой кислоты; 6) енолизация последней; 7) превращение полученного вещества в L-аскорбиновую кислоту.

Из семи приведенных реакций только одна — трансформация D-сорбита в L-сорбозу — осуществляется бактериями. Для этого на предприятиях, производящих сорбозу, используют различные штаммы *G. oxydans*.

С целью получения L-сорбозы *G. oxydans* выращивают в питательных средах, обычно содержащих 20% сорбита и дрожжевой или кукурузный экстракт. При указанной концентрации сорбита лишь небольшая его часть затрачивается на рост биомассы. Основное количество сорбита трансформируется в сорбозу (9). В глубинных условиях в ферментерах периодического действия, снабженных барбатерами и мешалками для усиленной аэрации (8—10 г O<sub>2</sub>/л/ч), выход сорбозы достигает 98% за 20—40 ч.

Побочным продуктом в производстве сорбозы является 5-кето-D-фруктоза, которую *G. oxydans* образует из фруктозы (16). После окончания производственного цикла сорбозу выделяют из культуральной жидкости химическим методом.

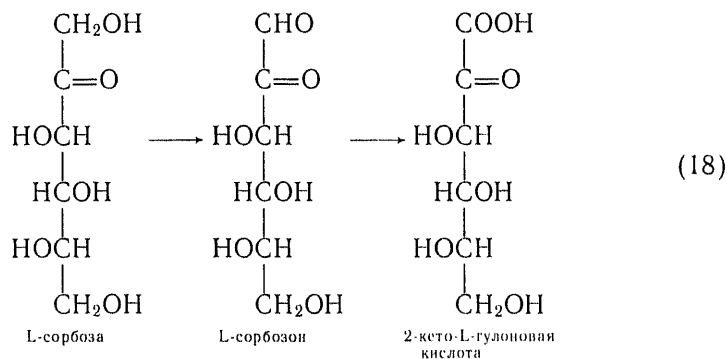
Наряду с получением сорбозы в периодических условиях применяют непрерывные способы культивирования *G. oxydans* в многостадийной системе, в батарее ферментеров или в ферментере колонного типа. Преимущество непрерывного культивирования *G. oxydans* при производстве сорбозы определяется тем, что на первых стадиях технологического процесса бактерии находятся в условиях, благоприятных для размножения, а на последующих стадиях, увеличив концентрацию сорбита в среде, проводят его окисление образовавшимися клетками как источником ферментов.

В аппаратуру, предложенную для непрерывного культивирования *G. oxydans*, включены ферментеры — «дозреватели», снабженные аэрирующим устройством. В этих ферментерах окисление сорбита, содержащегося в среде, производят суспензии нерастущих бактерий. Известен также способ, согласно которому в культуру *G. oxydans* на последних стадиях процесса добавляют сорбит, повышая его концентрацию до 33—50%. В этих условиях окисление сорбита также производят нерастущие бактерии.

Проводятся испытания возможности получения сорбозы путем инкубации клеток *G. oxydans* в водном растворе сорбита.

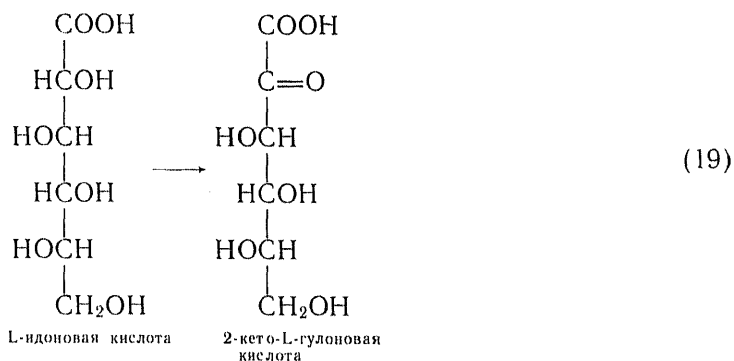
Выяснено, что в растворе, содержащем 20% сорбита и 0,05%  $K_2HPO_4$ , в условиях принудительной аэрации образуется до 8 мг сорбозы/г биомассы. Установлена также возможность окисления сорбита уксуснокислыми бактериями, иммобилизованными в полиакриламидном геле.

Значительный интерес представляют результаты изучения метаболизма сорбозы *G. oxydans*, показавшие, что некоторые штаммы этой бактерии трансформируют L-сорбозу в L-сорбозон, а затем в 2-кето-L-гулоновую кислоту. В последнем случае происходит окисление альдегидной группы кетозы.



При использовании иммобилизованных клеток *G. oxydans*, а также некоторых видов *Pseudomonas* sp. высокого выхода 2-кето-L-гулоновой кислоты пока получить не удалось. Тем не менее доказана возможность непосредственного превращения бактериями сорбита в 2-кето-L-гулоновую кислоту — предшественник L-аскорбиновой кислоты. Если выход 2-кето-L-гулоновой кислоты удастся увеличить, значительно сократится число химических реакций при синтезе витамина С (по схеме Райхштейна и Грюсснера).

Разработан также способ получения L-аскорбиновой и изоаскорбиновой кислот без использования сорбозы в качестве промежуточного продукта. Согласно этому способу процесс происходит следующим образом. В культуре *G. oxydans* глюкоза окисляется до 5-кето-D-глюконовой кислоты, затем ее восстанавливают, в результате образуется смесь D-глюконовой и L-идоновой кислот. Эти кислоты переводят в соли кальция, используемые для приготовления питательной среды, куда производят посев *Pseudomonas fluorescens*. Псевдомонады дегидрируют гексозы у второго углеродного атома. Поэтому в культуре *P. fluorescens* L-идоновая кислота окисляется до 2-кето-L-гулоновой кислоты, а D-глюконовая — до 2-кето-D-глюконовой:



2-Кето-L-гулоновую кислоту путем химических реакций превращают в L-аскорбиновую, а 2-кето-D-глюконовую — в изоаскорбиновую кислоту. Из смеси кислоты могут быть выделены и использованы по назначению. Возможно также разделение кальциевых солей 2-кето-L-гулоновой и 2-кето-D-глюконовой кислот, дальнейшее восстановление последней до D-глюконовой кислоты и повторное использование ее на втором этапе процесса.

Однако этот метод пока не нашел практического применения и в настоящее время аскорбиновую кислоту производят из сорбита способом, указанным выше.

#### 25.4. ПОЛУЧЕНИЕ ДИОКСИАЦЕТОНА

Диоксиацетон применяют в производстве некоторых лекарственных препаратов, косметических средств и синтетических полимеров. Получают диоксиацетон из глицерина путем микробиологической трансформации (11). Для этого используют селекционированные штаммы *G. oxydans*, растущие в питательных средах с высоким содержанием глицерина (15% и выше) и образующие большое количество диоксиацетона.

*G. oxydans* культивируют в ферментерах в глубинных условиях в питательных средах, содержащих 10—20% глицерина и дрожжевой или кукурузный экстракт (0,5%). Исходное значение рН среды 5,5—5,7; температура 30 °С. При периодическом культивирования *G. oxydans* в указанных условиях в течение двух суток выход диоксиацетона достигает 95—98% от теоретически возможного.

По имеющимся данным, выход диоксиацетона может быть увеличен при повышении парциального давления кислорода в воздухе, поступающем в ферментер, несмотря на то, что увеличения скорости роста бактерий при этом не происходит.

Показана возможность получения диоксиацетона не только в глубинной культуре *G. oxydans*, но также путем использования активной ферментов растущих клеток бактерий. Для этого клетки *G. oxydans*, выращенные в питательной среде с глицери-

ном, инкубировали в его присутствии при усиленной аэрации. В этих условиях при использовании сухой бактериальной биомассы (2 г/л) за 3 ч получали около 60 г диоксиацетона в литре раствора. Высокая активность глицеролдегидрогеназы, катализирующей трансформацию глицерина в диоксиацетон, сохраняется при многократном использовании бактериальной массы для проведения указанной реакции.

Выделение диоксиацетона из культуральной жидкости или из раствора, в котором инкубировали клетки *G. oxydans*, осуществляют химическим методом, что в последнем случае значительно облегчается.

### 25.5. ПОЛУЧЕНИЕ СПИРТОВОГО УКСУСА

В качестве сырья для получения пищевого уксуса используют виноградное вино и сидр, пивное сусло, мед, соки различных фруктов и ягод после спиртового брожения или водный раствор этилового спирта. В последнем случае получают спиртовой (белый) уксус, который производят в большем масштабе, чем винный. Уксус содержит наряду с уксусной кислотой (6—9%) незначительное количество сложных эфиров, придающих ему особый вкус и приятный аромат, чего лишена уксусная кислота, получаемая химическим путем. В пищевой промышленности и быту предпочтительно используют пищевой уксус.

Спиртовой уксус получают путем периодического или непрерывного культивирования уксуснокислых бактерий на поверхности древесных стружек (чаще буковых), которыми заполнены производственные аппараты различной конструкции, или в глубинных условиях, в ферментерах. При этом происходит превращение этилового спирта в уксусную кислоту [уравнения (1, 2)].

При получении уксуса производительность оценивают по массе (кг) уксусной кислоты, содержащейся в полученном объеме уксуса за сутки (кг/м<sup>3</sup>/сут).

Согласно старым, но еще применяющимся способам получения спиртового уксуса при пуске завода или цеха уксуснокислые бактерии вносят в аппараты со стружками, взятыми из действующих аппаратов других предприятий. Бактерии закрепляются на стружках, размножаются и окисляют спирт, поступающий в аппарат в составе питательной среды. Кроме спирта среда содержит уксусную кислоту и минеральные соли азота, фосфора, серы, магния, калия. Другие элементы, необходимые бактериям, имеются в достаточном для них количестве в водопроводной воде. Иногда в питательную среду добавляют пивное сусло как источник витаминов. Уксусная кислота служит источником углерода и энергии для бактерий, используемых в производстве уксуса. Поэтому в процессе роста культуры всегда происходит потребление уксусной кислоты и частичное ее окисление в ЦТК. Количество потребляемой уксусной кислоты зависит от скорости роста бактерий. В производстве уксуса окисление уксусной кис-



лоты называют «переокислением». При высокой концентрации спирта и уксусной кислоты в питательной среде размножение бактерий ограничивается и «переокисление» имеет минимальное значение.

На стружках производственных аппаратов находятся бактерии разных видов рода *Acetobacter* — *A. aceti*, *A. rancens*, син. *A. pasteurianus*, *A. xylinum*. Более высокая производительность аппаратов отмечается при доминировании *A. aceti*. Процесс получения уксуса не требует соблюдения стерильности. Ввиду высокой активной кислотности питательной среды (рН 2,5—3,0) и ее состава, элективного для уксуснокислых бактерий, другие микроорганизмы в производственных аппаратах уксусных заводов не развиваются.

Аппараты, действующие по наиболее старому непрерывному способу, представляют собой деревянные чаны (высота 2,2—2,5 м, диаметр 0,9—1,0 м), емкость их 1,0—1,5 м<sup>3</sup> стружек. В уксусных цехах находятся десятки таких аппаратов. Питательную среду для бактерий (3—5% спирта, 5—6% уксусной кислоты и минеральные соли), разбрызгивают сверху и она протекает по стружкам. При этом слой жидкости, покрывающий стружку, не превышает 0,5 мм, что обеспечивает бактериям хорошие условия аэрации. При окислении бактериями спирта некоторое количество энергии выделяется в виде тепла. В результате температура внутри аппаратов повышается до 32—34 °С, что на 12—14° выше температуры помещения. Вследствие этого воздух «затягивается» в специальное отверстие над ложным дном аппарата (над сборником готового уксуса), проходит сквозь весь аппарат и «отработанный» выходит по краям крышки, не закрывающей аппарат герметично.

По мере медленного протекания питательной среды по стружкам содержащийся в ней спирт превращается бактериями в уксусную кислоту и готовый уксус непрерывно поступает в сборник, расположенный в нижней части аппарата. При протоке среды бактерии частично вымываются, но их численность восстанавливается. Об этом можно судить по тому, что в нормально действующих аппаратах количество образуемой в них уксусной кислоты — величина постоянная — около 1,4 кг/м<sup>3</sup>/сут.

При циркуляционном (периодическом) способе получения уксуса процесс происходит в аппаратах, вмещающих 30—60 м<sup>3</sup> стружек, заселенных уксуснокислыми бактериями. Эти аппараты оборудованы специальными устройствами для принудительной аэрации, регулирования скорости циркуляции среды и температуры. Питательная среда, содержащая в начале производственного цикла 10—11% спирта, около 1% уксусной кислоты и минеральные соли, протекает по стружкам со значительно большей скоростью, чем при описанном выше способе. Количество уксусной кислоты в культуральной жидкости постепенно увеличивается, но к моменту поступления ее в сборник окисление спирта не заканчивается, поэтому жидкость возвращают в аппарат. Так

она циркулирует до тех пор, пока концентрация уксусной кислоты в ней не достигает 10—11%. Тогда цикл заканчивается и в аппарат поступает вновь приготовленная питательная среда. Производительность аппаратов, действующих по циркуляционному способу, составляет 5—12 кг уксусной кислоты в сутки на один кубический метр стружек.

При глубинном культивировании уксуснокислых бактерий с целью получения спиртового уксуса используют селекционные штаммы *A. aceti*, размножающиеся с большой скоростью в перемешиваемой с воздухом жидкости и интенсивно превращающие спирт в уксусную кислоту в кислой среде. Периодическое культивирование этих бактерий в глубинных условиях дает возможность получать 18—23 кг/м<sup>3</sup>/сут уксусной кислоты.

Наиболее производительными являются непрерывные глубинные способы. Технологическая схема такого способа у нас в стране разработана П. И. Николаевым с сотрудниками (1970). Культивирование уксуснокислых бактерий осуществляют на основе гетерогенно-непрерывного метода, что обеспечивает создание оптимальных условий как для их роста, так и для трансформации спирта в уксусную кислоту.

Процесс ведут в пяти ферментерах емкостью каждый около 6 м<sup>3</sup>, соединенных последовательно. В каждый ферментер подают воздух; культуральная жидкость интенсивно перемешивается с воздухом мешалкой. В 1-й ферментер непрерывно поступает питательная среда, содержащая (%): уксусной кислоты 1,4—1,5; спирта 4,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и MgSO<sub>4</sub> по 0,05. Скорость потока  $D = 0,1 \text{ ч}^{-1}$ . Во 2-й и все следующие ферментеры поступает дополнительное количество спирта. Существенно, что содержание этилового спирта и уксусной кислоты в культуральной жидкости в каждом из ферментеров различается. Концентрация уксусной кислоты последовательно возрастает, а спирта — снижается. Содержание уксусной кислоты в мас.% (P) и спирта в об.% (S) в ферментерах таково:

P <sub>1</sub> — 3,0;	P <sub>2</sub> — 5,9;	P <sub>3</sub> — 8,0;	P <sub>4</sub> — 9,3;	P <sub>5</sub> — 10,0;
S <sub>1</sub> — 2,6;	S <sub>2</sub> — 1,8;	S <sub>3</sub> — 1,6;	S <sub>4</sub> — 0,9;	S <sub>5</sub> — 0,2—0,15.

Из последнего ферментера непрерывно вытекает готовый уксус.

Размножение бактерий происходит преимущественно в первом ферментере, где концентрация уксусной кислоты и этилового спирта в среде относительно невысока, что обеспечивает необходимую скорость роста культуры. В 3-м, 4-м и 5-м ферментерах превращение спирта в уксусную кислоту происходит вследствие активности ферментов неразмножающихся клеток *A. aceti*. При концентрации уксусной кислоты, равной 8% и выше, уксуснокислые бактерии не растут.

Посевной материал, выращенный в глубинных условиях в среде указанного выше состава, вносят в первый ферментер только при пуске установки. Температура в ферментере поддер-

живается с помощью теплообменных устройств на уровне 25—30 °С.

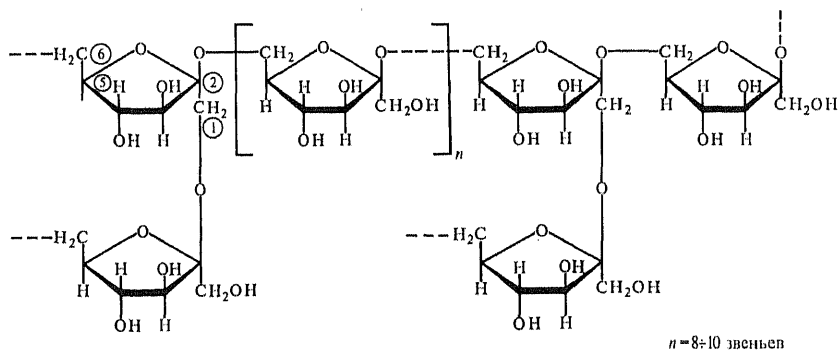
При получении спиртового уксуса по глубинному непрерывному способу производительность превышает 30 кг/м<sup>3</sup>/сут уксусной кислоты. Из уксуса возможно получать химически чистую уксусную кислоту высокой концентрации. Однако с экономической точки зрения это нецелесообразно.

## 25.6. СИНТЕЗ ПОЛИСАХАРИДОВ

Среди уксуснокислых бактерий есть организм — *A. xylinum*, синтезирующий внеклеточный полимер — β-глюкан (связи 1→4), идентичный целлюлозе растений. Как растущие культуры *A. xylinum*, так и суспензии неразмножающихся клеток этой бактерии образуют целлюлозу из различных моносахаридов, полиолов, сахарокарбоновых кислот, этилового спирта, уксусной кислоты и кислот ЦТК. Специалисты рассматривают синтез целлюлозы *A. xylinum* как своеобразную модель процесса, происходящего в растениях.

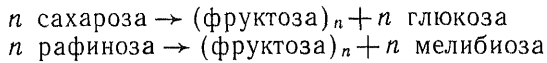
Из клеток *A. xylinum* выделены препараты гетерополисахаридов, обладающие биологической активностью, — ацетоксан А и ацетоксан Б. Первый из них состоит из галактозы, глюкозы, маннозы, рибозы; второй — из глюкозы, маннозы и рамнозы. Эти препараты, как и некоторые другие бактериальные полисахариды, оказывают влияние на иммуннобиологическую реактивность макроорганизма, повышают сопротивляемость к бактериальным инфекциям. Доказано увеличение резистентности животных к экспериментальным инфекциям при парентеральном введении им ацетоксана А.

Многие штаммы *G. oxydans* и некоторые штаммы *A. aceti* при культивировании в питательных средах с сахарозой или рафинозой синтезируют внеклеточный высокомолекулярный гомополисахарид фруктан (леван):



Синтез левана катализируется левансахарозой — ферментом, относящимся к классу трансфераз. В реакции трансгликозили-

рования из фруктозильных остатков сахарозы или рафинозы образуется леван, а глюкоза или мелибиоза при этом освобождаются:



Синтез левана и последующий его гидролиз — относительно простой путь получения фруктозы как химического реактива. Наряду с другими внеклеточными полисахаридами леван может быть использован в пищевой промышленности, а также в медицине в качестве плазмозаменителя. Разработан способ получения левана в растущей культуре *G. oxydans*. В питательной среде, содержащей сахарозу (5—10%), минеральные соли и дрожжевой экстракт, выход левана достигает 80% от фруктозной части сахарозы. Леван может быть также получен ферментативным способом — *in vitro* в системе: сахароза + препарат левансахарозы. Левансахароза *G. oxydans* — внеклеточный фермент, до 80% его активности обнаруживается в культуральной жидкости. Фермент выделен, очищен и изучены условия его активности.

Таким образом, биологические особенности уксуснокислых бактерий, их способность к многочисленным окислительным трансформациям, к синтезу целлюлозы и других полисахаридов свидетельствуют о разнообразных возможностях широкого использования ацетобактеров и глюконобактеров в практике, а также повышения эффективности их применения в промышленности.

## Глава 26 ПОЛУЧЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Производство органических кислот методом микробиологического синтеза — относительно молодая отрасль промышленности. Исключение составляет производство уксусной кислоты, которую вырабатывают из винного спирта микробиологическим путем очень давно. Получение других органических кислот, в первую очередь лимонной кислоты, с помощью микроорганизмов началось в 20—30-е годы нашего века. Пищевые кислоты до этого выделяли в ограниченном количестве из естественных источников, лимонную кислоту — из сока лимонов, винную — из винного камня (отхода винодельческого производства).

Современное производство органических кислот, существующее в большинстве промышленно развитых стран, основано главным образом на использовании в качестве продуцентов различных штаммов плесневых грибов, чаще всего *Aspergillus niger*. Источником углерода в этих процессах являются углеводы — кристаллические сахароза и глюкоза, свекловичная и тростниковая меласса, гидролизаты древесины, крахмалсодержащие материалы.

В последние годы внимание привлечено к непищевому сырью, такому, как этиловый спирт и жидкие парафины. Парафины нефти могут быть использованы для многих микробиологических синтезов, в том числе при синтезе органических кислот. Наиболее перспективными продуцентами органических кислот из п-парафинов признаны дрожжи.

Процессы микробиологического получения органических кислот иногда называют аэробным брожением. Однако такое определение не отражает физиологического смысла этого процесса для самого микроорганизма-продуцента. Согласно современным представлениям брожение определяется как тип метаболизма без участия молекулярного кислорода, при котором АТФ образуется путем субстратного фосфорилирования. В свете этого процессы микробиологического синтеза уксусной, глюконовой, лимонной, фумаровой и ряда других органических кислот не могут быть определены как процессы брожения, поскольку их продуценты — аэробы и образование кислот осуществляется в условиях интенсивной аэрации. Указанные кислоты являются промежуточными продуктами метаболизма соединений углерода, в том числе интермедиатами цикла трикарбоновых кислот. Микробиологические

**Т а б л и ц а 26.1. Основные органические кислоты, продуцируемые микроорганизмами**

Кислота	Микроорганизм-продуцент	Источник углерода	Выход от источника углерода, %	Сведения о производстве и его масштабах
1. Молочная	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Глюкоза (крахмал)	90	Производится 30 000 т в год
2. Масляная	<i>Rhizopus oryzae</i>	Глюкоза	60—70	—
	<i>Clostridium butyricum</i>	Крахмал, глюкоза	50	
3. Пропионовая	<i>Propionibacterium shermanii</i>	Глюкоза	60	—
4. Койевая	<i>Aspergillus oryzae</i>	»	60	—
5. Глюконовая	<i>Aspergillus niger</i>	»	до 95	Производится 30 000 т в год
6. 2-Кетоглюконовая	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	»	90	Производится в Японии
7. 5-Кетоглюконовая	<i>Gluconobacter suboxydans</i>	»	90	—
8. Винная	<i>Gluconobacter suboxydans</i>	»	30	—
9. Пировиноградная	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	»	50	—
10. Уксусная	<i>Acetobacter aceti</i> <i>Acetobacter</i> sp.	Этанол	90—98	Производится в виде столового уксуса (10% кислоты) 8—10 млн м <sup>3</sup> в год

Кислота	Микроорганизм-продуцент	Источник углерода	Выход от источника углерода, %	Сведения о производстве и его масштабах
11. Лимонная	<i>Aspergillus niger</i>	Сахароза (меласса)	85	Производится 300 000 т в год
12. Итаконовая	<i>Candida lipolytica</i>	Парафин	140	—
	<i>Aspergillus terreus</i>	Глюкоза	60	Производится в СССР, США, Японии
13. Трео-Ds-изолимонная	<i>Candida brumptii</i>	»	28	—
	<i>Candida lipolytica</i>	Алканы, этанол	60—70	Производится в СССР
14. Аллоизолимонная	<i>Penicillium purpurogenum</i>	Глюкоза	40	—
15. α-Кетоглутаровая	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	»	40	—
	<i>Candida lipolytica</i>	Парафин	70	—
16. Янтарная	<i>Bacterium succinicum</i>	Яблочная кислота	57	—
17. Фумаровая	<i>Rhizopus delemar</i>	Глюкоза	58—65	—
	<i>Candida hydrocarbofumarica</i>	Парафин	84	—
18. Яблочная	<i>Schizophyllum commune</i>	Глюкоза	70—100	—
	<i>C. hydracarbofumarica</i> + <i>Pichia membranaefaciens</i>			
		Парафин	72	—
19. Тетрадекандикарбоновая	<i>Candida cloacea</i>	Гексадекан	60	—

Примечание. (—) — Прочерком отмечено отсутствие сведений.

способы получения органических кислот основаны на неполном окислении соединений углерода в аэробных условиях. Исключением является молочная кислота, которую получают в результате брожения.

С помощью микроорганизмов возможно получение более 50 различных органических кислот. Кислоты, методы получения которых разработаны достаточно детально, приводятся в табл. 26.1. В настоящее время только шесть кислот производятся в промышленных масштабах микробиологическим путем (лимонная, итаконовая, глюконовая, 2-кетоглюконовая, уксусная, молочная). Производство уксусной и молочной кислот разбирается в других главах книги (см. гл. 22, 25). В связи с тем, что получение лимонной кислоты является наиболее хорошо отработанным процессом, он рассмотрен более подробно.

## 26.1. ПОЛУЧЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ИЗ УГЛЕВОДОВ

Способность продуцировать органические кислоты при росте на средах с углеводами широко распространена среди мицелиальных грибов родов *Aspergillus* (*A. awamori*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. itaconicus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. wentii*), *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. citrogenum*, *P. luteum*), и *Rhizopus* (*R. nigricans*, *R. oryzae*).

Грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium* относятся к формальному классу дейтеромицетов, или несовершенных грибов (Deuteromycetes или Fungi imperfecti), порядку Hyphomycetales. Как аспергиллы, так и пенициллы широко распространены в природе. Многие виды аспергиллов и пенициллов ответственны за порчу пищевых продуктов (плодов, овощей, зерна, хлеба и др.), кожи, бумаги. Грибы обнаруживаются в виде плесневого налета, состоящего из вегетативного мицелия, несущего конидиеносцы с конидиями. Естественным резервуаром их является почва, причем аспергиллы более приурочены к почвам южных широт, а пенициллы — к почвам северных широт.

На поверхности питательных сред пенициллы и аспергиллы образуют плоские колонии, состоящие из вегетативного мицелия, стелющегося по поверхности и частично погруженного в субстрат. Мицелий чаще всего белого цвета, септированный, сильно разветвленный. На определенной стадии развития грибов образуются воздушные гифы, на которых развиваются конидиеносцы, несущие конидии, последние служат для размножения грибов.

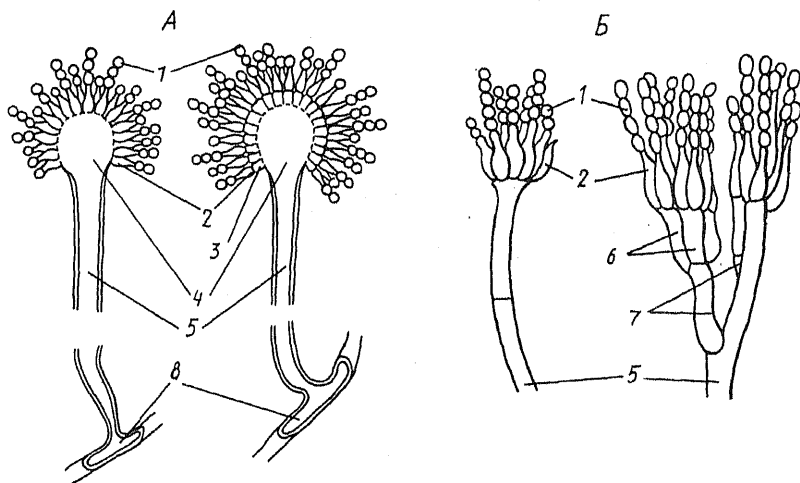


Рис. 26.1. Строение конидиеносцев с конидиями (Горленко, 1976). А — *Aspergillus*;  
Б — *Penicillium*

1 — конидии, 2 — фиалиды, 3 — профиалиды, 4 — пузырь, 5 — конидиеносцы, 6 — метелки, 7 — веточки,  
8 — опорные клетки

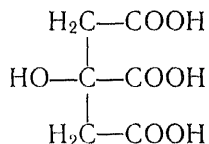
Кроме того, размножение возможно обрывками вегетативного мицелия. Строение конидиеносцев у аспергиллов и пенициллов различно и используется как признак для идентификации родов и отдельных видов внутри рода (рис. 26.1).

Представители рода *Rhizopus* относятся к семейству Мисогаеае (класс Zygomycetes). Эти грибы широко распространены в почве, на экскрементах травоядных животных и на всевозможных гниющих субстратах растительного происхождения. Грибы имеют сильно ветвящийся несептированный мицелий, частично погруженный в субстрат, частично стелющийся по поверхности. Кверху от мицелия поднимаются спорангиеносцы в виде толстых гиф, заканчивающихся шаровидным вздутием, внутри которого развиваются споры. Помимо бесполого размножения многоядерными спорангиспорами у этих грибов известно половое размножение зигоспорами. Некоторые грибы семейства муковых используются в качестве источника амилаз и протеаз.

### 26.1.1. Лимонная кислота

Лимонная кислота — трехосновная оксикислота, широко распространена в природе, относительно много ее содержится в некоторых ягодах, фруктах, особенно в citrusовых (в лимоне 5—8%), в листьях и стеблях некоторых растений.

#### 26.1.1.1. Характеристика кислоты



Лимонную кислоту выделяют в виде лимоннокислого кальция из продуктов переработки листьев хлопчатника, стеблей махорки, хвои ели, плодов лимонов.

В Италии и Испании еще существует производство лимонной кислоты, основанное на осаждении цитрата кальция из сока лимонов. До 1930 г. Италия была основным поставщиком цитрата кальция в мире. В настоящее время лимонную кислоту производят во всех промышленно развитых странах методом микробиологического синтеза, мировая продукция кислоты составляет около 300 тыс. т в год.

Лимонная кислота благодаря своим вкусовым качествам и физико-химическим свойствам широко применяется в ряде отраслей пищевой промышленности: кондитерской (конфеты, желе), винодельческой, безалкогольных напитков, консервной, пищекоцентрагов. Она используется в фармацевтической промышленности, в том числе при переливании крови, а также при приготовлении косметических средств. Лимонная кислота — пре-



красный хелатирующий (комплексообразующий) агент, что позволяет широко использовать ее в процессах электрогальванизации, дубления кож, окраски тканей, приготовления чернил, очистки паровых котлов, изготовления синтетических моющих средств. Используется лимонная кислота в химической промышленности, в том числе при производстве алкидных смол, а ее эфиры служат пластификаторами при производстве лаков.

### 26.1.1.2. История создания производства лимонной кислоты

В 1891 г. немецкий ученый Вемер установил способность плесневых грибов продуцировать органические кислоты. При выращивании *A. niger* на среде с сахаром им было констатировано выделение щавелевой кислоты. Через два года Вемер обнаружил лимонную кислоту, накапливающуюся в среде при выращивании грибов, названных им *Citromyces* (*C. pfefferianus* и *C. glaber*). Впоследствии *Citromyces* были отнесены к роду *Penicillium*. Вемер пытался осуществить производство лимонной кислоты с помощью гриба из сахара. Работа окончилась неудачей в связи с рядом трудностей, непреодолимых в то время.

В 1917 г. американский ученый Кэрри сообщил о способности ряда штаммов *A. niger* продуцировать лимонную кислоту наряду с щавелевой. Это было важное открытие, поскольку в отличие от плохо растущих пенициллов *A. niger* характеризовался мощным и быстрым ростом. Штамм гриба, с которым работал Кэрри, и условия ведения процесса были в дальнейшем использованы американской фирмой Пфайзер для организации в 1923 г. первого микробиологического процесса производства лимонной кислоты.

Работы Вемера и Кэрри вызвали большой интерес к изучению некоторых грибов и в первую очередь продукции ими органических кислот. В этом плане развернулись широкие исследования в различных странах, в том числе СССР, Англии, Чехословакии, США и Японии. В Советском Союзе работы по изучению физиологии и биохимии грибов и продукции ими органических кислот проводились в лабораториях В. С. Буткевича в Москве и С. П. Костычева в Ленинграде. Буткевичем было сделано принципиально важное открытие. Он показал, что, изменяя условия культивирования грибов, можно изменить их биохимическую активность и получить разные продукты. Так, при культивировании *A. niger* в присутствии  $\text{CaCO}_3$  при рН среды, близком к 7,0, происходило преимущественное накопление глюконовой и щавелевой кислот, а в условиях высокой кислотности среды без  $\text{CaCO}_3$  образовывалась практически одна лимонная кислота. Этот факт, впоследствии подтвержденный Костычевым, оказался принципиально важным для организации промышленного производства лимонной и глюконовой кислот не только в нашей стране, но и за рубежом.

Заслуга Буткевича состояла также в том, что он первый дал бесспорное доказательство образования лимонной кислоты из сахара. Благодаря работам Буткевича, Костычева, а также их учеников в Советском Союзе в начале 30-х годов было создано микробиологическое производство лимонной кислоты с помощью *A. niger*. В 1935 г. в Ленинграде был пущен первый в стране специализированный завод, производящий лимонную кислоту.

К началу 30-х годов производство лимонной кислоты «биохимическим» способом было организовано также в Бельгии, Чехословакии, Франции, а затем и в других странах.

### 26.1.1.3. Продуценты лимонной кислоты

Способность образовывать лимонную кислоту при росте на средах с углеводами — свойство, широко распространенное среди мицелиальных грибов. Для получения лимонной кислоты в лабораторном и промышленном масштабе использовали грибы рода *Aspergillus* (в том числе виды *A. awamori*; *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. wentii*), рода *Penicillium* (в том числе *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. citroenum*, *P. luteum*), а также *Botrytis cinerea*, *Paecilomyces divaricatus*, *Mucor piriiformis*, *Polyporus anceps* и некоторые другие.

В настоящее время в качестве продуцента лимонной кислоты применяются различные штаммы *A. niger*. Используемые в производстве штаммы отличаются большой скоростью роста, легкостью культивирования и высоким выходом лимонной кислоты.

До недавнего времени в производстве использовали специально селекционированные штаммы гриба, выделенные из природных источников. Последние два десятилетия в качестве продуцентов все шире применяются экспериментально полученные мутантные штаммы, отличающиеся от природных рядом положительных свойств, в первую очередь более высоким выходом целевого продукта.

### 26.1.1.4. Сверхсинтез лимонной кислоты

Способность различных грибов, в том числе *A. niger*, продуцировать лимонную кислоту проявляется в строго определенных условиях культивирования. Как правило, культуры грибов при избытке питательных веществ не накапливают лимонной кислоты, а образуют значительную биомассу и окисляют сахар до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Синтез лимонной кислоты грибом-продуцентом осуществляется обычно на средах с высокой концентрацией углевода (5—20%). Наилучшим субстратом для *A. niger* является сахароза.

Накопление кислоты имеет место при ограничении роста гриба одним из минеральных компонентов среды (Fe, Mn, P, N) или несколькими компонентами одновременно. Преимущественное образование лимонной кислоты происходит при культивировании

продуцента при низком значении рН среды. В таких условиях синтез других органических кислот подавляется. Процесс кислотообразования осуществляется в условиях достаточного обеспечения культуры молекулярным кислородом.

В процессе ферментации, как принято называть микробиологические производства, можно выделить две фазы (рис. 26.2): 1) активного роста гриба и 2) интенсивного кислотообразования, рост мицелия в этот период становится незначительным.

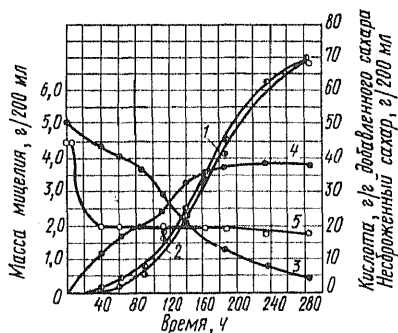


Рис. 26.2. Рост *Aspergillus niger* и образование лимонной кислоты (Прескотт и Дэн, 1952):

1 — титруемая кислотность (в пересчете на лимонную кислоту), 2 — лимонная кислота; 3 — сахар в среде, 4 — масса мицелия; 5 — рН среды

#### 26.1.1.5. Производство лимонной кислоты

При производстве лимонной кислоты применяются три способа ферментации: 1) культивирование продуцента на поверхности твердой питательной среды (твердофазная ферментация); 2) поверхностное культивирование на жидкой среде; 3) погруженное глубинное культивирование.

**Культивирование на поверхности твердой среды.** Гриб-продуцент (*A. niger*) выращивают в неглубоких лотках на поверхности влажных отрубей риса или пшеницы. Во время ферментации рН массы отрубей падает до 1,8—2,0. После окончания процесса лимонная кислота вместе с небольшим количеством одновременно образовавшихся глюконовой и щавелевой кислот экстрагируется водой, а затем осаждается в виде соли кальция. В связи с тем, что отруби богаты железом и другими микроэлементами, используют штаммы *A. niger*, не чувствительные к высоким концентрациям металлов. Такой наиболее простой метод получения лимонной кислоты применяется только в Японии.

**Поверхностное культивирование на жидкой среде.** Метод поверхностного культивирования широко используется для производства лимонной кислоты в странах Европы и Америки. Поверхность жидкой среды, разлитой в неглубокие кюветы, засевают конидиями гриба-продуцента. Кюветы размещают на стеллажах в термостатированных «бродильных камерах». Гриб развивается в виде плотной пленки на поверхности питательной среды, содержащей высокие концентрации сахара. Образующаяся лимонная кислота переходит из клеток мицелия в раствор, из которого после окончания процесса ее осаждают в виде кальциевой соли, а затем переводят в форму свободной кислоты и кристаллизуют.

Получение посевного материала (спор гриба) проводят в споровом цехе. Такие цехи, имеющиеся только на некоторых заводах, обеспечивают посевным материалом все предприятия. Приготовление питательной среды и превращение сахара грибом в лимонную кислоту, а также последующее отделение мицелия осуществляется в «бродильном цехе». Выделение лимонной кислоты из «сброженных» растворов и получение ее в кристаллическом виде производят в химическом цехе.

В качестве продуцентов лимонной кислоты поверхностным методом на большинстве заводов нашей страны, а также на ряде фирм за рубежом используются мутантные штаммы *A. niger* (например, Р-1 и Р-3).

Производство посевного материала осуществляют в стерильных условиях следующим образом. Споры исходной музейной культуры высевают на поверхность агаризованной питательной среды, разлитой в алюминиевые кюветы площадью 10—12 дм<sup>2</sup>, последние помещают в термостат. На поверхности среды формируется плотная пленка мицелия, которая затем покрывается конидиями. Через 10 сут пленки просматривают и отбраковывают те из них, в которых обнаружено незрелое спороношение или инфекция. С поверхности мицелия споры собирают с помощью устройства, работающего по принципу пылесоса, споры просушивают в термокамере при 28—30 °С, смешивают со стерильным активированным углем в отношении 1:2, расфасовывают в стерильные колбы и банки емкостью 0,5—1,0 л, закрывают ватными пробками и сохраняют при комнатной температуре. Срок годности спор 6 мес. В таком виде посевной материал (споры) передается на заводы, производящие кислоту.

Выращивание гриба осуществляют в плоских кюветах (высота бортов до 20 см), расположенных одна над другой на стеллажах в «бродильной камере» (рис. 26.3). В зависимости от размера камеры в ней могут быть расположены два или более стеллажа. На каждом стеллаже размещается 8—10 кювет, расстояние между которыми (по вертикали) 30—40 см. Кюветы изготовляют из нержавеющей стали или чистого алюминия — материалов не подвергающихся коррозии и не загрязняющих среду ионами Fe. Заполнение кювет стерильной средой и слив из них сброженного раствора производится через штуцер в дне кюветы, соединенный шлангом с общим стояком, находящимся вне камеры. Камера оборудована системой приточно-вытяжной вентиляции, обеспечивающей подачу стерильного воздуха необходимой температуры и влажности. Воздух равномерно распределяется по всей камере.

Среду готовят в специальном отделении. В качестве источника углерода в нее вносят сахарозу. При организации первых производств лимонной кислоты сырьем служил кристаллический свекловичный сахар. В 50-е годы на заводах в нашей стране сахар был заменен на свекловичную мелассу (отход сахарного производства). Меласса содержит от 43 до 49% сахарозы, отли-

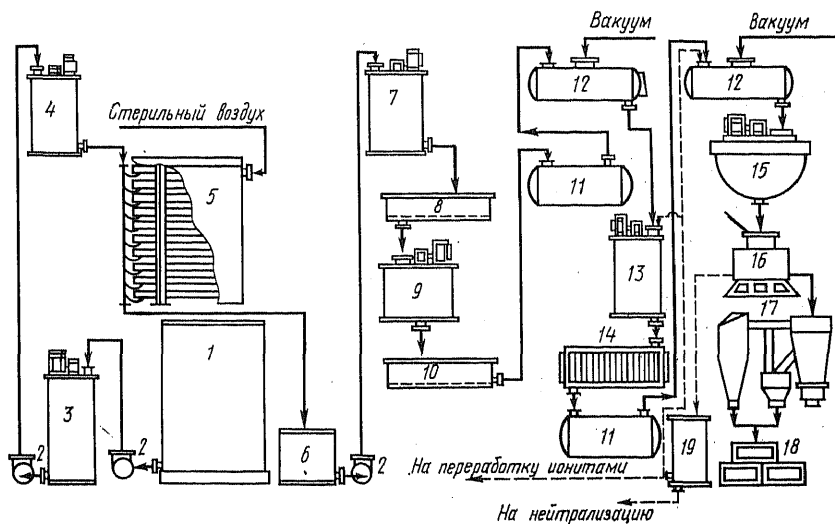


Рис. 26.3. Технологическая схема получения лимонной кислоты из мелассы поверхностным способом (Карклиньш и Пробок, 1972):

1 — цистерна для мелассы; 2 — центробежные насосы; 3 — реактор для разбавления мелассы; 4 — стерилизатор; 5 — бродильная камера; 6 — сборник сброженных растворов; 7 — нейтрализатор; 8 — нутч-фильтр; 9 — расщепитель; 10 — нутч-фильтр; 11 — сборник-монтаж; 12 — вакуум-аппарат; 13 — диссоolver; 14 — фильтр-пресс; 15 — кристаллизатор; 16 — приемник; 17 — сушилка; 18 — готовая продукция; 19 — сборник фильтрата

чается сложностью и непостоянством химического состава. Она содержит большое количество микроэлементов, в первую очередь железо, угнетающее образование кислоты грибом. Поэтому перед введением в среду мелассу необходимо освободить от ионов металлов. В США мелассу освобождают от металлов с помощью катионообменных смол. В СССР обычно применяется обработка мелассы желтой кровяной солью ( $K_4Fe(CN)_6$ ) с последующим кипячением раствора. В результате соли железа и других тяжелых металлов осаждаются и их удаляют из раствора сахара.

Подготовленные стерильные кюветы заполняют стерилизованной средой (высота слоя жидкости 12 см) и засевают спорами гриба. Конидии, нанесенные на поверхность питательного раствора, прорастают, образуется мицелий гриба и прочная пленка, покрывающая всю поверхность раствора. Максимальная интенсивность роста мицелия наблюдается примерно на 4-е сут, что сопровождается активным тепловыделением и образованием  $CO_2$ . В процессе ферментации происходит постепенное нарастание общей кислотности. Начальное значение pH среды 6,8—7,0 снижается в течение первых трех суток до 4,5, а к концу процесса до 3,0.

Активность кислотообразования грибной пленки, невысокая вначале, достигает максимума на 5—6-е сут ( $100\text{--}105$  г лимонной кислоты/ $m^2$  пленки $\cdot$ ч $^{-1}$ ) и далее удерживается на высоком уровне ( $60\text{--}50$  г кислоты/ $m^2$  $\cdot$ ч $^{-1}$ ). Ферментацию можно про-

длить, доливая в среду раствор сахара или подводя под пленку свежую среду. Различают три основных способа ведения процесса: бессменный, сменный и доливной.

При *бессменном способе* рост и кислотообразование гриба происходят на одной и той же питательной среде, содержащей минеральные соли и источник углерода. Источник углерода (кристаллический сахар или меласса) вносится в питательную среду в количестве, необходимом для обеспечения нормального роста и активного кислотообразования гриба.

*Сменный способ* культивирования часто называют методом готовых пленок. Пленку гриба выращивают на питательной среде, содержащей минеральные соли и углевод. По окончании роста гриба питательный раствор из-под пленки сливают, пленку промывают стерильной водой и под нее подводят новую среду для кислотообразования, обычно содержащую углевод, но лишенную минеральных соединений. Такой способ культивирования может быть односменным или многосменным. В первом случае после удаления питательного раствора под готовую пленку еще раз подливают новый раствор для кислотообразования. Доливаемый раствор имеет повышенную концентрацию сахара и находится под пленкой сравнительно длительное время (4—6 сут). При многосменном методе переработанные растворы несколько раз в течение цикла сливают из-под пленки и заменяют новыми. Частота смены зависит от активности грибной пленки.

*Способ долива* — один из наиболее часто используемых для удлинения цикла ферментации. Через 6—7 сут от начала цикла, когда содержание остаточного сахара в растворе снизится до 3—4%, подливают свежий раствор мелассы (без питательных солей) в количестве 30—35% начального объема. В результате продолжительность цикла ферментации увеличивается с 8—9 до 12 сут.

При получении лимонной кислоты поверхностным способом одним из важнейших факторов является воздушный режим в камерах, т. е. аэрация, температура и влажность.

На стадии роста мицелия считается необходимым поддерживать температуру питательного раствора на уровне 34—36 °С и подавать 3—4 м<sup>3</sup> воздуха в час на 1 м<sup>2</sup> мицелия. Количество воздуха увеличивают по мере развития мицелия. Когда гриб усиленно продуцирует кислоту и выделяет много тепла, объем воздуха, подаваемого в камеру, увеличивают до 15—18 м<sup>3</sup>/м<sup>2</sup> в час, а температуру среды поддерживают на уровне 28—34 °С.

В заводских условиях при использовании в качестве продуцента *A. niger* P-1 или *A. niger* P-3 концентрация лимонной кислоты в конце процесса достигает 150—200 г/л ферментационного раствора. Лимонная кислота составляет 96—99% от общей суммы кислот, а выход ее равен 85—91% от внесенного сахара.

После окончания ферментации культуральную жидкость из-под мицелия сливают и переводят для выделения лимонной кислоты в химический цех. Пленки гриба собирают и используют

для выделения содержащегося в них фермента — пектиназы либо высушивают и используют в качестве добавок в корм скоту и птицы.

*Глубинное культивирование.* Этот относительно молодой метод производства лимонной кислоты обладает многими преимуществами по сравнению с более ранним методом поверхностного культивирования. Применение глубинного метода позволяет повысить эффективность использования производственных площадей, увеличить масштабы производства, механизировать трудоемкие работы и почти полностью автоматизировать технологический процесс получения кислоты.

Однако при сравнении технологии и экономичности поверхностного и глубинного способов получения лимонной кислоты предпочтение можно отдать первому методу, поскольку при его применении себестоимость продукта и расход электроэнергии значительно ниже.

В настоящее время оба метода: поверхностный с использованием жидких сред и глубинный — применяют в промышленном производстве лимонной кислоты, причем одни фирмы предпочитают старый традиционный поверхностный метод, а другие — методы погруженного культивирования. В Советском Союзе лимонную кислоту получают и тем и другим способом.

Штаммы *A. niger*, используемые в качестве продуцентов лимонной кислоты при поверхностном методе, непригодны для использования в условиях глубинного культивирования. При этом методе применяют специально селекционированные природные штаммы или мутанты. В СССР используют мутантный штамм *A. niger* № 288/9. Штамм сохраняется в виде конидий, отделенных от мицелия («споровый консерв»). В качестве посевного материала для ферментации используются конидии гриба, смешанные с активированным углем или тальком. Способ подготовки спорового материала такой же, как для продуцента, используемого при поверхностном культивировании. Процесс ферментации включает два этапа: 1) выращивание мицелия в посевном аппарате; 2) рост мицелия и кислотообразование в основном ферментаторе. В качестве источника углерода при существующем методе глубинной ферментации лимонной кислоты используют мелассу, освобожденную от ионов Fe, Mn и других металлов путем обработки ферроцианидом калия.

В предварительно простерилизованный посевной аппарат (объем которого составляет  $\frac{1}{10}$  объема основного ферментатора) загружают питательную среду для подрачивания посевного материала, содержащую 3—4% сахара, затем через инокулятор вносят суспензию спор гриба. Сразу после засева в ферментатор подают стерильный воздух и включают в работу мешалку. Прорастание спор и формирование мицелия гриба происходит при непрерывном продувании воздуха через культуральную жидкость и перемешивании ее. Температура среды поддерживается около 32 °С. Через 20—36 ч выращивания сформированный в

виде гранул мицелий гриба вместе с культуральной жидкостью передается по посевной линии в заранее подготовленный основной ферментатор.

Основной процесс в производственном ферментаторе продолжается 5—7, а в некоторых случаях до 10 сут при непрерывной аэрации среды и ее перемешивании. Исходная среда для ферментации имеет низкую концентрацию сахара (3—4%). Более высокая концентрация мелассы не может быть использована из-за ее высокой буферности и создания рН культуральной среды, не благоприятного для синтеза лимонной кислоты. По мере потребления образовавшимся мицелием гриба сахара из среды производится подлив специально подготовленного концентрированного (25—28% по сахару) раствора мелассы. Обычно осуществляется три подлива из расчета доведения конечной концентрации сахара в культуральной жидкости до 12—15%. В конце ферментации концентрация лимонной кислоты достигает 50—120 г (в зависимости от качества мелассы, а также активности штамма) и составляет 80—95% общей суммы кислот. Когда активность кислотообразования падает, процесс прекращают. Культуральный раствор освобождают от мицелия фильтрацией или другим способом и передают в химический цех для выделения и последующей кристаллизации лимонной кислоты (рис. 26.4).

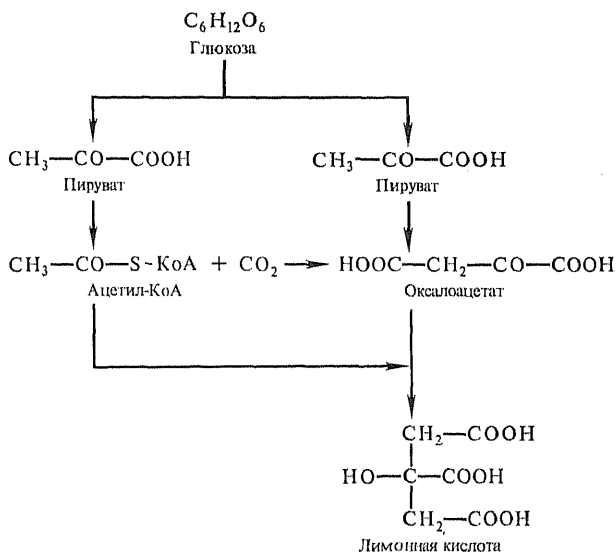
Лимонную кислоту выделяют в виде трудно растворимой при высокой температуре соли кальция. Для получения цитрата кальция к отфильтрованному культуральному раствору добавляют хлористый кальций (2,5—3% от количества кислоты), раствор нагревают до 100 °С и нейтрализуют известковым  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  или меловым ( $\text{CaCO}_3$ ) молоком до рН 6,8—7,0. Выпавший в осадок трехкальциевый цитрат отфильтровывают, промывают горячей водой и разлагают серной кислотой. Лимонная кислота полностью освобождается и переходит в раствор, а остающиеся в осадке гипс и оксалат кальция удаляют фильтрацией. Раствор после ряда дополнительных стадий очистки упаривают под вакуумом и проводят кристаллизацию лимонной кислоты. В продажу поступает кристаллическая лимонная кислота.

### 26.1.6. Механизм биосинтеза

Лимонная кислота образуется *A. niger* (и другими грибами) в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) в результате конденсации оксалоацетата и ацетил-КоА, осуществляемой цитрат-синтазой.

Необходимые для реакции оксалоацетат и ацетил-КоА образуются из двух молекул пирувата: одна молекула пирувата подвергается декарбоксилированию с образованием ацетил-КоА, вторая — карбоксилируется, давая оксалоацетат. Пируват образуется по фруктозобисфосфатному пути (пути Эмбдена, Мейергофа — Парнаса). Все ферменты этого пути, а также пируватдегидрогеназа, пируваткарбоксилаза и цитрат-синтаза обнаружены у *A. niger*. В результате рассмотренных реакций одна молекула





сахара ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) превращается в одну молекулу лимонной кислоты ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ). Экспериментально получаемый выход лимонной кислоты (95—98%) неразмножающимися клетками *A. niger* близок к теоретическому.

Полагают, что аконитат-гидратаза (аконитаза) и изоцитрат-дегидрогеназа, ответственные за метаболизм лимонной кислоты в ЦТК, хотя и присутствуют в клетках гриба в период синтеза этой кислоты, однако их активность ограничена дефицитом ионов металлов (Fe, Mn), низким значением pH среды, а также рядом образовавшихся метаболитов. Аконитат-гидратаза — железопротеин: для ее активации необходим ион  $\text{Fe}^{2+}$ , а ингибитором фермента является  $\text{H}_2\text{O}_2$ , накапливающаяся в Fe-дефицитных клетках гриба. В отношении изоцитратдегидрогеназы установлено, что ферроцианид калия ингибирует этот фермент. В связи с этим становится понятным положительный эффект присутствия избытка данной соли в среде на процесс накопления кислоты. Другим ингибитором изоцитратдегидрогеназы служит лимонная кислота, накапливающаяся в клетках в высокой концентрации и угнетающая активность фермента.

Таким образом, представления в отношении причин сверхсинтеза грибами лимонной кислоты можно суммировать следующим образом. Лимонная кислота — обычный метаболит ЦТК и в небольшом количестве присутствует в клетках разных микроорганизмов. Некоторые грибы (в первую очередь *A. niger*) способны синтезировать огромные количества этой кислоты. Сверхсинтез лимонной кислоты происходит при лимитировании роста грибов-продуцентов минеральными компонентами среды и одновременно избыточном содержании источника углерода.

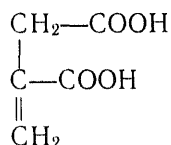
В условиях лимитирования роста гриба недостатком одного

или нескольких минеральных компонентов (Fe, Mn, N, P или S) после полного поглощения из среды дефицитного элемента он прекращает расти, однако продолжает потреблять имеющийся в среде источник углерода. При этом в клетках гриба начинает накапливаться лимонная кислота, которая в дальнейшем выделяется в среду. Образовавшаяся лимонная кислота не может полностью метаболизироваться в ЦТК из-за ингибирования ряда ферментов (аконитат-гидратазы, изоцитратдегидрогеназы и, возможно,  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы).

## 26.1.2. Итаконовая кислота

### 26.1.2.1. Характеристика кислоты и продуцента

Итаконовая (метиленянтарная) кислота — ненасыщенная двухосновная кислота:



Она может быть получена химическим путем из лимонной или аконитовой кислоты. Кроме того, итаконовая кислота является продуктом метаболизма углеводов грибами рода *Aspergillus*, а именно *A. itaconicus*, выделенного в 1929 г. японским исследователем Киношита, и *A. terreus*, обнаруженным несколько позднее английским ученым Кэлэмом (1939).

Способность итаконовой кислоты и ее производных легко полимеризоваться дает возможность образовывать многочисленные синтетические материалы, обладающие ценными свойствами и находящие широкое применение. Итаконовая кислота применяется в производстве высококачественных синтетических смол, синтетических волокон (в том числе нитрилакрилового волокна «нитрон»), поверхностно-активных веществ, моющих средств, фармацевтических препаратов, инсектицидов, красителей и других сложных органических соединений. Потребность в итаконовой кислоте непрерывно возрастает.

Получение итаконовой кислоты микробиологическим способом на основании использования *A. terreus* налажено в США, Японии и СССР. В нашей стране потребность в итаконовой кислоте возникла в связи с производством нитрилакрилового волокна «нитрон». Продуцентом кислоты явились специально селекционированные штаммы *A. terreus*. В соответствии с увеличением потребности химической промышленности в итаконовой кислоте масштабы производства этой кислоты неуклонно возрастают.

### 26.1.2.2. Производство итаконовой кислоты

Процесс синтеза итаконовой кислоты очень похож на соответствующий процесс получения лимонной кислоты. Как одна, так и другая кислоты могут быть получены методами поверхностного и глубинного культивирования. Чаще используется глубинный метод. Процесс включает культивирование продуцента на средах с высокой концентрацией сахара (чаще мелассой) в условиях ограничения роста гриба минеральными компонентами среды (обычно железом и фосфором) при низком рН среды и достаточном обеспечении кислородом.

Итаконовая кислота в отличие от лимонной является токсичным продуктом. При концентрации ее в среде около 70 г/л наблюдается угнетение роста продуцента и синтеза продукта. Избежать токсичного действия накапливающейся кислоты можно нейтрализацией ее  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Периодическое введение  $\text{NH}_4\text{OH}$  и поддержание значения рН среды на уровне 3,8 обеспечивает накопление до 150—200 г итаконовой кислоты в литре раствора.

Другая особенность процесса синтеза итаконовой кислоты с помощью *A. terreus* — необходимость внесения в среду высоких концентраций ионов таких металлов, как  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ .

В нашей стране разработана технология производства итаконовой кислоты методами поверхностного и глубинного культивирования. В результате многоступенчатой обработки природного штамма мутагенами и последующего отбора селекционирован ряд высокоактивных мутантов *A. terreus*, один из них (ЭУУ-417) используется для производства итаконовой кислоты на всех заводах Советского Союза.

В качестве посевного материала при поверхностном и глубинном методах ферментации в промышленности используют сухие конидии гриба, отделенные от мицелия и смешанные с активированным углем. Цех конидий Рижского экспериментального завода обеспечивает спорным материалом все производства кислоты в стране.

При поверхностном способе процесс ферментации осуществляется в кюветах по бесшвенному варианту без долива или с доливом. В качестве источника углерода используют свекловичную мелассу или продукт переработки отходов древесины — двойное соединение глюкозы с  $\text{NaCl}$ . Рациональная концентрация сахара 8%, кроме того, среда содержит  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  и кукурузный экстракт. Начальное рН среды 5,0. Важным фактором является воздушный режим в «бродильной камере».

При глубинном способе процесс осуществляется последовательно в двух ферментаторах. Среда в посевном ферментаторе засеивается спорами гриба. В конце экспоненциальной фазы роста мицелий передается из посевного в основной аппарат. Ферментационная среда содержит 6—7% сахара мелассы (состав солей тот же, что и при поверхностном методе), рН среды под-

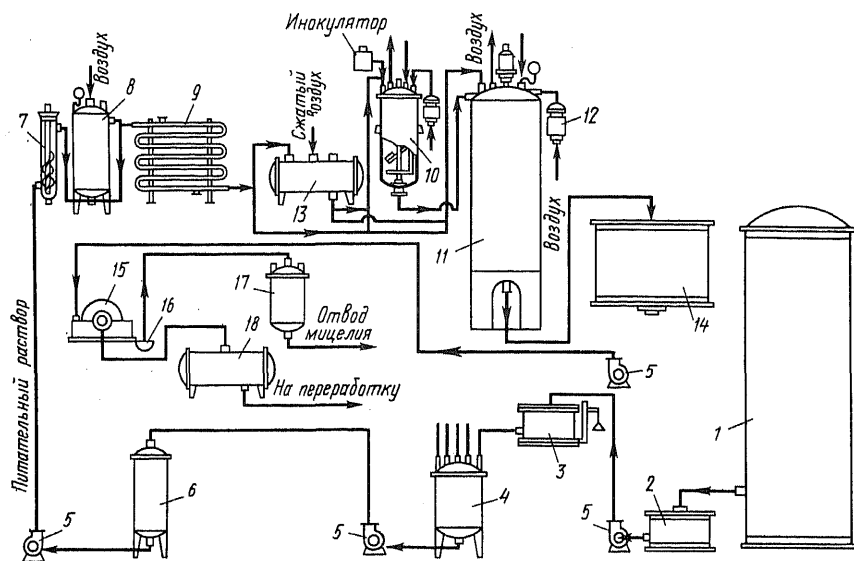


Рис. 26.4. Технологическая схема получения лимонной кислоты глубинным способом (Карлиньш и Пробок, 1972):

1 — бак с мелассой; 2 — приемный бак; 3 — весы; 4 — варочный котел; 5 — центробежный насос; 6 — промежуточная емкость; 7 — стерильная колонка; 8 — выдерживатель; 9 — холодильник; 10 — посевной ферментатор; 11 — производственный ферментатор; 12 — противобактериальные фильтры; 13 — емкость для хранения мелассы; 14 — промежуточный сборник; 15 — барабанный вакуум-фильтр; 16 — корыто для приема мицелия; 17 — вакуум-сборник для мицелия; 18 — вакуум-сборник фильтрованного (сброженного) раствора

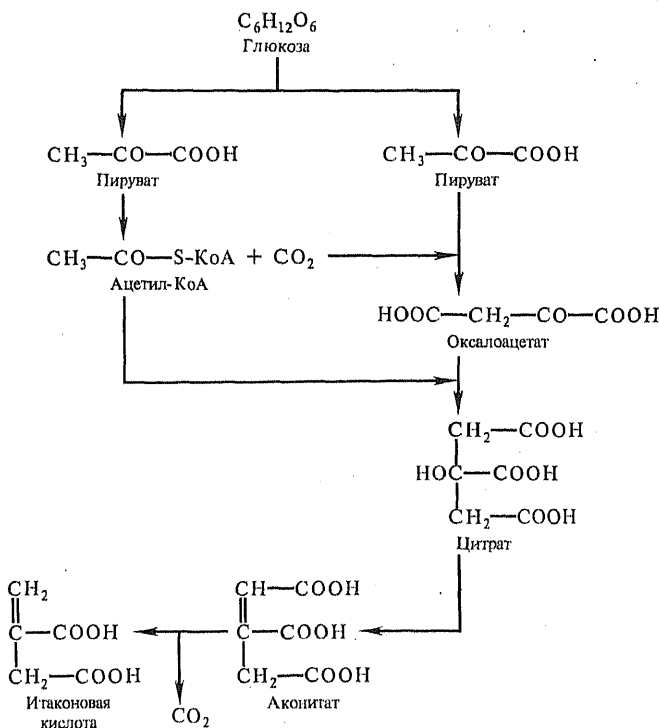
держивается на уровне 2,1—2,3, оптимальном для синтеза итаконовой кислоты. В течение ферментации осуществляется интенсивное перемешивание и аэрация среды. На рис. 26.5 представлена динамика потребления сахара, образования мицелия гриба и увеличения концентрации итаконовой кислоты в среде. В конце процесса концентрации кислоты достигает 40—60 г/л. Биосинтез итаконовой кислоты в глубинных условиях происходит намного интенсивнее, чем в поверхностных.

После окончания процесса ферментации культуральную среду освобождают от мицелия, осветляют активированным углем и упаривают под вакуумом. Итаконовая кислота кристаллизуется из упаренного раствора. Перекристаллизованная итаконовая кислота используется для химических синтезов.

### 26.1.2.3. Механизм биосинтеза

Полагают, что биосинтез итаконовой кислоты связан с превращением глюкозы по фруктозобисфосфатному пути и реакций ЦТК. Непосредственным предшественником итаконовой кислоты, видимо, служит цис-аконитовая кислота, продукт превращения цитрата под действием аконитат-гидратазы. У *A. terreus* обнаружена также аконитатдекарбоксилаза, осуществляющая реакцию

декарбоксилирования цис-аконитата с образованием итаконовой кислоты. В свою очередь итаконовая кислота под действием итаконидазы, обнаруженной в клетках ряда штаммов *A. terreus*, может далее превращаться в итавинную кислоту:

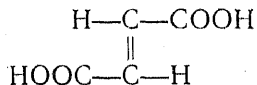


Ряд исследователей полагают, что итаконовая кислота — обычный метаболит некоторых грибов и при соответствующих условиях может этими грибами потребляться как источник углерода. Считается, что избыточный синтез и выделение итаконовой кислоты в среду происходит в результате ингибирования метаболизма итаконата. В качестве возможных ингибиторов рассматривают ион  $Cu^{2+}$  и низкое значение pH среды.

### 26.1.3. Фумаровая кислота

#### 26.1.3.1. Характеристика кислоты

Фумаровая кислота — транс-изомер этилендикарбоновой кислоты:



Большое значение имеет способность фумаровой кислоты превращаться в малеиновую кислоту (цис-изомер), которая, как и малеиновый ангидрид, используется для изготовления синтетических смол, красок и лаков. Превращение фумаровой кислоты в малеиновую осуществляется длительным нагреванием в кислом растворе. Считается, что производство малеиновой кислоты из фумаровой кислоты дороже производства малеинового ангидрида окислением паров бензина химическим путем молекулярным кислородом в присутствии металлических катализаторов. Однако в некоторых случаях смолы с фумаровой кислотой имеют определенные преимущества и находят специальное применение (например, производство печатных красок). Фумаровая кислота дает смолы типа глицериновых, которые при использовании в лаках обладают большой крепостью и устойчивостью.

Кроме того, фумаровая кислота в виде магниевых и натриевых солей используется в медицине. В последнее время фумаровую кислоту все шире используют в пищевой промышленности как заменитель лимонной кислоты при изготовлении безалкогольных напитков.

### 26.1.3.2. Производство фумаровой кислоты и механизм биосинтеза

Фумаровая кислота может быть получена методом микробиологического синтеза с помощью грибов из углеводов. Однако официальных данных об организации такого микробиологического производства нет.

Фумаровая кислота — метаболит ЦТК, присутствует во всех живых клетках, но редко выделяется в среду. Продуцентами фумаровой кислоты могут быть различные виды грибов: *P. griseofulvum*, *A. glaucus*, *A. flavus*, *A. oniki*, *A. wentii*, *Caldariomyces fumago*. Наиболее активно продуцируют фумаровую кислоту мушкетерские грибы, особенно относящиеся к роду *Rhizopus* (некоторые штаммы *R. nigricans*, *R. delemar* и *R. arrhizus*).

В качестве источника углерода для синтеза фумаровой кислоты грибами используют глюкозу в концентрации 5—10% или крахмалсодержащие материалы. Важным фактором является ограничение роста гриба-продуцента источником азота и цинка. Ферментация осуществляется в условиях интенсивной аэрации с нейтрализацией среды  $\text{CaCO}_3$  или  $\text{NaOH}$ . Процесс может проводиться как методом поверхностного (бессменный, лучше многосменный вариант), так и методом глубинного культивирования. Наибольший выход фумаровой кислоты (58% от потребленной глюкозы) получен при использовании в качестве продуцента *R. delemar*.

Для выделения фумаровой кислоты культуральную жидкость освобождают от мицелия гриба, фильтрат подкисляют минеральной кислотой и свободную фумаровую кислоту, обладающую

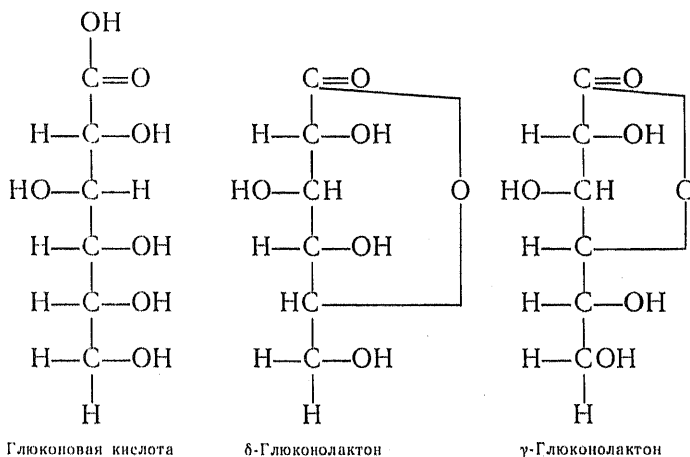
низкой растворимостью в воде, выкристаллизовывают из раствора.

Полагают, что фумаровая кислота образуется в результате реакций ЦТК, непосредственным предшественником кислоты является сукцинат. При использовании в качестве источника углерода этилового спирта или уксусной кислоты в клетках гриба, вероятно, оперирует также глиоксилатный цикл.

## 26.1.4. Глюконовая кислота

### 26.1.4.1. Характеристика кислоты

Глюконовая кислота представляет собой одноосновную пентаоксикислоту. Водный раствор глюконовой кислоты содержит равновесную смесь свободной кислоты и ее  $\delta$ - и  $\gamma$ -лактонов.



Глюконовая кислота может быть получена путем химического или электрохимического окисления глюкозы, однако микробиологические методы ее производства имеют ряд преимуществ и используются в промышленных масштабах.

Глюконовая кислота и ее дериваты имеют много областей применения. Глюконовая кислота — прекрасное комплексообразующее соединение, дающее стабильные комплексы с металлами, хорошо растворимые в воде, не обладающие токсичностью и не вызывающие коррозии металлов. Глюконат натрия широко применяется при изготовлении моющих средств для автоматизированной мойки бутылей и металлического оборудования. В качестве компонента моющих средств, содержащих также каустическую соду, Na-глюконат, предупреждает отложение на поверхностях нерастворимых Ca-, Mg- или Fe-солей.

Благодаря высокой комплексообразующей способности глю-

конат натрия широко используют в фотографии, литографии, при изготовлении водных красок, крашении тканей, дублении кож, протезировании зубов, изготовлении лучших сортов цемента, для очистки металлов, а также в электрогальванопластике.

Ca-, Fe- и K-Соли глюконовой кислоты находят широкое применение в медицинской и ветеринарной практике при лечении недостаточности соответствующих ионов металлов в организме. Кристаллический  $\delta$ -глюконолактон используют как латентный кислый компонент при изготовлении пекарских порошков (и других смесей), в которых он не реагирует с  $\text{NaHCO}_3$  до тех пор, пока не добавлена вода. В связи с этим свойством  $\delta$ -лактон находит широкое применение в пищевой промышленности.

Основными производителями глюконовой кислоты являются США и Япония. В США глюконовая кислота выпускается в форме свободной кислоты (50%-ный водный раствор), кристаллического  $\delta$ -глюконолактона, глюконата натрия и глюконата кальция. В Японии в 1977 г. было произведено 12 000 т глюконовой кислоты, из них 3000 т в виде  $\delta$ -лактона использовано в пищевой промышленности для коагуляции белка сои и изготовления «творога», остальные 9000 т кислоты и ее Na-соли были использованы в различных отраслях индустрии. Производство глюконовой кислоты и глюконата натрия имеется в ряде европейских государств, в том числе во Франции, Ирландии, ФРГ, Нидерландах, Дании; в последней ежегодно производится около 3000 т кислоты. Общая продукция глюконовой кислоты в мире оценивается примерно в 30 000 т в год.

#### **26.1.4.2. Производство глюконовой кислоты и механизм биосинтеза**

Способность продуцировать глюконовую кислоту при росте на средах с глюкозой — свойство, широко распространенное среди бактерий рода *Acetobacter* и *Pseudomonas*. Первые способы получения глюконовой кислоты были основаны на использовании в качестве продуцентов уксуснокислых бактерий. Однако эти методы не нашли промышленного применения.

Способность некоторых плесневых грибов продуцировать глюконовую кислоту была обнаружена в 1922 г. независимо друг от друга Мольяром и Буткевичем. Первым детально исследованным продуцентом этой кислоты был *P. purpurogenum*, который пытались использовать для получения свободной глюконовой кислоты методом поверхностного культивирования. Однако процесс ферментации был длительным, а выход кислоты низким, в связи с чем процесс не нашел практического применения.

Современное производство глюконовой кислоты основано на применении специально селекционированных штаммов *A. niger*. Процесс ферментации осуществляется в огромных ферментаторах (объемом несколько десятков м<sup>3</sup>). Засев основных фермен-



тационных аппаратов, как и при производстве лимонной кислоты, производится мицелием гриба, предварительно выращенным в посевном аппарате небольшого объема.

Важными моментами ведения процесса являются: 1) ограничение роста мицелия гриба источником азота при избыточном содержании источника углерода; 2) постоянная нейтрализация образующейся кислоты и поддержание значения рН среды на уровне 6,0—7,0; 3) интенсивная аэрация культуры. Наилучшие результаты достигнуты при создании повышенного давления воздуха в аппарате и высокого насыщения среды кислородом. Ферментация осуществляется при температуре около 30 °С.

Для поддержания стабильного значения рН используют стерильный мел, который вносят в среду в два приема, или ведут непрерывную подтитровку раствором щелочи (NaOH). В первом случае продуктом, накапливающимся в культуральной жидкости, является глюконат кальция, обладающий ограниченной растворимостью в воде (~40 г/л при 30 °С). При подтитровке среды щелочью получают глюконат натрия, растворимость которого в воде гораздо выше (367 г/л при 20 °С и 569 г/л при 80 °С).

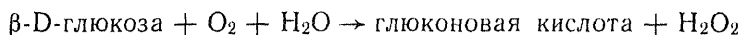
Метод ферментации в присутствии CaCO<sub>3</sub> разработан в США в начале 40-х годов. С этих пор и до настоящего времени этим методом ежегодно получают 200—300 т глюконата кальция. В связи с низкой растворимостью глюконата кальция в среде исходная концентрация глюкозы не должна превышать 100—150 г/л.

Метод ферментации с подтитровкой среды NaOH лишен такого недостатка. В этом случае исходная концентрация глюкозы в среде может быть увеличена до 35 %. Выход Na-глюконата составляет 95% от внесенного сахара. В качестве источника углерода могут быть использованы кристаллическая глюкоза и сиропы, содержащие глюкозу, полученные в результате гидролиза крахмалсодержащих материалов.

В Японии разработан метод непрерывного производства глюконата натрия. Выход продукта в этом случае превышает 95 % от внесенной глюкозы, а скорость процесса на 50—70 % выше, чем при периодическом культивировании того же продуцента.

Поскольку в различных областях промышленности применяется технический Na-глюконат, нет необходимости выделять соль из раствора. Культуральная жидкость освобождается от мицелия гриба, упаривается и высушивается. В случае необходимости глюконат натрия может быть перекристаллизован или переведен в форму свободной кислоты химическими методами. Причиной сверхсинтеза глюконовой кислоты является лимитирование роста *A. niger* недостатком источника азота в среде. Сходное действие, по-видимому, оказывает дефицит фосфора. При культивировании гриба в условиях, когда значение рН среды близко к 7,0, и высокой концентрации молекулярного кислорода в клетках содержится большое количество глюкозооксидазы. Этот фермент является флавопротеином, содержащим флавинадениндинуклеотид (ФАД)

в качестве простетической группы. Глюкозооксидаза осуществляет окисление β-D-глюкопиранозы кислородом. Продуктами реакции являются перекись водорода и β-D-глюконо-δ-лактон. Лактон далее подвергается гидролизу с образованием глюконовой кислоты. Суммарно две указанные реакции можно выразить уравнением



Мицелий гриба, отделенный от культуральной жидкости, используется для получения коммерческого препарата глюкозооксидазы. Очищенный фермент применяется в пищевой и фармацевтической промышленности, а также для анализа глюкозы в биологических жидкостях.

### 26.1.5. Другие органические кислоты

В Японии существует промышленное производство 2-кетоглюконовой кислоты (около 1800 т в год). Продукт кислоты — бактерия *Pseudomonas fluorescens*, выход кислоты достигает 90 % от потребленной глюкозы. Кислота служит исходным материалом для последующего получения D-арабаскорбиновой кислоты. Последняя является антиоксидантом, используемым в пищевой промышленности. Около 1500 т D-арабаскорбиновой кислоты ежегодно экспортируется Японией в США, Канаду, Европу, Корею.

Из других органических кислот необходимо остановиться еще на двух — койевой и щавелевой. Койевая кислота — сырье, используемое при производстве ряда лекарственных веществ, синтетических смол и красителей. В ограниченных количествах кислота производится с помощью *A. oryzae*.

Щавелевая кислота может быть получена с высоким выходом из углеводов с помощью грибов. Однако химические методы ее производства более экономичны.

### 26.2. ПОЛУЧЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ИЗ N-АЛКАНОВ

Последние пятнадцать — двадцать лет внимание исследователей различных стран привлечено к углеводородам нефти как возможному сырью для ряда микробиологических синтезов. Из числа углеводородов, входящих в состав нефти, наиболее легко потребляются микроорганизмами n-алканы. За счет использования их хорошо растут представители различных групп бактерий, дрожжи и мицелиальные грибы. Очищенные жидкие парафины уже используются для производства кормовых дрожжей.

Возможности микробиологического получения органических кислот из n-алканов не только не меньше, но, по-видимому, даже больше, чем их биосинтез из сахаров. На схеме метаболизма n-алканов (рис. 26.5) показано, что ряд органических кислот

является продуктами их окислительной деградации, в том числе алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, окси-, альдо-, кето- и непредельные кислоты. Более 50 различных органических кислот обнаружено в культуральной жидкости микроорганизмов, растущих на средах с *n*-алканами. Однако к настоящему времени достаточно отработаны методы микробиологического получения из *n*-алканов только кислот — интермедиагов ЦТК ( $\alpha$ -кетоглутаровой, лимонной, изолимонной, фумаровой и яблочной кислот).

Способность продуцировать в значительном количестве органические кислоты при росте на средах с *n*-алканами является свойством, широко распространенным среди различных бактерий и грибов. Дрожжи рода *Candida* привлекают в этом отношении особое внимание. Организмы, относящиеся к этому роду, широко распространены в природе. Большинство видов способны использовать парафины в качестве источника углерода и энергии.

Активные продуценты лимонной, изолимонной,  $\alpha$ -кетоглутаровой и янтарной кислот наиболее часто обнаруживаются среди дрожжей этого рода (*C. brumptii*, *C. citrica*, *C. guilliermondii*, *C. hydrocarbofumarica*, *C. lipolytica*, *C. oleophila*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides* и др.). Клетки дрожжей имеют овальную или округлую форму, размножаются почкованием, способны к образованию цепочек клеток, а также псевдомицелия или истинного мицелия. Большинство видов — строгие аэробы.

Относятся *Candida* к классу несовершенных грибов (*Fungi imperfecti*), порядку *Cryptococaceae*. Отличительным признаком несовершенных грибов является отсутствие полового процесса и неспособность к образованию аско- и базидиоспор. У большинства видов и штаммов *Candida*, выделенных из природы или длительное время поддерживаемых в лаборатории, действительно не удается наблюдать образования асков и аскоспор. Однако недавно удалось обнаружить половой процесс и образование аскопор у представителей нескольких видов *Candida*. В связи с этим они перенесены в другие таксономические группы. Так, вид *C. guilliermondii* получил название *Pichia guilliermondii*, а *C. lipolytica* — *Jarrowia lipolytica*.

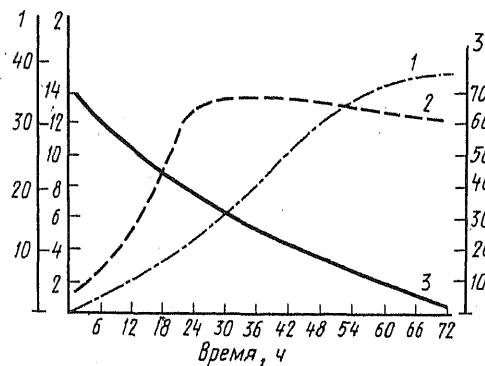


Рис. 26.5. Динамика роста *Aspergillus terreus* и образования итаконовой кислоты (Карклиньш и Пробок, 1972):

1 — итаконовая кислота (г/л), 2 — масса мицелия (г/л), 3 — сахар в среде (г/л)

### 26.2.1. Получение $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты

$\alpha$ -Кетоглутаровая (2-оксоглутаровая) кислота ( $\text{HOOC—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CO—COOH}$ ) — первая органическая кислота, обнаруженная в больших количествах в культуральной жидкости алканассимилирующих дрожжей. Производят кислоту тиамин-науксотрофные дрожжи вида *S. lipolytica* (*J. lipolytica*). Эти дрожжи не способны самостоятельно синтезировать пириимидиновую часть молекулы тиамина и нуждаются во внесении тиамин в среду. Сверхсинтез 2-кетоглутаровой кислоты дрожжами происходит при культивировании *S. lipolytica* на средах с низкой концентрацией тиамин, так как обязательным условием образования ее в значительном количестве является лимитирование роста продуцента дефицитом этого витамина.  $\alpha$ -Кетоглутаровая кислота — ценный биохимический препарат. Она легко аминируется химическим или ферментативным способом и может служить сырьем для производства глутаминовой кислоты. Кроме того,  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота — прекрасный источник углерода для различных микроорганизмов. Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР совместно с Институтом микробиологии им. А. Кирхенштейна и его экспериментальным заводом разработан новый микробиологический метод получения  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты из углеводов.

Метод состоит в культивировании специально селекционированного штамма *S. lipolytica* на синтетической среде с очищенным парафином в качестве источника углерода. Рост продуцента ограничивается дефицитом тиамин в среде. Ферментация осуществляется в ферментаторе, снабженном мешалкой, в условиях интенсивной аэрации.  $\alpha$ -Кетоглутаровая кислота, образующаяся дрожжами, нейтрализуется периодическим добавлением стерильного раствора  $\text{NaOH}$ . В конце процесса культивирования выход  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты достигает 70 % от внесенного в среду парафина.

Синтез  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты дрожжами начинается не сразу, а после потребления тиамин из среды и при концентрации его в дрожжах ниже определенного уровня (0,7—0,8 мкг/1 г клеток) (рис. 26.7). Процесс ферментации может быть условно разделен на две фазы: 1) фазу активного роста продуцента (сопровождающуюся полным потреблением тиамин из среды); 2) фазу замедления роста и интенсивного синтеза  $\alpha$ -кетоглутарата. Процесс кислотообразования продолжается неразмножающимися клетками до полного потребления субстрата.

Закономерности сверхсинтеза  $\alpha$ -кетоглутарата дрожжами являются общими для различных алканов, соответствующих монокарбоновых кислот и ацетата, так как синтез ее связан с особенностями метаболизма ацетил-КоА в ЦТК.

$\alpha$ -Кетоглутаровая кислота — метаболит цикла Кребса, образуется в результате декарбоксилирования изоцитрата. Клетки дрожжей, продуцирующие кислоту, имеют высокую активность

цитрат-синтазы и изоцитратдегидрогеназы. Однако дальнейшее превращение  $\alpha$ -кетоглутарата в цикле оказывается невозможным при дефиците тиамина и в результате низкой активности тиаминсодержащего фермента —  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы. Блокирование ЦТК на этом уровне приводит к накоплению  $\alpha$ -кетоглутарата в клетках и выделению его в среду. Одновременно у дрожжей, продуцирующих  $\alpha$ -кетоглутарат, активно функционирует глиоксилатный цикл, восполняющий утечку этого метаболита из клеток и обеспечивающий непрерывный ресинтез оксалоацетата и дальнейший синтез  $\alpha$ -кетоглутарата (рим. 26.6).

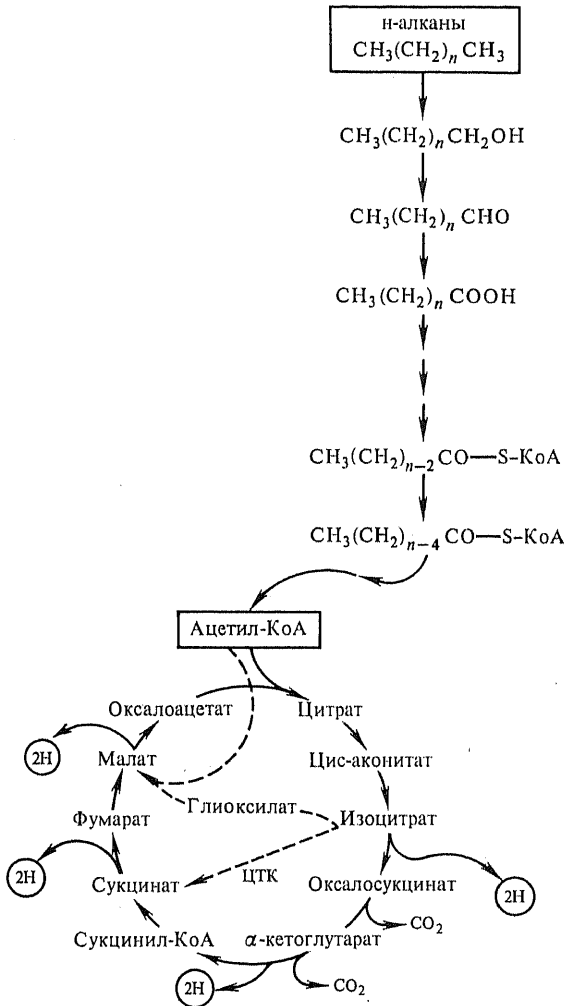


Рис. 26.6. Схема окисления *n*-алканов (Лозинов и Фипогенова, 1972)

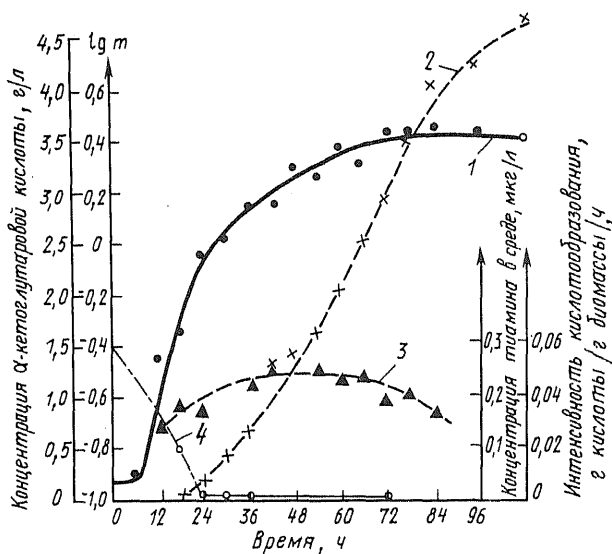


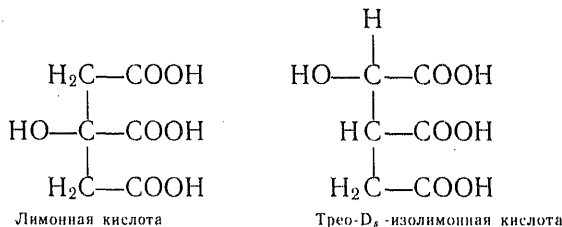
Рис. 26.7. Рост *Candida lipolytica* на среде с гексадеканом (0,8%) и синтез  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты (Лозинов и Финегонова, 1972):

1 — биомасса (г/л), 2 —  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота, 3 — интенсивность кислотообразования, 4 — тиамин в среде

### 26.2.2. Получение лимонной и изолимонной кислот

Лимонную кислоту также получают с помощью дрожжей из *n*-парафинов. Способность продуцировать эту кислоту широко распространена у различных видов дрожжей рода *Candida* (*C. lipolytica*, *C. guilliermondii*, *C. oleophila*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*).

Все без исключения природные штаммы дрожжей при росте на средах с алканами продуцируют две кислоты — лимонную и трео- $D_3$ -изолимонную, которые являются изомерами и различаются положением гидроксильной группы:



Лимонная кислота представляет наибольший практический интерес. Потребности различных отраслей промышленности в

этой кислоте удовлетворяются еще не полностью. В связи с этим в различных странах, в первую очередь в СССР и Японии, развернулись работы по целенаправленному получению лимонной кислоты с помощью дрожжей из углеводов нефти.

Наиболее активными продуцентами оказались дрожжи вида *C. lipolytica*, образующие примерно равные количества цитрата и изоцитрата. Основным условием сверхсинтеза этих кислот дрожжами является лимитирование их роста одним из компонентов среды (азотом, фосфором, серой или магнием) при избыточном содержании источника углерода (парафина). Практически удобнее лимитировать рост дрожжей источником азота.

В процессе ферментации можно различить две фазы: 1) фазу активного роста продуцента (сопровождающуюся полным потреблением источника азота); 2) фазу замедления роста и интенсивного синтеза изомеров лимонной кислоты. Процесс кислотообразования продолжается неразмножающимися клетками до полного потребления парафина из среды. Суммарный выход изомеров лимонной кислоты достигает 150 % от массы внесенного парафина.

В результате обработки природного штамма *C. lipolytica*, продуцирующего равные количества цитрата и изоцитрата, мутагенами и последующего отбора удалось получить две группы мутантов. Одна группа мутантов утратила способность продуцировать изолимонную кислоту при росте на среде с алканами и синтезировала практически только лимонную кислоту. Вторая группа мутантов при тех же условиях культивирования продуцировала преимущественно изолимонную кислоту.

У нас в стране разработан метод получения лимонной кислоты и ее солей из жидких парафинов с помощью специально селекционированного мутанта *C. lipolytica*. При культивировании такого штамма в ферментаторе в условиях интенсивного перемешивания и аэрации среды, а также стабильного поддержания необходимого рН удается достичь накопления до 200 г/л и более лимонной кислоты. Выход кислоты от использованного парафина превышает 140 %. После освобождения культуральной жидкости от дрожжей лимонная кислота или ее соли могут быть выделены из раствора химическими методами. Полученные таким образом технические цитраты натрия или калия могут быть использованы для изготовления бесфосфатных моющих средств или найдут применение в других областях промышленности.

Изолимонная кислота является ценным химическим препаратом, она используется пока только при биохимических исследованиях. В Советском Союзе изолимонная кислота до 1983 г. не производилась. За рубежом ее получают путем сложного химического синтеза, результатом которого является рацемическая смесь *d*- и *l*-форм кислоты. Биологической активностью обладает только *d*-форма (трео-*D*<sub>3</sub>-изолимонная кислота). Высокая стоимость препарата определяется сложностью метода химического синтеза и последующего выделения изолимонной кислоты. С по-

мощью мутантного штамма *C. lipolytica* — продуцента *d*-изоцитрата в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР разработан простой метод получения этого важного биохимического реагента из *n*-алканов.

В ряде зарубежных стран (Япония, США и др.) также разработаны методы получения лимонной кислоты из *n*-алканов. В большинстве случаев в качестве продуцентов используются различные мутантные штаммы *C. lipolytica*.

Полагают, что накопление цитрата и изоцитрата может быть объяснено высокой активностью в клетках продуцента цитратсинтазы в сравнении с относительно низкими активностями последующих ферментов ЦТК и в первую очередь изоцитратдегидрогеназы. Непрерывное образование и выделение в среду лимонной и изолимонной кислот в период лимитирования роста дрожжей источником азота может обеспечиваться функционированием глиоксилатного цикла.

Результаты анализа активностей ферментов и применения ингибиторов отдельных ферментов позволяют также предположить, что соотношение накапливаемых кислот (лимонной и изолимонной) определяется соотношением активностей аконитатгидратазы, изоцитратдегидрогеназы, а также изоцитрат-лиазы. Снижение активности аконитатгидратазы и повышение активности изоцитрат-лиазы приводит к преимущественному накоплению цитрата.

### 26.2.3. Получение фумаровой, яблочной и янтарной кислот

Фумаровая, яблочная и янтарная кислоты также являются метаболитами ЦТК. Однако лишь редкие штаммы дрожжей способны продуцировать их в значительном количестве при росте на средах с *n*-алканами.

Японские исследователи разработали метод получения фумаровой кислоты с помощью специально отобранного штамма *C. hydrocarbofumarica*. Кислота синтезируется в условиях лимитирования роста дрожжей источником азота. Максимальное содержание кислоты в среде 50 г/л, что составило 84 % от потребленного парафина.

Своеобразный метод разработан для получения яблочной кислоты из углеводов. В качестве продуцента использовалась смесь двух штаммов дрожжей. Из них *C. hydrocarbofumarica* активно метаболизирует *n*-алканы, превращая их в фумаровую кислоту, а второй *Pichia membranaefaciens*, обладая высокой фумаразной активностью, превращал образованную фумаровую кислоту в яблочную. Выход последней достигал 71—72 % от использованного субстрата.

Янтарная кислота может быть получена с помощью специально селекционированного штамма *C. brumptii*, но выход кислоты



не превышает 30 % от массы внесенного парафина. Кислота накапливается дрожжами в условиях дефицита азота.

Рассмотренные микробиологические методы получения органических кислот с помощью дрожжей из углеводов имеют ряд преимуществ в сравнении с соответствующими методами, основанными на использовании углеводов содержащих материалов (например, различные виды мелассы).

Первое преимущество заключается в том, что очищенные жидкие парафины являются стандартным сырьем, выпускаемым нефтехимической промышленностью (характеризуются постоянством химического состава). В случае мелассы перед использованием она должна быть освобождена от следов железа и других тяжелых металлов. При использовании очищенных жидких парафинов можно рассчитывать на более стабильное ведение процесса ферментации, а также на возможность упрощения стадий выделения и очистки целевого продукта.

Другим преимуществом использования *n*-алканов является более высокий по сравнению с углеводными субстратами выход получаемого продукта по отношению к массе внесенного источника углерода.

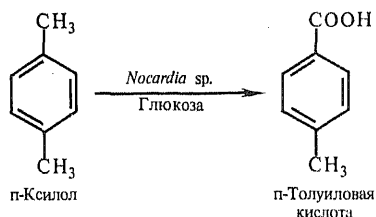
Рассмотренные примеры получения органических кислот показывают большое разнообразие методов, с помощью которых может быть осуществлен их микробиологический синтез. Вместе с тем эти примеры свидетельствуют в пользу необходимости дальнейшего изучения физиологических особенностей микроорганизмов-продуцентов, а также метаболических путей и регуляторных механизмов микробной клетки.

## Глава 27    **ТРАНСФОРМАЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

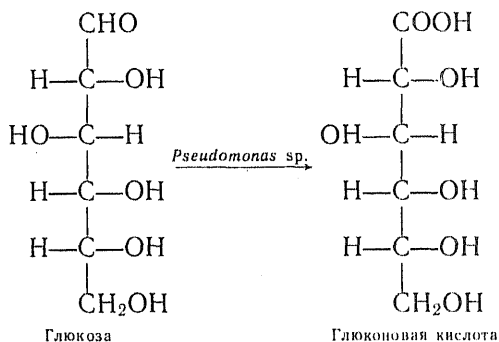
Микробная трансформация — неполное превращение органических соединений ферментами микроорганизмов, сопровождающееся накоплением в среде продуктов этого превращения.

Микробные трансформации осуществляются одним или несколькими ферментами и поэтому не приводят к значительным изменениям структуры субстрата. Микробная трансформация проявляется как в образовании соединений, которые далее не используются данным микроорганизмом, так и во временном накоплении промежуточных продуктов в процессе использования различных органических соединений в качестве ростовых субстратов.

Примером первого типа процессов может служить окисление *p*-ксилола в *p*-толуиловую кислоту, которая накапливается в среде и не метаболизируется некоторыми штаммами рода *Nocardia* при выращивании их в синтетической среде с глюкозой и *p*-ксилолом:



Примером второго типа процессов является временное накопление глюконовой кислоты отдельными штаммами рода *Pseudomonas* в процессе роста на среде с глюкозой\*



При этом глюконовая кислота после значительной аккумуляции в среде используется как источник углерода.

Микробная трансформация — естественное свойство микроорганизмов, широко распространенное в природе. Это свойство используется человеком в практической деятельности для получения ценных продуктов. Таким образом, микробы могут выполнять роль химических реагентов в органической химии. Поэтому микробную трансформацию, когда она используется в этих целях, называют ферментативной, микробной или микробиологической химией. Действительно, цели и подходы микробной трансформации близки целям и методам органической химии.

В микробной химии используются не только процессы трансформации, осуществляемые микроорганизмами в природе или в стандартных условиях культивирования. Развитие этого направления исследований и соответствующей отрасли промышленности связано со все более радикальным воздействием экспериментатора на обмен веществ микробной клетки с целью интенсифицировать и вычленил из ее метаболической системы действие отдельных ферментов или фрагментов метаболических последовательностей. Это дает возможность препаративно получать продукты неполного превращения органических соединений, используя микроорганизмы, у которых в обычных условиях способность осуществлять данную трансформацию не выражена. Существует обширный арсенал биохимических, генетических,

микробиологических и технологических методов такого воздействия на метаболизм микробной клетки (см. раздел «Методы микробиологической трансформации органических соединений»).

Учитывая имеющиеся экспериментальные подходы, можно отметить, что, теоретически, функции фермента или ферментной последовательности, функционирующей в клетке, могут быть использованы для проведения микробиологической трансформации с целью препаративного получения продуктов их действия.

Таким образом, огромные возможности органической химии дополняются не менее широкими возможностями микробиологической, или ферментативной, химии. Методы химии и микробиологии, конкурируя между собой, дополняют друг друга. В различных случаях предпочтение отдается тому или другому подходу на основе сравнительной оценки их рентабельности, особенностей технологии, влияния производственных процессов на человека и биосферу в целом. Преимущества ферментативных методов по сравнению с химическими заключаются в следующем:

1) специфичность действия ферментов позволяет осуществлять весьма тонкие перестройки молекул разных соединений с использованием простых технологических схем, в то время как аналогичные химические превращения обычно требуют трудоемких многостадийных синтезов:

2) «мягкие» условия действия ферментов, так как они функционируют обычно в водных, неагрессивных средах и при температуре не выше 100 °С;

3) небольшое количество вредных для биосферы отходов и побочных продуктов.

Последние две особенности характеризуют микробиологические методы как основу «мягкой технологии» в отличие от химических, которые по технологическим условиям и действию на биосферу являются «жесткими».

Недостатками микробиологических методов на современном уровне их развития по сравнению с химическими являются следующие. Ферменты функционируют в большинстве случаев в водной среде, превращая субстрат в растворенном виде в сравнительно невысоких концентрациях. В связи с этим, а также некоторыми другими трудностями, связанными с культивированием микроорганизмов (необходимость асептических условий, интенсивного массообмена и обработки больших количеств микробной массы или культуральной среды и др.), крупнотоннажное производство на основе методов микробиологической трансформации требует высоких энергетических затрат.

Поэтому на современном этапе методы микробной химии рентабельны прежде всего в тех случаях, когда необходимы тонкие перестройки достаточно сложных молекул, таких, как углеводы, стерины и стероиды, антибиотики, алкалоиды, простагландины, некоторые аминокислоты, нуклеотиды и др., если речь идет о производстве средних масштабов — не более чем сотен или тысяч тонн в год.

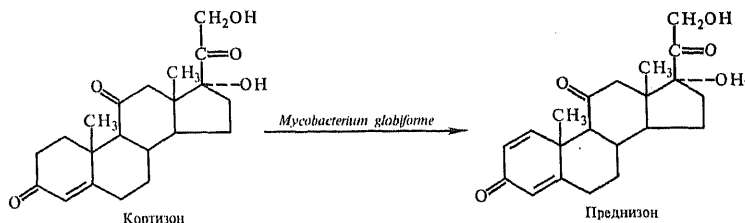
## 27.1. ПРОЦЕССЫ МИКРОБНОЙ ХИМИИ

Хотя любое превращение, осуществляемое ферментами микроорганизмов в процессах метаболизма, в принципе может быть использовано как трансформация, т. е. для препаративного получения его продуктов, в настоящее время реализована и практически используется лишь незначительная их часть. Но число процессов, позволяющих препаративно получить продукты ферментативных реакций и описанных в настоящее время, составляет несколько тысяч. Эти процессы очень разнообразны по природе исходных субстратов, использованным микроорганизмам, типу и количеству участвующих ферментов, характеру превращения органических соединений. Только часть из них осуществляется отдельными ферментами и может рассматриваться как ферментативные реакции. Значительная часть процессов микробной химии состоит из нескольких таких реакций, например приведенное выше окисление *p*-ксилола в *p*-толуиловую кислоту. Поэтому чаще говорят не о реакциях, а о процессах микробиологической трансформации. Классификации моноферментных процессов микробной трансформации, построенные на основе химических механизмов реакций или номенклатуры участвующих ферментов, сложны и насчитывают десятки различных типов. Более широко распространена классификация микробных трансформаций по типу химического превращения субстрат—продукт. Она отражает суммарное превращение исходного соединения, но не механизм процесса. Поэтому, например, все превращения альдоз в кетозы относят к типу «изомеризация», хотя у разных микроорганизмов в этом случае могут быть ответственны ферменты различных классов — соответствующая изомераза или две последовательно действующие оксидоредуктазы. Обычно выделяют класс процессов «дезаминирование», несмотря на то, что за них могут быть ответственны как окислительные, так и гидролитические ферменты. К типу «окисления» относят как моноферментные реакции, так и процессы, осуществляемые несколькими ферментами и т. д. В связи с этим классификация микробных трансформаций по типу превращения субстрат—продукт является искусственной и чисто прагматической, хотя и широко распространена. В настоящее время выделяют следующие типы процессов микробной трансформации: 1) окисление, 2) восстановление, 3) декарбоксилирование, 4) дезаминирование, 5) образование гликозидов, 6) гидролиз, 7) метилирование, 8) этерификация, 9) дегидратация, 10) диспропорционирование, 11) конденсация, 12) аминирование, 13) ацетилирование, 14) амидирование, 15) нуклеотизация, 16) галогенирование, 17) деметилирование, 18) асимметризация, 19) рацемизация, 20) изомеризация.

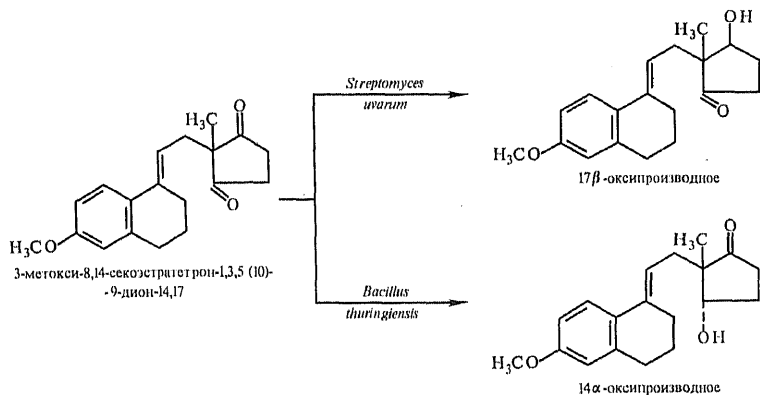
Наиболее изученный и широко используемый в промышленности процесс — *реакции окисления*. Они объединяют гидрокселирование неактивированного углерода, окисление непредельных связей, гидрокселирование ароматического кольца, дегидрирова-

ние, β-окисление жирных кислот, окисление спиртовой или альдегидной групп и т. д.

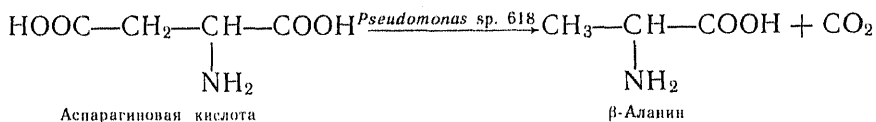
Характерным примером таких реакций является дегидрирование стероидов с целью получения противовоспалительных стероидных препаратов преднизона, преднизолона и их производных:



Микробное восстановление имеет преимущества перед многими химическими реакциями такого типа. Например, селективность действия микробных ферментов позволяет восстановить определенную кето-группу стероидов (химическим путем это невозможно). Подбирая различные штаммы микроорганизмов, можно восстановить избирательно ту или иную кетогруппу. В синтезе стероидов эта особенность микроорганизмов используется очень широко, например для восстановления 14α- или 17β-кетогрупп секостероидов ряда эстрана:

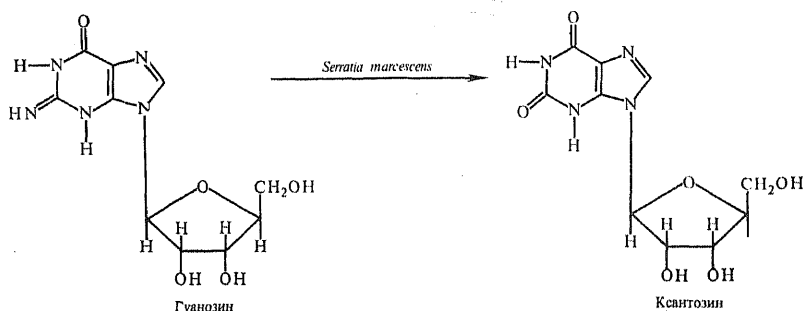


Известные примеры ферментативного декарбоксилирования в основном относятся к декарбоксилированию α-кетокислот и аминокислот:

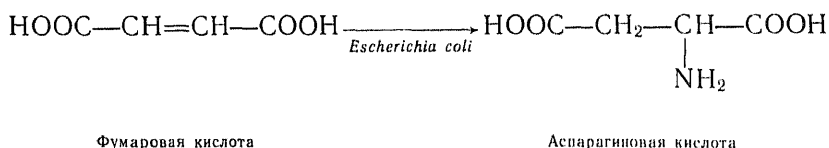


Микробный процесс по сравнению с химическим протекает в «мягких» условиях с хорошим выходом продукта.

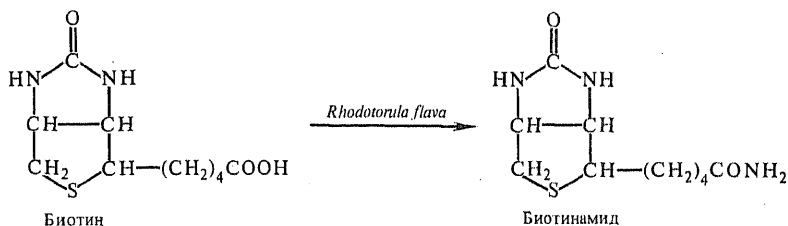
*Микробное дезаминирование* имеет большое значение для превращений аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований и нуклеотидов, например:



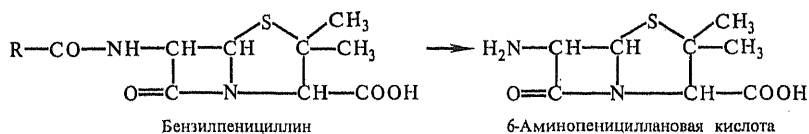
Аминирование описано для многих соединений, имеющих олефиновую двойную связь или кето-группу. Аминирование может также происходить путем замещения атома водорода или оксигруппы, например, у гетероциклических оснований. Большое значение имеет процесс аминирования фумаровой и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот:



*Реакции амидирования* редко встречаются в микробной химии. Один из таких примеров — образование биотинамида:

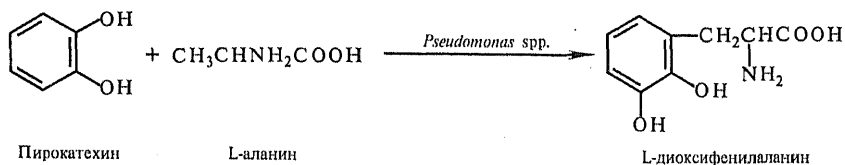


*Реакции гидролиза* чрезвычайно широко распространены в микробной химии. Они включают гидролиз эфиров, амидов и других соединений. Наиболее часто эти реакции используют в антибиотической промышленности и при производстве стероидов. Современное производство пенициллинов основано на синтезе различных производных 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК). Кислоту получают из бензилпенициллина ферментативным гидролизом:

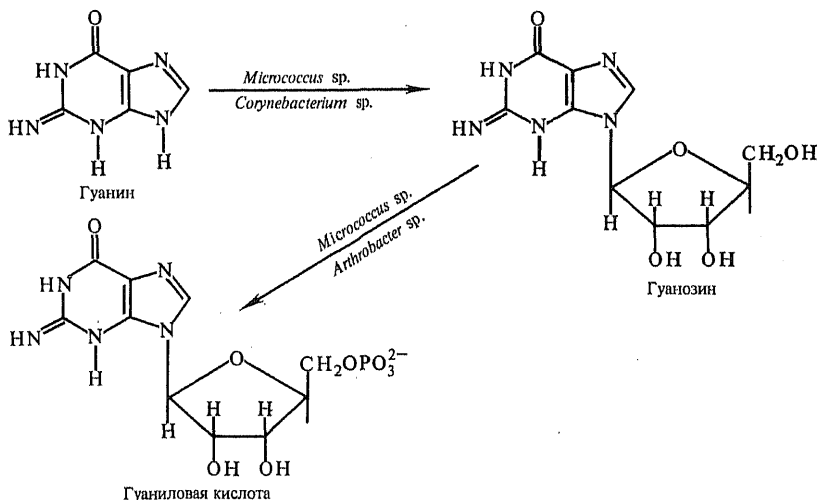


*Реакции конденсации* — синтез молекул органических веществ из двух или более фрагментов с помощью различных микробных ферментов. Реакции широко применяются при получении новых антибиотиков — производных пенициллина и цефалоспорина, которые синтезируют на базе 6-аминопенициллановой и 7-аминоцефалоспорановой кислот ферментативным и химическим способами.

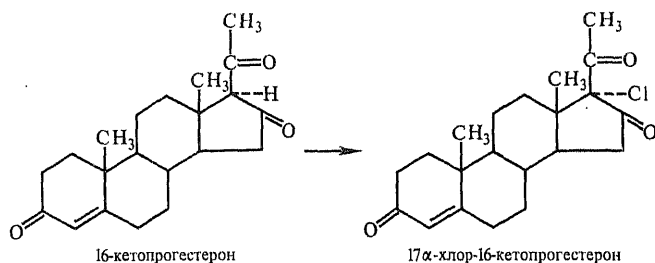
Большое значение имеет синтез аминокислот из предшественников. Конденсацией пирокатехина и его функциональных производных с аланином и серином удалось получить L-диоксифенилаланин — (ДОФА) — ценный лекарственный препарат, применяемый при болезни Паркинсона:



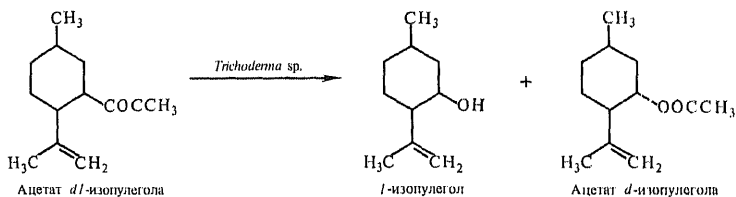
*Процессы нуклеотидации* — синтез различных нуклеотидов микроорганизмами из гетероциклических оснований или нуклеозидов. Они включают образование рибозидов и их фосфорилирование. В зависимости от условий различные микроорганизмы могут синтезировать нуклеозиды, их моно-, ди- и трифосфаты:



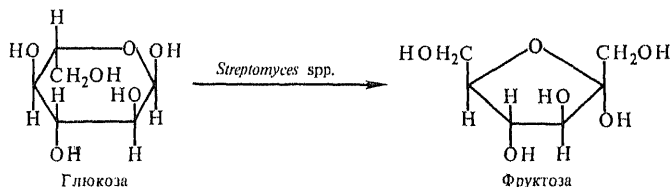
Реакция галогенирования редко встречается в микробном мире, но имеет особое значение. Она дает возможность получать галогенированные производные стероидов и других лекарственных препаратов. Наиболее изучен процесс галогенирования ферментом мицелия гриба *Caldariomyces fumago*, получившим название хлорпероксидазы. Фермент катализирует хлорирование кетокислот, циклических diketонов, бромирование триазолов, анизолов, стероидов и т. д.



Расщепление рацемических соединений на оптические антиподы широко используется в промышленности для получения стереоизомеров. Эти процессы основаны на стереоспецифичности ферментов, например ацилаз. Ацилазы используют для разделения смесей DL-аминокислот, которые вначале ацилируют, а ацильные производные подвергают гидролизу с помощью этих ферментов, получая L-аминокислоты. Аналогичным путем происходит разделение некоторых терпенов, например d,l-изопулегола:



Реакции изомеризации имеют большое практическое значение. На их использовании основан, например, такой важный промышленный процесс, как получение фруктозы из глюкозы:



**Методы микробной трансформации органических соединений.** Современная методология микробной химии существенно отличается от подходов, традиционных для начального этапа развития



этой науки. Наиболее распространенными ранее методами были трансформация растущей культурой или отмытыми клетками, находящимися в определенной фазе развития. Конец 50—60-х годов ознаменовался появлением ряда новых подходов — была обнаружена и стала использоваться ферментативная активность спор грибов и актиномицетов, выполнены основные работы по применению непрерывного культивирования для трансформации ряда органических соединений, разработаны основные принципы использования поврежденных в различной степени клеток (высушенные клетки, ацетоновые порошки и др.), прочно вошли в практику ферментные препараты. В настоящее время существуют несколько методов микробной трансформации органических соединений.

I. Использование ферментативных свойств интактных клеток:

1) трансформация растущей культурой в периодических условиях;

2) использование ферментативной активности микробных культур, находящихся в определенных фазах развития; а) трансформация суспензиями не размножающихся вегетативных клеток; б) трансформация спорами; в) непрерывные процессы; 3) кометаболизм.

II. Методы, основанные на дезорганизации обменных процессов клетки:

1) применение в различной степени поврежденных и дезинтегрированных клеток;

2) ингибирование определенных участков метаболических путей;

3) применение мутантов с заблокированным синтезом определенных ферментов;

III. Конструирование штаммов с повышенной способностью к трансформации органических соединений.

IV. Использование ферментных препаратов, иммобилизованных ферментов и клеток.

V. Политрансформации.

### 27.2. ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТУЩЕЙ КУЛЬТУРОЙ В ПЕРИОДИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Это наиболее простой метод, применяемый в тех случаях, когда микробная трансформация представляет собой процесс, продукты которого не используются данной культурой. Трансформируемый субстрат мо-

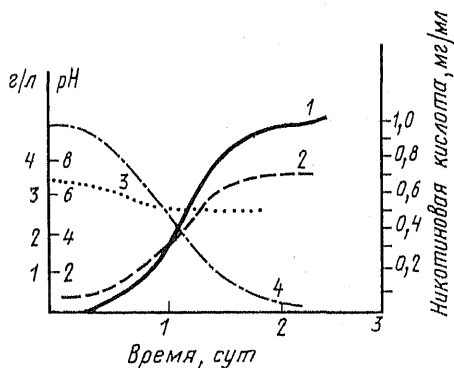
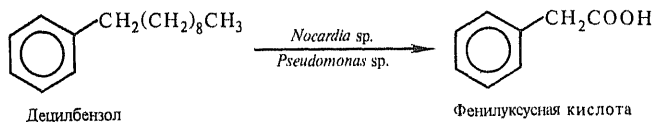


Рис. 27.1. Трансформация 3-метилпиридина *Nocardia globerula* B-293 при росте на среде с глюкозой (г/л):

1 — концентрация никотиновой кислоты; 2 — рост культуры; 3 — pH; 4 — концентрация глюкозы

жет вноситься в культуру, растущую, используя какой-либо другой источник углерода, как, например, при окислении 3-метилпиридина нокардиями, растущими за счет использования глюкозы (рис. 27.1). В других случаях рост может происходить при использовании части молекулы субстрата, который в данном случае является и ростовым, и трансформируемым, например:



Если ростовой субстрат является одновременно и трансформируемым, то максимумы скоростей ростового и трансформационного процессов совпадают. Поэтому воздействия, регулирующие рост, соответственно влияют на накопление продукта трансформации. Типичная динамика процесса трансформации (например, нафталина) представлена на рис. 27.2.

Если же ростовой и трансформируемый субстраты различны, то максимумы скоростей ростового и трансформационного процессов, как правило, сдвинуты во времени. Обычно наибольшая трансформирующая активность приходится на фазу замедления роста. Биомасса в это время нарастает линейно. На рис. 27.3 представлено дегидрирование гидрокортизона культурой *Mycobacterium globiforme* 193. Процесс трансформации может иметь место по окончании роста, т. е. когда максимальная удельная скорость трансформации соответствует стационарной фазе развития культуры. Так идет, например, окисление цис-пропенилфосфониевой кислоты в фосфомицин культурой *Penicillium spiculosum*.

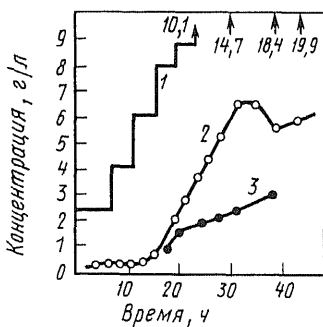


Рис. 27.2. Трансформация нафталина *Pseudomonas* sp.: 1 — добавленный нафталин, 2 — концентрация салициловой кислоты, 3 — клетки (сухая масса)

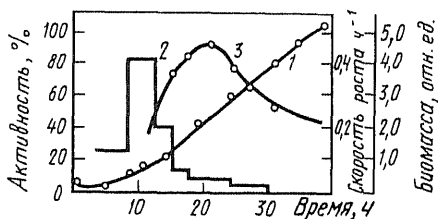


Рис. 27.3. Трансформация гидрокортизона в преднизолон культурой *Mycobacterium globiforme* 193: 1 — биомасса, 2 — удельная скорость роста, 3 — трансформационная активность (% превращенного субстрата)

### 27.3. ТРАНСФОРМАЦИЯ СУСПЕНЗИЯМИ НЕРАЗМНОЖАЮЩИХСЯ КЛЕТОК

Метод широко применяется в тех случаях, когда наибольшая активность трансформации приурочена к определенной фазе развития культуры микроорганизма или если трансформируемый субстрат может разлагаться культурой до конечных продуктов, а процесс метаболизма необходимо остановить на определенном этапе.

Метод сравнительно легко применим в тех случаях, когда трансформация осуществляется грибными культурами, мицелий которых возможно без особых затруднений отделить от среды выращивания в нужный момент и ресуспендировать в буферном растворе или водопроводной воде, где и осуществляется трансформационная реакция. Метод трансформации суспензиями неразмножающихся клеток позволяет использовать культуру определенного физиологического состояния. Так, 11-гидроксирование кортексолона с помощью *Tieghemella orchidis* 233 наиболее интенсивно осуществляется 19-часовым мицелием.

Трансформация ацетата кортизона в кортизон *Actinomyces corymbosus* наиболее активно осуществляется 24-часовой культурой мицелия в период перехода в стационарную фазу.

### 27.4. ТРАНСФОРМАЦИИ, ОСУЩЕСТВЛЯЕМЫЕ СПОРАМИ ГРИБОВ И АКТИНОМИЦЕТОВ

Трансформация органических веществ спорами имеет ряд свойств, представляющих интерес в связи с практическим использованием. Эти процессы обычно осуществляются в простых средах — дистиллированной или водопроводной воде, буферных растворах. Иногда для этого требуются добавки органических веществ в небольших концентрациях. Споры активны после длительного хранения (до трех лет в замороженном состоянии). Если процесс трансформации идет в бедной среде, то споры могут быть отмыты и использованы еще 4—5 раз. Оптимум pH обычно выражен менее четко, чем у вегетативных клеток. Это позволяет использовать условия, предотвращающие заражение посторонними микроорганизмами. Подобные наблюдения стимулировали попытки применения трансформации с использованием спор в промышленных масштабах. Такая возможность продемонстрирована на следующих процессах: 11 $\alpha$ -гидроксирование прогестерона и кортексолона спорами *Aspergillus ochraceus*; 1-дегидрогенизации кортексолона спорами *Septomyxa affinis*; 11 $\alpha$ -гидроксирования 6 $\alpha$ -, 16 $\alpha$ -, 17 $\alpha$ -диоксипрегн-4-ендиона — 3,20 в нестерильном 200-литровом ферменте. В последние годы осуществлен гидролиз феноксиметилпенициллина спорами *Fusarium* sp. Конидии *Aspergillus candidus* NRRL 305 синтезировали маннит из глюкозы с 75%-ным выходом. Появились работы по иммобилизации спор в полиакриламидный гель, что дает возмож-

ность применения непрерывно действующих колонок. Таким образом были осуществлены гидролиз сахарозы и многочисленные трансформации стероидов.

## 27.5. НЕПРЕРЫВНЫЕ МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Преимущество непрерывного культивирования по сравнению с периодическим при получении биомассы клеток стимулировали его применение для синтеза микробных метаболитов. Процессы получения продуктов, непосредственно связанные с ростом микроорганизмов, в условиях непрерывного культивирования осуществляются сравнительно легко. Образование микробных метаболитов, не связанное с ростом, потребовало больших усилий для реализации процессов непрерывным методом, и хотя многие из них осуществлены в лаборатории, внедрение этого метода в практику сопряжено с рядом затруднений. Одним из недостатков непрерывного метода, имеющим существенное значение, является то, что в периодической культуре легче получить максимальный выход продукта на единицу субстрата, в то время как в проточной культуре часть субстрата обычно не превращается. Однако более детальное и углубленное исследование непрерывной трансформации сорбита в сорбозу культурой *Acetobacter suboxydans*, прогестерона в 11 $\alpha$ -оксипрогестерон культурой *Aspergillus ochraceus*, прегнандиена в прегнатриен с помощью *Septomyxa affinis* и т. д. наглядно продемонстрировали рентабельность и преимущества этого метода.

Так, при непрерывной трансформации сорбита в сорбозу бактериальной культурой *Gluconobacter oxydans* (прежнее название *Acetobacter suboxydans*) максимальная удельная скорость роста в протоке, соответствующая максимальной съему продукта сорбозы, 0,42 ч<sup>-1</sup>, а в периодической культуре не более 0,35 ч<sup>-1</sup>. Хотя выход продукта в протоке при этой скорости несколько ниже, непрерывный метод более выгодный по сравнению с периодическим.

Непрерывные методы микробной трансформации получили интенсивное развитие благодаря разработке метода иммобилизации спор, клеток и ферментов.

## 27.6. КОМЕТАБОЛИЗМ

Кометаболизм — процессы трансформации или полного разложения органических соединений, осуществляемые микроорганизмами сопряженно с метаболизмом других субстратов — косубстратов. Так, упомянутое выше окисление нокардиями *n*-ксилола или 3-метилпиридина в соответствующие кислоты без косубстратов или в присутствии таких соединений, как глюкоза и ацетат, происходит медленно. В присутствии же ксилоты или глицерина активность трансформации резко возрастает. Важно отметить, что глюкоза и ацетат являются оптимальными росто-

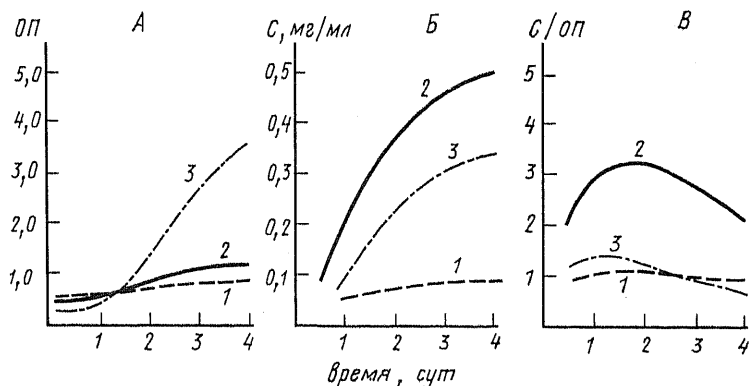


Рис. 27.4. Рост культуры *Nocardia globerulea* ИБФМ В-293 и трансформация 3-метилпиридина в никотиновую кислоту в присутствии различных косубстратов. А — рост культуры; Б — трансформация 3-метилпиридина; В — динамика удельной трансформирующей активности:

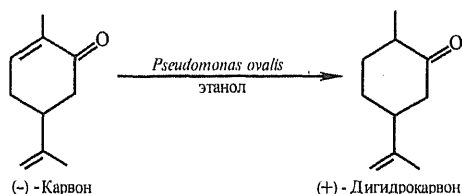
ОП — оптическая плотность суспензии клеток, С — концентрация никотиновой кислоты, 1 — клетки в минеральной среде без источника углерода, 2 — то же, +1 % глицерина, 3 — то же, +1 % глюкозы

выми субстратами для культур, осуществляющих описываемые процессы, в то время как ксилоза частично окисляется, но не используется ими в качестве источника углерода, а глицерин поддерживает лишь медленный рост. Таким образом, оптимальные ростовые субстраты — глюкоза и ацетат — не стимулируют трансформацию и, следовательно, не являются косубстратами. При использовании метода растущих культур накопление продуктов трансформации в вариантах с глюкозой и ацетатом происходит лишь в связи со значительным увеличением массы клеток, которые имеют низкую удельную активность — такую же, как и суспензии клеток без всяких дополнительных субстратов. В вариантах же с глицерином или ксилозой при медленном росте или в его отсутствие удельная активность трансформации значительно выше, что и стимулирует накопление продуктов. Такие процессы и называют кометаболизмом; он обнаруживается при сравнении удельных скоростей или производительности процессов трансформации (рис. 27.4).

Механизм сопряжения между трансформацией и метаболизмом косубстрата, приводящего к интенсификации первого процесса, изучены слабо. По всей вероятности такое сопряжение заключается в использовании в первом процессе каких-то метаболитов, образующихся во втором процессе и обеспечивающих первый энергией и (или) кофакторами. Поэтому кометаболизм играет важную роль в тех случаях, когда в метаболической системе микроорганизма отсутствует или недостаточно совершенна координация метаболических путей. Именно поэтому условия кометаболизма бывают необходимы микроорганизму для превра-

щения необычных для него субстратов (например, упомянутых выше п-ксилола и 3-метилпиридина).

Поскольку косубстрат играет в процессе кометаболизма специфическую и вполне определенную роль, правильный его выбор имеет важнейшее значение. В некоторых случаях, когда ферментативный механизм трансформации известен, выбор косубстрата не составляет труда. Так, для интенсификации процесса восстановления карвона в дигидрокарвон культурой *Pseudomonas ovalis* в качестве косубстрата был выбран этанол потому, что данный микроорганизм имеет активную алкогольдегидрогеназу; последняя обеспечивает трансформацию карвона восстановительными эквивалентами:



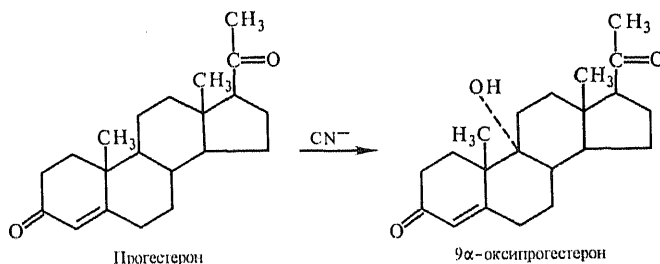
В случаях, когда механизм процесса неясен, косубстраты приходится подбирать путем проверки разных соединений. Окислительные процессы кометаболизма иногда называют соокислением (под таким названием они были описаны впервые американским микробиологом Фостером), восстановительные — совосстановлением.

### 27.7. ПРИМЕНЕНИЕ ПОВРЕЖДЕННЫХ И ДЕЗИНТЕГРИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Для получения метаболита, не накапливающегося в среде в обычных условиях в заметных количествах, часто требуются особые приемы радикального воздействия на клетки. Сущность этих приемов заключается в «дезорганизации» нормально функционирующих ферментных систем клетки с целью вычленения их отдельных участков. Одним из способов такой дезорганизации является повреждение в той или иной степени клеток микроорганизмов, от простого высушивания до глубокой дезинтеграции клеточных структур. Примером может служить превращение 5'-уридинмонофосфорной кислоты (УМ) в уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин (УДФАГ) под действием препарата сухих дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Процесс идет в фосфатном буферном растворе (рН 7,6 с глюкозамином, фруктозой и  $MgCl_2$ ). Через 10 ч инкубации выход УДФАГ составляет 66 % от исходного УМФ. Интактные дрожжи трансформирующей активностью не обладают. Когда высушивание не достигает цели, применяют другой способ дезорганизации клеточного метаболизма. Примером может служить превращение аденозинмонофосфата (АМФ) в аденозинтрифосфат (АТФ) ацетоновым порошком или механически растертыми клетками дрожжей.

## 27.8. ИНГИБИРОВАНИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ УЧАСТКОВ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ

Если положение фермента, ответственного за микробную трансформацию, в общей системе обмена веществ установлено, то во многих случаях есть возможность вычленивать реакцию, осуществляемую этим ферментом, специфически ингибируя следующий фермент. Так, деградация продуктов первичного окисления *n*-алканов ( $\beta$ -окисление жирных кислот) может быть остановлена с помощью специфического ингибитора — акриловой кислоты. В этих условиях углеводороды окисляются в алкановые кислоты и кетоны. Внесение в растущую культуру *Nocardia* sp. KCN ( $1 \cdot 10^{-3}$  М) ингибирует катаболизм прогестерона культурой до конечных продуктов. В качестве основного продукта получают  $9\alpha$ -оксипрогестерон:



## 27.9. ПРИМЕНЕНИЕ МУТАНТОВ С БЛОКИРОВАННЫМ СИНТЕЗОМ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Этот метод аналогичен предыдущему, только вместо ингибиторов в этом случае применяют генетические методы — получение мутантов с заблокированным синтезом определенных ферментов. Так, из штамма *Candida cloacae*, окисляющего додекан с образованием смеси дикарбоновых кислот, был получен мутант М-1, не способный ассимилировать дикарбоновые кислоты, но накапливающий при использовании гексадекана до 22 г/л тетрадекадикарбоновой кислоты. Затем был получен штамм MR-12, не способный расти на средах с *n*-алканами. Отмытые клетки этого штамма накапливают около 4,3 г/л тетрадекановой кислоты из гексадекана, а при росте на среде с ацетатом — до 61 г/л. В данном случае путем получения мутанта удалось вычленивать функцию начального этапа катаболизма *n*-алканов (не более трех ферментов) и использовать их активность для окисления этих углеводов в дикарбоновые кислоты.

## 27.10. КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ С ПОВЫШЕННОЙ СПОСОБНОСТЬЮ К ТРАНСФОРМАЦИИ

Изучение нехромосомных элементов наследственности, контролирующих катаболизм у микроорганизмов многих органических веществ («плазмиды биодегradации»), навело на мысль об

использовании их для создания «улучшенных» штаммов, трансформирующих органические соединения. Принципиальная возможность этого подхода показана на примере процесса окисления нафталина в салициловую кислоту.

Процесс получения салициловой кислоты из нафталина с помощью бактерий рода *Pseudomonas* описан выше. Недостатком исходных штаммов было то, что салициловая кислота после кратковременного накопления в среде потребляется культурой в качестве источника углерода, что снижает производительность процесса. Штамм *Ps. putida* 41, полученный методом конъюгации в результате переноса плазмиды NPL-1, контролирующей первичный этап окисления нафталина, от донорного штамма *Ps. putida* 12A к реципиенту *Ps. putida* 4, не обладающему способностью окислять нафталин до салициловой кислоты, накапливал салициловую кислоту без ее дальнейшего потребления и отличался от донорного штамма значительно более высокой производительностью. В присутствии анионообменной смолы Амберлит IR-45 в ферментационной среде выход продукта, равный 90 %, достигался за 10 ч ферментации.

#### 27.11. ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ И ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Применение очищенных препаратов — логически наиболее естественный способ практического использования активности отдельных ферментов микробных клеток для трансформации органических веществ. Однако технически этот подход реализуем лишь в том случае, если ферментные препараты могут быть получены сравнительно легко, если ферменты стабильны и не требуют кофакторов и т. д.

Особенно широкие перспективы в использовании ферментов для синтеза различных соединений открываются в связи с разработкой методов их иммобилизации. Основные достоинства иммобилизованных ферментов — возможность неоднократного использования, отсутствие необходимости очистки продукта от катализатора, стабильность при хранении и в процессе использования, возможность вести реакцию в более широком диапазоне физико-химических условий, в непрерывных условиях и т. д. Реализация большого числа процессов трансформации углеводов, стероидов, антибиотиков, аминокислот с помощью иммобилизованных ферментов убедила в экономической перспективности этого метода. Кроме названных выше процессов, имеющих промышленное применение, представляет интерес получение L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония с помощью иммобилизованной в полиакриламидный гель аспартазы *Escherichia coli*. Фермент работает непрерывно длительное время (до 8 дней), не снижая активности, и количественно превращает субстрат при концентрации фумарата 0,2 М и скорости потока 0,16 ч<sup>-1</sup>. Сравнение

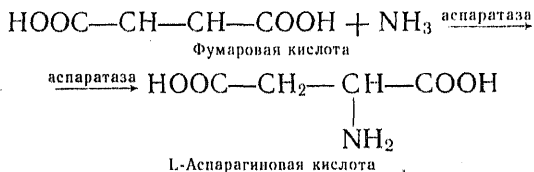


с процессами, в которых участвовала растворимая форма фермента или интактные клетки *E. coli*, показало экономическую целесообразность использования иммобилизованной аспартазы.

## 27.12. ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК

Наряду с успешной иммобилизацией многих ферментов и применением этого метода в промышленности исследователи столкнулись с рядом трудностей, характерных для работы с ферментами, зависимыми от кофакторов, а также в тех случаях, когда трансформации осуществляются несколькими ферментами. Были предприняты попытки использовать активность «сложных» ферментов и ферментных комплексов путем иммобилизации клеток. Иммобилизация клеток позволяет эксплуатировать отдельные ферменты, а также их системы, что затруднительно при работе с иммобилизованными ферментами. Обмен иммобилизованных клеток отличается от метаболизма интактных микроорганизмов, что может быть использовано в целях регуляции трансформации. Эффективность процессов, осуществляемых иммобилизованными клетками, в ряде случаев выше их эффективности как у свободных микроорганизмов, так и у иммобилизованных ферментов. Для иммобилизации клеток используются почти все методы, применяемые для иммобилизации ферментов, но наиболее распространенным в настоящее время является включение в полиакриламидный (ПААГ) и каррагенановый гели (см. гл. 10).

Получение аминокислот и органических кислот с использованием клеток, иммобилизованных в полиакриламидный и каррагенановый гели — один из примеров, демонстрирующих возможности и перспективы метода. Клетки *E. coli*, иммобилизованные в ПААГ, осуществляли превращение фумаровой кислоты в аспарагиновую:



Активность иммобилизованных клеток сохраняется при 37 °С в присутствии ионов  $\text{Mg}^{++}$  в течение 40 сут при скорости потока 0,5 мл/ч через колонку размером 10×100 см, причем выход аспартата достигает 95 %. Процесс успешно применен в промышленном масштабе. Ежесуточный выход кислоты при использовании промышленной колонки 1900 кг или 57,6 т/мес, время полужизни и активность клеток свыше 120 сут. Позже был разработан более экономичный способ иммобилизации клеток в каррагенан. Продуктивность иммобилизованных в каррагенан клеток в 15 раз превышала таковую для иммобилизованных в ПААГ, время полужизни их также увеличилось до 2 лет. Преимущества метода были так велики перед существовавшим ранее, что фирма

Танабе в 1979 г. заменила им промышленное получение L-аспарагиновой кислоты. Такой же процесс осуществлен в Советском Союзе.

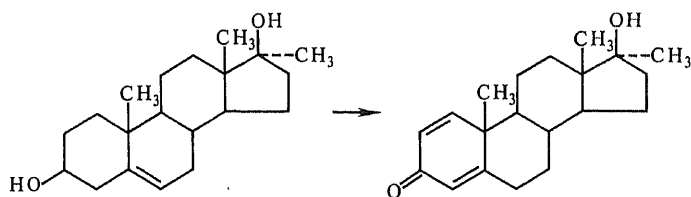
Получение L-яблочной кислоты из фумаровой с помощью иммобилизованных в каррагенан клеток *Brevibacterium jlavum* — второй пример промышленного использования ферментативной активности микроорганизмов для биоконверсии органических соединений.

Пристального внимания заслуживает и метод иммобилизации смешанных культур. Так, осуществлена трансформация сорбозы в 2-кето-L-гулоновую кислоту смесью иммобилизованных в ПААГ клеток *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293 и *Pseudomonas syringae* NRRL B-865. Первая бактерия окисляла сорбозу в сорбозон, а вторая, обладая активной сорбозоноксидазой, образовывала 2-кето-L-гулоновую кислоту.

### 27.13. ПОЛИТРАНСФОРМАЦИИ

Трансформация сложных органических молекул часто предполагает более чем одну ферментативную реакцию. В ряде случаев для получения практически ценных продуктов требуются весьма существенные перестройки молекулы субстрата, которые могут включать различные процессы, например окисление и гидролиз или окисление, восстановление и гидролиз и т. д. Эти задачи могут быть решены разными путями.

1. *Подбор штамма, способного осуществлять нужную трансформацию полностью.* Так, *Mycobacterium micosum* 77 в присутствии ингибитора расщепления кольцевой структуры осуществляет трансформацию 17 $\alpha$ -метил  $\Delta^5$ -андростендиол-3 $\beta$ , 17 $\beta$  в дианабол:



Процесс, таким образом, заключается в окислении гидроксила, изомеризации  $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$  и 1-дегидрогенизации.

В Советском Союзе разработан опытно-промышленный регламент получения преднизолона из гидрокортизона иммобилизованными в полиакриламидный гель клетками *Arthrobacter globiformis*.

2. *Использование нескольких последовательных микробных трансформаций.* Показательным примером такого рода процессов может служить трансформация боратного комплекса 16- $\alpha$ -оксикортексолона. Первая стадия — 11- $\alpha$ -гидроксилирование — наиболее эффективно осуществляется мицелием *Aspergill-*

*lus ochraceus* в неростовых условиях. Через 24 ч вносится ацетоновый порошок клеток *Arthrobacter simplex* и за несколько часов происходит 1-дегидрогенизация. Выход почти количественный.

3. *Использование смешанных культур.* В большинстве случаев метод применяется для трансформации стероидов, например для 1-дегидрогенизации и дезацетилирования. Эти процессы дают возможность получить преднизон из ацетата кортизона в одну стадию. Смешанные культуры в некоторых случаях более эффективны, чем последовательно использованные монокультуры. Сравнение ферментативных активностей *Arthrobacter globiformis* и *Mycobacterium album* в монокультуре и в смеси показало, что дезацетилирующая активность *M. album* в присутствии *A. globiformis* повышается.

Получение преднизона из ацетата кортизона успешно осуществлено в пилотном масштабе с использованием смеси культур *A. globiformis* и *M. album*. Нарботано свыше 500 кг препарата.

#### **27.14. МИКРООРГАНИЗМЫ, ТРАНСФОРМИРУЮЩИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ**

Современная методология микробной трансформации позволяет использовать для осуществления того или иного химического превращения в принципе любой микроорганизм, имеющий соответствующие ферменты. Требования, предъявляемые к микробному штамму, пригодному для использования в исследовательской и производственной практике, сводятся к следующему:

- 1) микроорганизм должен развиваться на сравнительно простых средах;
- 2) активность фермента и ферментной системы, ответственных за трансформацию, должна быть достаточно высокой;
- 3) накопление продукта трансформации в среде должно быть достигнуто наиболее простыми методами;
- 4) перечисленные выше условия должны обеспечивать экономическую рентабельность процесса.

В соответствии с этими требованиями для микробной трансформации органических соединений используются обычно сапрофитные микроорганизмы, способные расти на обычных микробиологических средах и отличающиеся интенсивным обменом веществ. Набор микробов, применяемых в настоящее время в лабораторной и производственной практике для препаративного получения органических веществ методом микробной трансформации, очень широк. Он включает представителей грибов (аскомицеты, фикомицеты, базидиомицеты, несовершенные грибы), актиномицетов и родственных им организмов, многих других бактерий и даже микрорформы водорослей.

Если перед экспериментатором стоит задача — разработать микробный способ превращения какого-либо соединения в другое, практически ценное вещество, он может приступить к ее решению

двумя путями. Можно попытаться выделить из природных источников или найти в коллекциях микроорганизм, у которого способность осуществлять искомое превращение выражена в той или иной степени в обычных условиях микробного эксперимента, например при росте культуры в подходящей среде, или суспензией неразмножающихся клеток в буферном растворе и т. п., а затем искать путь его интенсификации. Многие процессы превращения стероидов и углеводов, реализуемые в настоящее время в промышленности, разработаны именно этим методом.

Можно, однако, идти другим путем — подобрать микроорганизм, у которого фермент или ферментная система, ответственные за интересующие экспериментатора превращения, высоко активны, хотя искомые продукты и не накапливаются в среде. Такие штаммы можно отбирать по интенсивности роста на определенных субстратах или путем изменения активности соответствующих ферментов. Затем необходимо блокировать метаболизм микроорганизма таким образом, чтобы продукты действия этих ферментов далее не метаболизировались и накапливались в среде. Так разработан способ получения алифатических спиртов из *n*-алканов. Отобран штамм дрожжей рода *Candida*, хорошо растущий на средах с *n*-алканами в качестве источников углерода и энергии. Окисление *n*-алкана происходит через соответствующие первичный спирт, альдегид, кислоту и т. д. Удалось получить мутант, у которого метаболизм *n*-алканов блокирован на стадии спирт — альдегид. При росте на среде с ацетатом этот мутант активно окислял *n*-алканы и накапливал большие количества первичных алкановых спиртов.

Первый метод сохраняет свое значение и сейчас. Связанные с ним трудности заключаются в том, что отбор активных штаммов в большинстве случаев невозможно вести по интенсивности роста микроорганизмов на трансформируемом субстрате в качестве единственного источника углерода, поэтому приходится поочередно проверять активность трансформации у многих штаммов, что требует значительных усилий и времени. Большое значение при этом имеет значение корреляций между типом микробной трансформации и таксономическим положением микроорганизмов.

Другой подход к разработке процессов трансформации заключается в использовании микроорганизмов с высокой активностью ферментов, ответственных за интересующее экспериментатора превращение, но не накапливающих продуктов этого превращения при культивировании или инкубировании в обычных средах. В этом случае необходимы специальные меры, приводящие к накоплению целевого продукта, — от наиболее простых приемов, например высушивания клеток, — до таких сложных операций, как выделение и иммобилизация фермента (см. выше).

Этот подход позволяет получать метаболиты промежуточного обмена, нуклеинового метаболизма, многие аминокислоты, углеводы и т. д. При этом могут применяться самые распространенные в лабораторной практике микроорганизмы. Например, универсаль-

ный объект микробиологов, биохимиков и генетиков *Escherichia coli* используется для получения многих веществ методом микробной трансформации, которые не накапливаются в обычных условиях ее культивирования. Тем не менее иммобилизованные в полиакриламидный гель клетки *E. coli* интенсивно превращают фумаровую кислоту в яблочную или, в соответствующих условиях, в аспарагиновую. Выделенную из *E. coli* ацилазу можно использовать для гидролиза пенициллинов с целью получения 6-аминопенициллановой кислоты. С помощью соответствующих мутантов *E. coli* или ингибиторов отдельных ферментов можно получать некоторые интермедиаты промежуточного метаболизма. Достоинством этого подхода является то, что в некоторых случаях активные штаммы можно отбирать по интенсивности роста на субстрате, который предполагается трансформировать, или на среде с метаболически родственными этому субстрату веществам.

В микробиологической практике применяются в сочетании оба подхода — использование естественной способности микроорганизмов накапливать продукты трансформации некоторых органических соединений и разнообразные способы воздействия на метаболизм микробных клеток с целью вызвать накопление целевого продукта или интенсифицировать определенный процесс. Это делает сферу возможного использования ферментативной активности микроорганизмов для превращения различных органических соединений практически беспредельной.

Попытки многих исследователей установить видовую и родовую специфичность микроорганизмов, осуществляющих различные трансформации, не всегда приводили к успеху. Можно сказать с определенностью, что, например, для гидроксирования алкильных заместителей ароматических соединений следует искать активные штаммы в группе *rhodochrous* рода *Nocardia*, для окислений оксигрупп полиолов — среди уксуснокислых бактерий, для изомеризации альдоз — среди стрептомицетов бурой группы, артробактеров, лактобацилл, бацилл и др. Однако в большинстве случаев приходится ориентироваться на более крупные таксоны и более широкий поиск, что усложняет задачу.

Таким образом, потенциальная способность осуществлять различные трансформационные процессы распространена весьма широко среди микроорганизмов, и далеко не всегда можно заранее указать узкую таксономическую группу, в которой следует искать штаммы, осуществляющие определенное превращение.

Существуют, однако, некоторые таксоны — роды и даже виды, способные проводить разнообразные превращения органических веществ с накоплением продуктов трансформации. Среди них заслуживают особого внимания *G. oxydans*, осуществляющий десятки различных окислительных превращений углеводов и родственных соединений, *Aspergillus niger*, который наряду с окислением углеводов используется также для их восстановления, гидролиза гликозидных связей и трансгликозидирования, *Brevibacterium ammoniagenes*, который синтезирует рибозиды и нуклеотиды из

предшественников и аминует органические кислоты. Очень часто упоминаются в литературе проводящие различные трансформации представители родов *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*.

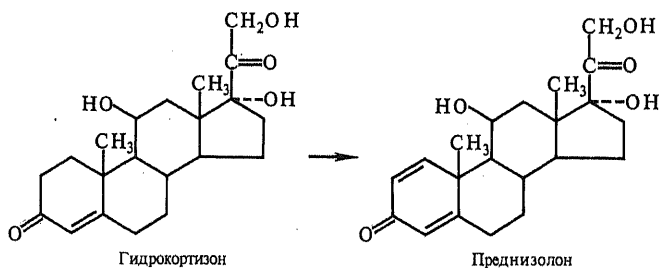
Некоторое представление о возможной приуроченности разных трансформаций к таксономическому положению микроорганизмов могут дать данные, приводимые ниже.

#### Микроорганизмы, осуществляющие некоторые трансформации

Тип процесса	Организмы
Гидроксилирование стероидов	Грибы
Восстановление стероидов	Род <i>Mycobacterium</i>
Восстановление различных соединений	Факультативные анаэробные бактерии, дрожжи
Изомеризация альдоз	Стрептомицеты, артробактеры, бактерии, лактобациллы
Окисление различных углеводов	Псевдомонады
Окисление полиолов	Уксуснокислые бактерии
Окисление n-алканов	Нокардии, псевдомонады, дрожжи рода <i>Candida</i>
Гидроксилирование алкильных заместителей циклических соединений	Нокардии группы «rhodochrous»
Гидроксилирование кольца ароматических соединений	Артробактеры
Окисление аминогруппы	Стрептомицеты
Дезаминирование	Дрожжи
Образование рибозидов и нуклеотидов из предшественников	Бревибактерии
Трансформации, связанные с расщеплением ароматического кольца	Псевдомонады

#### 27.15. ПРИМЕРЫ ТРАНСФОРМАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

В качестве типичного примера микробиологической трансформации рассмотрим превращение гидрокортизона в преднизолон культурой *Mycobacterium globiforme* (микроорганизм применяется в промышленности для получения стероидных гормонов):



Для бактерии характерны окислительно-восстановительные превращения стероидной молекулы: 1,2-дегидрирование, сопровождаемое 1,2-гидрированием и 20 $\beta$ -восстановлением.

Культуру поддерживают и хранят на косяках мясо-пептонного агара или кукурузно-глюкозного агара: кукурузный экстракт 1,0 г, глюкоза 1 г, агар-агар 3,0 г, водопроводная вода 1 л, рН среды 6,8—7,2. Выращивают культуру 4—5 сут, затем водной суспензией клеток засевают колбы с жидкой средой того же состава, разлитой по 50 мл в медицинские качалочные колбы. Одновременно с бактериальной суспензией вносят в качестве индуктора ацетат кортизона (10 мг в 1 мл метанола на 50 мл среды). Через 24 ч (при сухой биомассе 1,6—2,5 мг/мл) в культуральную жидкость вносят водную суспензию тонкоизмельченного гидрокортизона до величины частиц менее 5 мкм. Трансформацию проводят при 28—30 °С на качалке с 200—220 об/мин в течение 18—24 ч. Культуральную жидкость (300 мл) экстрагируют три раза этилацетатом (по 1 л), объединенный экстракт упаривают до 300 мл, добавляют 0,3 г активированного угля, кипятят 5—10 мин, уголь отфильтровывают, промывают горячим этилацетатом и растворитель отгоняют до 45 мл. Раствор охлаждают 16 ч при 0 °С для полного выделения преднизолон. Осадок отфильтровывают, промывают охлажденным этилацетатом, высушивают при 60—70 °С. Выход преднизолон 85 % от теоретического, в качестве примесей образуется 20β-оксипроизводное преднизолон (0,5 %) и исходный гидрокортизон — 6—8 %.

Разработка методов иммобилизации клеток этой бактерии в полиакриламидный гель (ПААГ), в мембраны из поливинилового спирта и адсорбция ее на целлюлозе позволила повысить эффективность метода трансформации стероидов. Для иммобилизации в ПААГ культуру выращивали описанным выше способом, отделяли центрифугированием, отмывали фосфатным буфером. Система для полимеризации состояла из 10 %-ного полиакриламидного геля с 0,5 %-ным относительным содержанием сшивающего агента метиленбисакриламида и катализаторов: тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД) и персульфата аммония. Акриламид перекристаллизовывали перед употреблением из хлороформа. В сосуд для полимеризации помещали 6 мл клеточной суспензии, содержащей 0,1—0,6 г биомассы, смесь 1,90 г акриламида с 0,10 г метиленбисакриламида в 11 мл воды, 3 капли ТЕМЕДа и 15 мг персульфата в 3 мл воды. Общий объем 20 мл. Полимеризацию мономера проводили при температуре 10—12 °С в атмосфере азота в течение 2—15 мин. Полученный блок геля механически фрагментировали, продавливая через сито 20—30 меш, промывали физиологическим раствором до исчезновения невключившихся клеток (4—5 л). Полученные гранулы помещали в термостабируемую колонку (1×28 см). Реакционная смесь, пропускаемая через колонку, содержала 0,1 г/л гидрокортизона в фосфатном буфере (рН 7,0), скорость потока через колонку 1,3 мл/ч на 1 мл геля (SV), акцептор водорода — феназинметасульфат — добавляли в концентрации 0,1 г/л с момента трансформации, температура 20—22 °С. Выделение стероидов и определение активности проводили по методике, описанной выше. При таких условиях

наблюдалось количественное превращение субстрата в течение 9—10 сут, через 15 сут активность снижалась на 50 %, через 20 сут обнаруживалось лишь 5—7 % превращенного субстрата.

При резком повышении количества исходной биомассы в грунтах та же бактерия в периодических и непрерывных условиях трансформации в основном осуществляет  $20\beta$ -восстановление, давая  $20\beta$ -восстановленный гидрокортизон. Активность  $20\beta$ -восстановления весьма зависит от условий индукции, выращивания инокулята и скорости потока в процессе трансформации. При индукции ацетатом кортизона и прогестероном наблюдается 100 %-ная активность в течение 6—9 сут. При снижении  $20\beta$ -оксистероиддегидрогеназной активности добавление НАДН (0,1 г/л) вновь приводит к повышению и стабилизации активности. 100 %-ный выход  $20\beta$ -оксипроизводного гидрокортизона сохраняется в течение 2 недель, если скорость потока поддерживать на уровне 0,14. На рис. 27.3 приведена динамика  $20\beta$ -оксистероидгидрогеназной активности иммобилизованных клеток *Myc. globiforme* во времени.

Динамика  $20\beta$ -восстановления гидрокортизона изучалась в следующих условиях: биомасса 0,6 г на 20 мл геля, pH 7,0, температура 20—22 °С, SV-0,65. Экзогенный кофактор — восстановленный НАДН добавляли в момент падения активности.

Стабильное образование  $20\beta$ -восстановленного гидрокортизона происходило в течение 10 сут. При этом 100 %-ная активность сохранялась в течение 3 сут за счет эндогенного кофактора, затем активность начинала падать. Подключение экзогенного кофактора восстановленного НАДН в момент падения ее активности позволило повысить ее до первоначального уровня и стабилизировать процесс еще в течение 7 сут. В дальнейшем наблюдалось необратимое падение активности  $20\beta$ -оксидоредуктазы.

В Советском Союзе уже не одно десятилетие осуществляется производство стероидных гормонов методом микробиологической трансформации. Это прежде всего получение преднизолона из гидрокортизона с помощью *Arthrobacter globiformis*; превращение ацетата кортизона в преднизон ацетат, осуществляемое той же бактерией; получение преднизона из ацетата кортизона с помощью смеси культур *A. globiformis* и *M. album*; производство из кортексолона гидрокортизона — процесс, осуществляемый культурой *Curvularia lunata*, получение вещества S из вещества R смесью *Curvularia lunata* и *C. mediolanum*.

На восьми заводах объединения «Витамин» осуществляется в настоящее время превращение сорбита в сорбозу с помощью культуры *Gluconobacter suboxydans*.



**Глава 28 ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКА**

Структура питания человечества в целом, в том числе населения нашей страны, далеко не идеальна, причем наиболее дефицитным компонентом пищи является белок, особенно белок высокой питательной ценности.

Крупнотоннажное микробиологическое производство белка следует постоянно развивать, поскольку именно этот путь позволяет расширить и качественно улучшить пищевую базу, получить наиболее высококачественные белковые продукты с наименьшими затратами труда, с минимальным ущербом для среды, окружающей человека.

Как промышленный процесс, микробиологическое производство белка не требует посевных площадей, не зависит от климатических и погодных условий, поддается точному планированию и высокому уровню автоматизации, позволяет получать продукцию стандартного качества. Продукты микробиологического синтеза можно назвать новыми видами кормов и пищи, но неверно считать синтетическими или искусственными. Разнообразие микроорганизмов и типов их питания позволяют микробиологической промышленности легко маневрировать в использовании различных видов сырья для биосинтеза. Получение белковых веществ — крупнейшее по тоннажу и важнейшее по народнохозяйственному значению производство микробиологической промышленности нашей страны.

**28.1. ИСТОРИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ  
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА**

Более века тому назад, экспериментируя с дрожжами, Л. Пастер открыл микробиологический синтез белка из аммиака и органических соединений, не содержащих азота. Однако состояние сопредельных областей знания того времени не могло позволить Пастеру рекомендовать микробиологический синтез белка

для практических целей. Ни Пастер, ни другие его современники не знали, что организм животного должен получать белок или аминокислоты в готовом виде.

Заводы по выращиванию дрожжей, созданные вскоре после исследования Пастера, выпускали дрожжевые закваски. Совершенствовалась технология производства дрожжей. Джен предложил использовать пресс-фильтр для отделения клеток от водной среды, а Гансен для получения чистых культур дрожжей применил предложенный Кохом прием выращивания колонии из одной клетки. Маркуард ввел прием аэрирования затора при выращивании дрожжей, Райнер запатентовал первый непрерывный способ их производства. С 1876 г. в США начали применять в хлебопечении прессованные дрожжи.

Идею использования микроорганизмов как белковых компонентов в питании в 1890-х годах начал пропагандировать Дельбрюк, рекомендовавший применять для этой цели пивные дрожжи.

Первое производство пищевых дрожжей на мелассе возникло в Германии в первую мировую войну. В 1915 г. мощность германских установок по производству дрожжей была доведена до 10 тыс. т, но в 1916 г. выпуск дрожжей прекратили из-за недостатка мелассы.

После первой мировой войны в различных странах приступили к производству кормовых дрожжей. К середине 30-х годов началось производство дрожжей из гидролизатов отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности, из сульфитных щелоков, барды гидролизно-спиртовых заводов. В 1935 г. в СССР был пущен первый опытный завод по производству кормовых дрожжей на основе использования соломы, кукурузных кочерыжек и древесных опилок, предварительно гидролизованных с серной кислотой. В это время горячим поборником использования дрожжей в питании выступал Гивартовский, рассматривавший дрожжи как ценный источник витаминов группы «В». Были разработаны рецептуры добавления выращенных на мелассе дрожжей в различные продукты.

Во время второй мировой войны в Германии на сульфитных щелоках и гидролизатах древесины выращивали дрожжи пищевого назначения. В 1944 г. мощность производства пищевых дрожжей в Германии составила 15 тыс. т. Колониальное управление Великобритании построило на Ямайке завод пищевых дрожжей, выпускавший в сутки 12 т высушенной биомассы *Torula utilis*. В СССР во время второй мировой войны также получали дрожжи для питания людей.

С начала промышленного выращивания дрожжей предпринимались многочисленные попытки осуществить их полунепрерывное или непрерывное производство (в 30-х годах производство кормовых дрожжей уже осуществлялось по непрерывному методу). В 1950-х годах была существенно развита теория непрерывного культивирования микроорганизмов. Метод непрерывного

культивирования революционизировал исследования по физиологии микроорганизмов.

В ряде стран возникали производства кормовых дрожжей на различных отходах, в первую очередь на сульфитных щелоках, а также на гидролизатах растительного сырья. Особенно быстро развивалось получение кормовых дрожжей на гидролизатах целлюлозосодержащих отходов сельского хозяйства и обработки древесины. Получение кормовых дрожжей на этих видах сырья играет важную роль и в настоящее время. Однако такое производство имеет и недостатки — высокие удельные капитальные вложения, отсутствие методов непрерывного гидролиза. Кроме того, современное производство целесообразно осуществлять на крупных заводах, но организация сбора целлюлозосодержащего сырья и его транспортировка на такие заводы — мероприятие весьма дорогостоящее.

В 60-е годы внимание исследователей привлекала возможность использования углеводов нефти как сырья для получения кормовых дрожжей. В мире добываются громадные количества нефти, которая в основном используется как топливо. Между тем еще начиная с 20-х годов советский ученый В. О. Таусон показал возможность выращивания различных микроорганизмов на компонентах нефти. В 60-х годах французский ученый Шампанья рекламировал получение богатых белком дрожжей на углеводородах нефти; рекомендовал выращивать дрожжи на средах с дизельным топливом. При этом дрожжи потребляли фракцию n-алканов, что позволяло получать низкозастывающее дизельное топливо и биомассу. Однако потребность в таком топливе сравнительно невелика, а очистка биомассы, полученной на дизельном топливе, оказалась весьма сложной и дорогостоящей. Тем не менее в ограниченном масштабе промышленное производство кормовых дрожжей на средах с дизельным топливом было организовано в ГДР.

В середине 60-х годов в СССР были развернуты работы в принципиально противоположном технологическом направлении — дрожжи выращивали не на отходах того или иного производства, не на «грязном» сырье (дизельном топливе), а на очищенных жидких n-алканах. Вопрос о том, что подвергать очистке — сырье или продукт, был решен в пользу сырья. С начала 70-х годов в Советском Союзе развернулось строительство заводов по производству кормовых дрожжей на основе использования очищенных n-алканов нефти. Этому крупному мероприятию предшествовала большая работа ученых различных специальностей.

Напряженная работа научных и практических работников позволила организовать в СССР впервые в мире крупнотоннажное производство кормовых дрожжей на выделенных из нефти n-алканах.

Позднее аналогичное производство было налажено в Румынии по японской технологии. В настоящее время производство

кормовых дрожжей является важнейшей для народного хозяйства и наиболее крупной отраслью микробиологической промышленности в СССР.

## 28.2. ПИТАТЕЛЬНАЯ ЦЕННОСТЬ БЕЛКОВ

Нехватка белка в питании отрицательно сказывается на здоровье взрослого человека, понижает физическую и умственную работоспособность, а у детей замедляется физическое, а иногда и умственное развитие.

При выращивании животных и птиц недостаток белка приводит к перерасходу корма, ухудшению здоровья животных. Недостаток высококачественных белков в питании населения многих стран, в том числе СССР, весьма значителен.

Главной характеристикой биологической (питательной) ценности белка является сбалансированность его аминокислотного состава.

Для характеристики сбалансированности аминокислотного состава белков Всемирная организация здравоохранения рекомендует принять в качестве эталонного аминокислотный состав белков куриных яиц или женского молока (ВОЗ, 1966). Их аминокислотный состав очень близок и является наиболее благоприятным для человека.

Для оценки белков используется показатель отношения незаменимой аминокислоты к общему количеству незаменимых аминокислот в белке. Отношение выражается в процентах от соответствующего отношения для данной аминокислоты в эталонном белке и является показателем сора аминокислоты. Самая малая величина из полученных показателей сора характеризует питательную ценность белков продукта. Аминокислота, имеющая наименьший показатель сора, называется первой лимитирующей аминокислотой данного продукта. Аминокислота, сора которой наиболее близок к сору первой лимитирующей аминокислоты, называется второй лимитирующей аминокислотой. Питательная ценность многих белков животного происхождения приближается к эталону, а питательная ценность растительных белков оказывается ниже. Так, белок пшеницы имеет сора всего около 50 %. Белки злаков вообще характеризуются низким содержанием лизина.

В качестве добавок в корм или в пищу, составляемых в основном из злаковых, целесообразно использовать такие продукты, белок которых неполноценен сам по себе. Нужно, чтобы неполноценность добавляемого белка была противоположной, «комплементарной» к неполноценности белка злаковых, чтобы после внесения добавки полученная смесь по аминокислотному составу белков приблизилась бы к показателям эталонного белка. В качестве такого рода добавок успешно используются соя или кормовые дрожжи.

Проведенные исследования не обнаружили достоверной связи

между таксономическим положением микроорганизмов и аминокислотным составом их белков. В белках различных штаммов дрожжей содержание лизина составляло от 3,8 до 10,2 %. Таким образом, среди дрожжей встречаются штаммы с исключительно высоким содержанием лизина. В природе не встречаются растения или животные, белки которых были бы столь же богаты лизином, как белки некоторых дрожжей.

На рис. 28.1 представлены кривые сора белковой ценности при добавлении к пшеничной муке высушенной биомассы *Saccharomyces cerevisiae*, полученной на среде с этиловым спиртом. Расчет сора выполнен для 1-й и 2-й лимитирующих аминокислот пшеничной муки (лизин и треонин) и лимитирующих аминокислот дрожжей (серусодержащие аминокислоты). Питательная ценность белка смеси определяется теми отрезками кривых, которые на рисунке расположены ниже остальных. Следовательно, если дрожжей в смеси меньше 14 %, ее белковая ценность лимитируется лизином, если больше 22% — серусодержащими аминокислотами. Малые добавки особенно резко повышают белковую ценность смеси в расчете на добавленные дрожжи.

Общее содержание белка в злаках невелико. Для покрытия потребности организма в белке некоторым категориям населения, особенно детям, трудно употребить достаточное по объему количество такого продукта, как пшеничный хлеб. Другим категориям, если и удается съесть необходимое по белку количество пшеничного хлеба, это сопровождается избыточным потреблением калорий.

Белковая ценность кормовых и пищевых продуктов, состоящих в основном из злаков, может быть повышена добавлением к ним биомассы микроорганизмов, содержащей много белка и

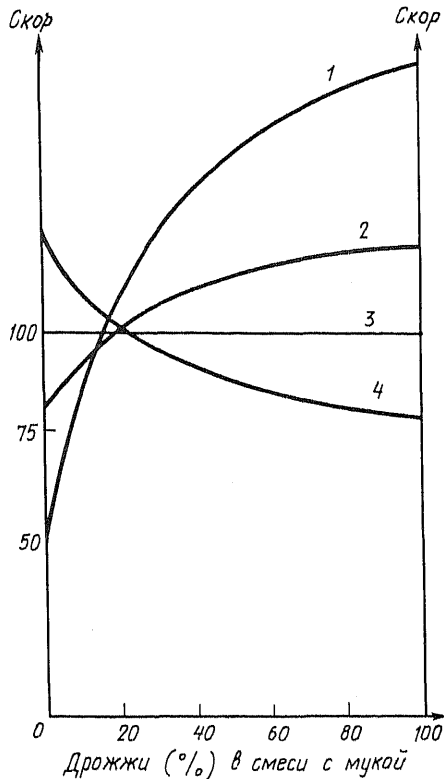


Рис. 28.1. Изменение сора по лимитирующим аминокислотам при добавлении дрожжей к пшеничной муке:

1 — лизин, 2 — треонин, 3 — желское молоко, 4 — серусодержащие аминокислоты

лизина, — 1-й лимитирующей аминокислоты в белках злаков.

Перевариваемость биомассы дрожжей в организме животных и человека обычно составляет 80—90%. Перевариваемость белка яиц, молока, мяса и рыбы близка к 100%, а многих растительных белков — около 80%.

Входящие в состав белка аминокислоты усваиваются лучше, чем свободные аминокислоты, добавляемые в корм, следует также иметь в виду, что лизин может довольно легко взаимодействовать с различными органическими соединениями по ε-аминогруппе и становиться недоступным организму животного. Таким образом, неверно говорить о нехватке белка вообще без учета как содержания белка в продукте, так и качества белка. Для повышения белковой ценности кормовых и пищевых продуктов из злаков к ним целесообразно добавлять биомассу микроорганизмов, содержащую много белка и лизина.

### 28.3. БЕЗВРЕДНОСТЬ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ

На микробную биомассу, предназначенную для использования в качестве компонента корма или пищи, полностью распространяются ограничения, налагаемые на другие кормовые и пищевые добавки. Это относится к допустимым нормам содержания патогенных микроорганизмов, канцерогенов, токсинов, тяжелых металлов и т. д.

Вместе с тем к микробной биомассе предъявляются и специфические требования, связанные как с особенностями микроорганизмов вообще, так и с особенностями конкретной биомассы, обусловленными спецификой штамма и условий его выращивания.

Нуклеиновые кислоты являются непременным компонентом клетки. В быстро растущих микроорганизмах их содержится больше, чем в клетках животных и растений. Входящие в состав нуклеиновых кислот пуриновые основания в организме животного превращаются в мочевую кислоту. У беспозвоночных, рыб, амфибий и многих млекопитающих, включая сельскохозяйственных животных, превращение мочевой кислоты в более растворимый аллантоин катализуется ферментом уриказой. Поэтому даже довольно высокое содержание пуринов в корме практически не опасно для сельскохозяйственных животных. В организме человека уриказы мало, основной продукт катаболизма пуринов у человека — плохо растворимая мочевая кислота. Она выводится из организма в основном с мочой.

Консультативная группа по белку Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН и Всемирной организации здравоохранения (РАС, 1975) пришла к заключению, что при введении в диету человека микроорганизмов (их биомассы) он не должен потреблять более 2 г/сут нуклеиновых кислот (в дополнение к традиционной диете). При более высоком потреблении этих кислот в плазме крови и в моче может повыситься содер-

жание мочевой кислоты, а это увеличивает риск заболеть подагрой и привести к образованию камней в мочевыводящих путях у предрасположенных к этому лиц.

На содержание нуклеиновых кислот у микроорганизмов, особенно бактерий, значительное влияние оказывает скорость их роста: чем выше удельная скорость роста, тем больше в получаемой биомассе нуклеиновых кислот и тем ниже отношение белок/нуклеиновые кислоты. Обычно 2 г нуклеиновых кислот содержится в 20—30 г высушенной биомассы дрожжей или 10—20 г бактерий. Если потребление микробной биомассы в пище человека превысит 10—20 г в сутки, увеличение использования микроорганизмов в питании должно осуществляться при условии снижения содержания нуклеиновых кислот в их биомассе. Клетки могут быть освобождены от подавляющей части нуклеиновых кислот по методу так называемого теплового шока, вызывающего активизацию внутриклеточных РНКаз. По этому методу дрожжи в течение нескольких секунд подвергают действию высокой температуры, а затем выдерживают несколько часов при 50—55°C.

Другие способы снижения содержания нуклеиновых кислот в клетках основаны на применении экзогенных рибонуклеаз либо на обработке клеток растворами некоторых кислот, щелочей или метанолом.

В липидах микроорганизмов встречаются компоненты, физиологическое действие которых на организм животного недостаточно изучено. У ряда бактерий широко распространен полимер  $\beta$ -оксимасляной кислоты, безвредность которого исследована лишь частично. Содержание полимера может колебаться в очень широких пределах в зависимости от условий культивирования микроорганизмов.

В липидах бактерий имеются циклопропановые кислоты, способные угнетать окисление жирных кислот в организме животного. Неблагоприятное воздействие биомассы водородных бактерий на организм человека частично связывается с наличием в их клетках  $C_{17}$ -циклической кислоты.

В клетках у некоторых бактерий обнаружены разветвленные жирные кислоты, которые могут нарушать обменные процессы макроорганизма.

Указанные выше компоненты липидов в дрожжах отсутствуют. В этом отношении дрожжи не вызывают каких-либо опасений. Вместе с тем при выращивании некоторых бактерий удается добиться весьма высокого содержания белка в их клетках — до 70% от массы высушенной биомассы. Все это определяет значительный интерес к исследованию бактерий как продуцентов белка.

В микроорганизмах, как и в других организмах, содержатся незначительное количество жирных кислот с нечетным числом атомов углерода. Но при росте на некоторых органических субстратах содержание таких кислот в клетках микроорганизмов может стать необычно высоким. В смеси парафинов, выделяемых

из нефти, содержится равное количество *n*-алканов с четным и нечетным числом атомов углерода. Это приводит к тому, что в дрожжах, выращенных на смеси *n*-алканов, около половины жирных кислот имеет нечетное число атомов углерода.

Синтез и накопление дрожжами жирных кислот с нечетным числом атомов углерода интенсифицируются при их росте на  $C_3$ -субстратах, особенно на средах с пропионовой и молочной кислотами. Эти соединения в составе нечетных ацил-КоА могут служить «затравкой» для синтеза жирных кислот с нечетным числом атомов углерода. Исследования показали, что они довольно легко метаболизируются как микроорганизмами, так и животными.

В стандартах на кормовые дрожжи, получаемые на углеводородах, содержатся ограничения и на так называемые остаточные углеводороды. Эти разнообразные вещества одно время рассматривали как не свойственные биологическим объектам, попадающие в организм человека из нефти через посредство кормовых дрожжей и сельскохозяйственных животных.

Для снижения содержания углеводородов в дрожжах разработаны специальные технологические приемы. Дрожжи, выращенные на дизельном топливе или нефтяных дистиллятах, должны быть подвергнуты глубокой экстракционной очистке органическими растворителями, а полученные на *n*-алканах, можно выдерживать в режиме голодания по органическому субстрату (а затем подвергают промывке).

Некоторое количество углеводородов удаляется из дрожжей в процессе сушки.

Известно также, что микроорганизмы, как и растения и некоторые насекомые, сами синтезируют углеводороды, преимущественно нормальные алканы с различной длиной углеродной цепи. Обычно содержание таких синтезированных углеводородов в высушенных клетках составляет сотые доли процента, но в отдельных случаях их количество может достигать нескольких процентов. Токсикологическая оценка *n*-алканов позволила сформулировать допустимые величины их содержания в кормовых дрожжах. В составе микробных стенок могут содержаться стереоизомеры аминокислот необычного строения, и это также должно учитываться при оценке безвредности микробной биомассы.

Для производства белка следует использовать микроорганизмы, не вызывающие аллергических реакций у производственного персонала и не обладающие патогенными свойствами. При оценке штаммов дрожжей по этим показателям в качестве стандарта непатогенности используются пекарские дрожжи *Sacch. cerevisiae*. Внутривенное введение этих дрожжей подопытным животным не вызывает их заболевания, а клетки дрожжей быстро выводятся из организма.

Оценка показателей безвредности конкретной микробной биомассы дается на основании химических, санитарно-гигиенических,



ветеринарно-зоотехнических и медико-биологических исследований. Анализу подвергаются как собственно кормовая белковая добавка, так и пищевые продукты животноводства, полученные при ее использовании. Белоксодержащие продукты, предназначенные непосредственно для питания человека, подвергаются еще более тщательному исследованию. Все это позволяет разработать технологии производства и способы применения белоксодержащих продуктов микробного происхождения, гарантирующие их полную безопасность для человека.

#### **28.4. ПРОЦЕСС И ПРИНЦИПЫ КОНТРОЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Современное промышленное использование микроорганизмов для производства белка осуществляется в ферментерах, работающих по принципу хемостата. Объемы ферментеров достигают нескольких сот кубических метров. В среду с размножающимися микроорганизмами непрерывно подаются водный раствор минеральных солей и применяемый в конкретном процессе органический субстрат. Культура подвергается перемешиванию, аэрированию и охлаждению. Скорость выделения тепла в процессе роста аэробных микроорганизмов прямо пропорциональна скорости потребления ими молекулярного кислорода. На каждый грамм потребленного микроорганизмами  $O_2$  выделяется 142,5 кДж (3,4 ккал). Расходы на охлаждение тем ниже, чем больше разница температур между охлаждающим агентом и ферментационной средой. Поэтому в производстве желательно использовать термотолерантные штаммы, а процесс выращивания осуществлять при максимальной температуре, еще не приводящей к существенному снижению выхода биомассы.

Рациональный процесс выращивания осуществляют при лимитировании роста микроорганизмов кислородом или близко к такому лимитированию. Поэтому при рациональном проведении процесса выращивания, когда массообменная характеристика ферментера используется наиболее полно, скорость физиологической теплопродукции в ферментере постоянна, она не зависит от используемого органического субстрата и применяемого штамма микроорганизма.

Принципиальная технологическая схема производства кормовых дрожжей приведена на рис. 28.2. Выращенные клетки дрожжей отделяют от водной среды сепарированием, или фильтрованием, если используют мицелиальные грибы. Разработаны и другие методы отделения биомассы, например флотация для концентрирования мелких бактериальных клеток. Их обычно промывают, концентрируют, после чего подвергают термической обработке при 80—90°C, приводящей к отмиранию клеток. Полученную в результате такой обработки сметанообразную массу высушивают, используя, как правило, распылительные сушилки. После высушивания получают порошкообразный или хлопьевид-

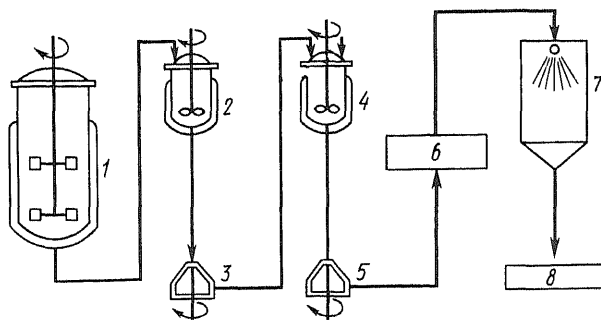


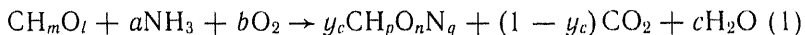
Рис. 28.2. Принципиальная схема производства кормовых дрожжей:

1 — ферментер, 2 — сборник, 3 — сепаратор, 4 — сборник, 5 — сепаратор, 6 — термообработка, 7 — сушилка, 8 — фасовка

ный продукт, который можно подвергнуть гранулированию. Продукт упаковывают и направляют на комбикормовые заводы и другим потребителям. Такие белокосодержащие добавки микробного происхождения имеют то или иное коммерческое название в зависимости от применяемого органического сырья, штамма микроорганизма и особенностей технологии, используемой на различных фирмах или предприятиях.

В СССР кормовые дрожжи, полученные на *n*-алканах, называют паприном, а на этаноле — эприном.

Для микробиологического производства белковых веществ используются штаммы и процессы, не приводящие к образованию и накоплению в среде значительного количества органических продуктов метаболизма. Для такого случая баланс макроэлементов переработки органического субстрата в биомассу микроорганизмов можно представить в виде следующего уравнения:



В этом уравнении брутто-формула органического субстрата и высушенной биомассы даны в расчете на один атом углерода. Например, брутто-формула глюкозы принимают вид  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ . Буквы *m* и *l* характеризуют состав конкретного субстрата, а буквы *p*, *n* и *q* — состав полученной биомассы.

На один атом углерода в клетках дрожжей приходится 1,7 атома водорода (мера изменчивости  $\pm 5,4\%$ ) и 0,55 атома кислорода ( $\pm 6,4\%$ ), а в клетках бактерий на один атом углерода приходится 1,82 ( $\pm 4,5\%$ ) атома водорода и 0,47 ( $\pm 11,3\%$ ) атома кислорода. Содержание азота подвержено большим колебаниям и его нужно определять в каждом конкретном случае. Доля массы углерода в безводной биомассе множества различных микроорганизмов равна 0,46 (мера изменчивости  $\pm 4,9\%$ ).

$y_c$  — выход по углероду. Доля углерода субстрата, равная  $y_c$ , перешла в биомассу, а остальная часть  $(1 - y_c)$  попала в

CO<sub>2</sub>. Аналогичным образом коэффициент  $c$  в уравнении баланса соответствует числу образовавшихся молей воды. В процессе роста вода может потребляться и образовываться. Коэффициент  $c$  отражает суммарный баланс воды в процессе роста микроорганизмов в расчете на безводную биомассу. Коэффициент  $c$  показывает число молей воды, образовавшейся при использовании единицы субстрата в процессе роста с выходом по углероду ( $y_c$ ), или с выходом CO<sub>2</sub> ( $1 - y_c$ ), с расходом аммиака  $a$ , или с расходом кислорода  $b$ .

Коэффициенты приведенного уравнения связаны между собой. Конкретному значению какого-либо коэффициента соответствует только одно значение другого коэффициента. Поэтому материальный баланс можно рассчитать, зная количество потребленного микроорганизмами органического субстрата и коэффициент при каком-либо из членов уравнения (1). Если количество использованного субстрата неизвестно, необходимо определить два коэффициента.

Можно составить формулы, таблицы и графики, позволяющие по отношению двух коэффициентов уравнения роста определить материальный баланс. Рассмотрение этих отношений имеет смысл только в термодинамически возможных пределах. Такими пределами являются, с одной стороны, случай, когда роста микроорганизмов нет и весь органический субстрат окисляется до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O, а с другой — идеальный процесс, когда вся химическая энергия органического субстрата сохранилась бы как химическая энергия в выросшей биомассе. Иными словами, диапазон экспериментально получаемых выходов (по массе, по углероду, по кислороду) не может соответствовать энергетическому выходу роста, меньшему, чем ноль, и большему, чем единица. Практически энергетические выходы роста микроорганизмов в аэробных условиях не бывают выше  $2/3$ . Фундаментальность понятия энергетического выхода роста позволяет использовать его для сравнения эффективности процессов выращивания различных микроорганизмов на разных органических субстратах в физиологически сопоставимых величинах. Значения энергетического выхода роста лежат в удобных пределах от 0 до 1. Определяемое в эксперименте или на производстве значение энергетического выхода роста сразу показывает, насколько полученная величина удалена от предельного значения.

Энергетический выход роста микроорганизмов позволяет наложить энергетические рамки на выход по углероду  $y_c$  или выход по массе  $Y_s$  (г биомассы, полученной из 1 г органического субстрата). Например, химическая энергия, содержащаяся в 1 г богатого энергией метана, допускает возможность получения 3 г биомассы, а из 1 г бедной энергией щавелевой кислоты нельзя получить более 0,1 г биомассы.

Значения выхода по массе (или по углероду), получаемые при выращивании микроорганизмов на различных субстратах, нельзя сравнивать для характеристики эффективности их исполь-

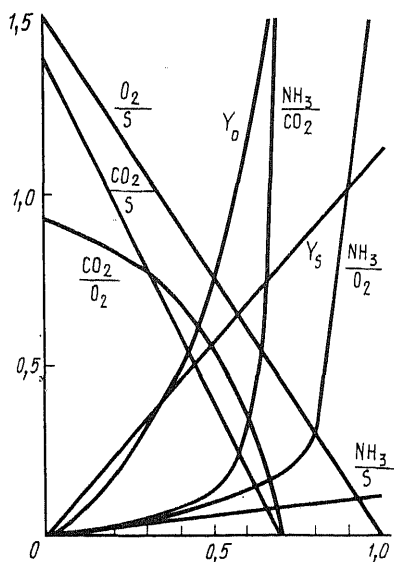


Рис. 28.3. Зависимость отношений материального баланса от энергетического выхода дрожжей на метаноле

зования. Можно ввести понятие нормализованных выходов, т. е. выходов в процентах от предельного значения для данного субстрата. Такие нормализованные выходы были бы ни чем иным, как энергетическим выходом роста.

На рис. 28.3 представлена связь отношений показателей материального баланса и энергетического выхода роста дрожжей на метаноле. Кривая взаимосвязи выхода по кислороду  $Y_0$  (г полученной биомассы на 1 г потребленного кислорода) и энергетического выхода роста  $\eta$  имеет универсальный характер для роста любых аэробных микроорганизмов и органических субстратов и описывается формулой

$$Y_0 = 0,75 \frac{\eta}{1-\eta}.$$

Величина  $\eta/1 - \eta$  показывает отношение химической энергии использованного органического субстрата, которая перешла в химическую энергию биомассы, к той части химической энергии субстрата, которая в процессе роста превратилась в тепло.

Значительную ценность представляет измерение так называемых неинерционных показателей материального баланса — скоростей потребления кислорода и аммиака, образования  $\text{CO}_2$ .

При выборе параметров для измерения баланса роста необходимо учитывать его специфические закономерности на том или ином субстрате и характер изменений показателей баланса в рабочей зоне измерений. При выращивании дрожжей на метаноле отношение  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  менее удобно использовать в зоне низких выходов, чем в зоне средних и высоких значений выходов. А при выращивании на углеводах отношение  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  в зоне низких выходов крайне слабо зависит от выхода и, следовательно, неудобно для определения баланса роста.

Наконец, важно знать, верно ли определен баланс. Поэтому целесообразно определить два или более отношений параметров баланса. Нужно сравнить значения энергетического выхода роста, получаемые при измерении различных компонентов баланса. Если энергетический выход роста, получаемый различными способами, оказывается одинаковым, результат можно учитывать. Это можно делать и автоматически, введя в программу ЭВМ.

Важнейшими обобщающими физиологическими характеристиками роста микроорганизмов являются его скорость и эффектив-

ность. Эффективность роста, которую наиболее удачно выражать через энергетический его выход, является также технологическим показателем первостепенной важности. Нет условий, оптимальных для роста вообще, а есть условия, оптимальные для скорости роста, и условия, оптимальные для эффективности роста. Локализация оптимума для этих двух характеристик может быть различной.

При микробиологическом получении белка на любом конкретном субстрате важно, чтобы ферментер работал с наибольшей производительностью, т. е. его массообменная характеристика использовалась бы в максимальной мере. Вместе с тем избыток органического субстрата подавать в ферментер нецелесообразно, так как он не будет использован, затруднит очистку сточных вод, а при выращивании микроорганизмов на углеводородах в избыточном количестве попадает в продукт.

На рис. 28.4 показана зависимость производительности ферментера по кислороду  $W_0$  от энергетического выхода роста  $\eta$  при лимитировании роста кислородом. Если бы массообмен в ферментере был ниже, то кривая  $W_0$  прошла бы ниже, если бы массообмен был выше, кривая прошла бы выше.

При лимитировании роста органическим субстратом зависимость производительности ферментера от энергетического выхода роста описывается прямой, например прямой  $W_s(2)$ . Если повысить содержание субстрата в подаваемой среде, то при лимитировании роста органическим субстратом производительность описывалась бы расположенной выше кривой  $W_s(1)$ .

Поскольку зависимость производительности ферментера по органическому субстрату от энергетического выхода роста описывается прямой, а по кислороду — гиперболой, эти линии могут пересекаться. Реальная производительность ферментера характеризуется тем отрезком одной из этих линий, который расположен ниже при значении энергетического выхода, наблюдающегося при росте конкретной культуры. Следовательно, скорость подачи органического субстрата в ферментер должна быть такой, чтобы пересечение линий производительности по органическому субстрату и по кислороду было бы как раз в зоне реального значения энергетического выхода роста. Добиться этого можно повышением или понижением скорости протока или концентрации органического субстрата в подаваемой среде. Если в заводском ферментере выход то повышается, то понижается, нужно, контролируя текущие значения энергетического выхода роста, повышать или понижать подачу органического субстрата. Такой алгоритм можно ввести в ЭВМ, связанную прямой связью с ферментером.

Если нужно, чтобы лимитирующим фактором был кислород, следует увеличить подачу органического субстрата на небольшую величину, так как избыточный субстрат не будет использован. Наоборот, если необходимо лимитировать рост органическим субстратом, его подачу необходимо несколько уменьшить.

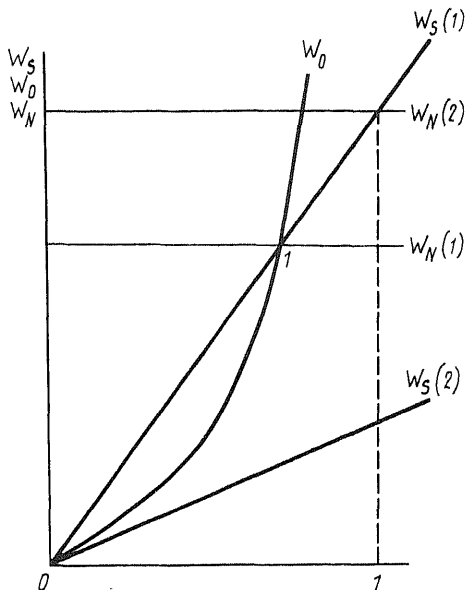


Рис. 28.4. Влияние энергетического выхода роста на производительность ферментера:  $W_0$  — по кислороду,  $W_S$  — по органическому субстрату,  $W_N$  — по источнику азота

Производительность ферментера по азоту не зависит от энергетического выхода роста. На рис. 28.4 она описывается горизонтальной линией  $W_N$ , расстояние которой от абсциссы определяется содержанием азота в исходной питательной среде. В ферменте, стабилизированном по рН автоматическим добавлением раствора аммиака, содержание азота в среде почти такое же, как в исходной. Поэтому, если азота давать мало, он будет лимитировать рост микроорганизма и производительность ферментера даже при очень низких энергетических выходах роста, а также при всех более высоких выходах. Если азота давать много, часть его

будет тратиться понапрасну, загрязняя сточные воды. Азота следует подавать столько, чтобы его концентрация в среде находилась вблизи точки одновременного лимитирования роста микроорганизмов кислородом и органическим субстратом. Другие минеральные компоненты нужно подавать в таком количестве, чтобы их содержание в ферментационной среде было бы несколько выше уровня одновременного лимитирования кислородом и органическим субстратом. В таком случае эти компоненты не будут лимитировать рост и производительность ферментера и в случае некоторого повышения энергетического выхода.

Известно, что при изменении режима хемостатного выращивания даже при сохранении той же удельной скорости роста может измениться выход. Поэтому при изменении температуры или какого-либо другого фактора, влияющего на энергетический выход роста, может произойти смена лимитирующего рост фактора. В связи с этим при смене режимов культивирования микроорганизмов следует проверять, не произошла ли смена лимитирующего рост компонента питания. Для этого нужно внести в ферментер разовую дозу компонента, предполагаемого как лимитирующего рост. Если этот компонент среды действительно лимитирует рост, немедленно или в течение нескольких минут возрастет скорость потребления кислорода, аммиака, увеличится образование  $CO_2$ . Регистрируя реакцию по любому из этих не-

инерционных показателей баланса, можно увидеть, лимитирует ли добавленный компонент рост культуры. Если реакции на добавку не наблюдается, следовательно, рост культуры лимитирован каким-то другим компонентом питания.<sup>1</sup> В таком случае для выявления лимитирующего рост фактора необходимо последовательно испытывать остальные компоненты питательной среды.

Таким образом, применение некоторых подходов материально-энергетического баланса роста при выращивании биомассы микроорганизмов позволяет оперативно оценивать и оптимизировать эффективность роста и производительность ферментера с использованием современной вычислительной техники.

## **28.5. ОСНОВНЫЕ ВИДЫ СЫРЬЯ И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ**

### **28.5.1. Гидролизаты растений**

Производство кормовых дрожжей на гидролизатах растительного сырья, как уже отмечалось, существует несколько десятилетий. Для этой цели используются гидролизаты древесины, подсолнечной и рисовой лузги, кукурузных кочерыжек, стеблей хлопчатника, богассы (жом, оставшийся после извлечения сахара из сахарного тростника) и других целлюлозосодержащих материалов. Сырье ежегодно возобновляется и, как правило, является отходами.

К недостаткам гидролизно-дрожжевого производства относится сложность сбора и транспортировки сырья на крупные предприятия. В СССР дальнейший рост производства кормовых дрожжей на основе использования гидролизатов ориентируется на применение древесины. В значительной мере он связан с разработкой и освоением непрерывного химического гидролиза древесины.

Процесс выращивания дрожжей на гидролизатах осуществляется в неасептических условиях, а развитие контаминантных бактерий ограничивается поддержанием в ферментационной среде определенного значения рН (около 4,0). В гидролизатах содержатся компоненты (например, фурфурол), оказывающие токсическое действие на рост дрожжей. Селекционированные в лаборатории штаммы имеют высокий выход биомассы в расчете на потребленные сахара. Но в производственных условиях эти штаммы зачастую вытесняются дикими штаммами, отличающимися большей устойчивостью к токсичным компонентам среды, меньшей потребностью в витаминах и высокими скоростями роста. Практически на каждом заводе происходит автоселекция штаммов или ассоциации дрожжей, приспособленной к местным условиям.

Список штаммов, используемых для производства кормовых дрожжей из гидролизатов растительного сырья, весьма обширен,

он включает виды рода *Candida* и других родов (*Trichosporon*, *Hansenula*, *Zygofabospora*).

Перспективно получение биомассы микроорганизмов на ферментативных гидролизатах целлюлозосодержащего сырья. Затруднением для промышленной реализации такого процесса является то, что в целлюлозосодержащем сырье имеется лигнин, препятствующий контакту целлюлаз с субстратом. Кроме того, сырье нуждается в обработке, позволяющей понизить содержание в нем кристаллической формы целлюлозы и перевести ее в аморфное состояние, после чего ферментативный гидролиз значительно ускорится.

## 28.5.2. Углеводороды

Возможность выращивания микроорганизмов, относящихся к различным таксономическим группам, на средах с углеводородами исследована достаточно широко. Способности к утилизации углеводородов часто встречаются у представителей дрожжей, из которых в первую очередь следует назвать род *Candida*, у представителей мицелиальных грибов, в частности *Aspergillus* и *Fusarium*, у многих видов грибов семейства *Mucoraceae* и разных бактерий.

Возможность утилизировать компоненты нефти наиболее часто проявляется среди микроорганизмов, развивающихся в природе в местах, содержащих углеводороды. В связи с этим илы сточных вод нефтеперерабатывающих предприятий и различные почвы, в которые попадают нефтепродукты, могут быть использованы для изолирования штаммов, активно растущих на средах с углеводородами. Для выделения быстро растущих микроорганизмов, не требующих добавления в среду для культивирования витаминов, используется метод селективных культур в сочетании с длительным непрерывным культивированием на среде с углеводородами при стабилизированных параметрах выращивания.

Изучение роста различных микроорганизмов на углеводородах выявило ряд специфических особенностей, свойственных отдельным группам. Глубинное культивирование мицелиальных грибов на средах с углеводородами осложняется из-за слабого контакта мицелия и частиц углеводорода при перемешивании среды. Многие микобактерии при росте на средах с углеводородами покрываются воскообразной капсулой, способствующей агглютинации. В результате этого образуются сгустки клеток, достигающие нескольких миллиметров в диаметре. Токсичные компоненты, содержащиеся в липидах сапрофитных микобактерий, выращенных на n-алканах, не позволяют разрешить использование их биомассы в качестве кормовой добавки.

Результаты исследований роста микроорганизмов на средах с метаном и другими газообразными углеводородами показы-



вают, что такие субстраты могут оказаться перспективными для биосинтеза биомассы бактерий, хотя аппаратурно-приборное оформление культивирования отличается дополнительными сложностями.

Перспективным признано культивирование на природном газе искусственных ассоциаций культур, состоящих из метанотрофной бактерии, растущей за счет окисления метана — основного компонента природного газа, и бактерии, растущей за счет использования этана, пропана, а также этанола и других метаболитов, выделяемых в среду метанокисляющим видом. Рост метанотрофов угнетается при накоплении в среде ряда органических веществ, некоторые из них могут продуцироваться культурой, но не окисляются ею дальше. Так, в результате роста в ассоциации не происходит угнетения роста метанотрофных бактерий теми продуктами, которые они образуют при так называемом соокислительном процессе.

Сравнительная оценка твердых и жидких углеводородов как сырья для биосинтеза показала несомненное преимущество соединений, температура плавления которых значительно ниже температуры культивирования микроорганизмов.

Все классы углеводородов могут служить субстратами для микроорганизмов, однако, как правило, процесс роста наиболее интенсивно происходит на среде, содержащей *n*-алканы с различной длиной цепи. Дрожжами с наибольшей скоростью обычно потребляются *n*-алканы  $C_{11} — C_{14}$ , среднее положение занимают *n*-алканы  $C_{15} — C_{18}$  и медленнее других усваиваются *n*-алканы  $C_{23} — C_{24}$ . Алканы  $C_6 — C_9$  не только плохо используются дрожжами, но часто токсичны для них.

Некоторые углеводороды, в особенности имеющие длинные прямоцепочечные радикалы, могут окисляться микроорганизмами, но процесс останавливается на определенной стадии и образовавшиеся продукты не используются в процессе роста.

Микроорганизмы способны окислять полициклические ароматические углеводороды, в том числе наиболее сильный канцероген — 3,4-бензпирен. Образующиеся в результате окисления метаболиты неканцерогенны или значительно менее канцерогенны, чем исходный углеводород. Ароматические полициклические углеводороды легко проникают в клетки микроорганизмов и накапливаются в них, локализуясь преимущественно в липопротеиновых структурах и липидных включениях.

Поскольку трудно добиться полной переработки микроорганизмами ароматических полициклических углеводородов, для биосинтеза может быть использовано сырье, не содержащее их.

Необходимо также создать условия культивирования, исключаящие накопление в клетках канцерогенных углеводородов.

Проникновение углеводородов в дрожжевые клетки через клеточные стенки осуществляется как по имеющимся в них порам, так и путем растворения в липидах стенок. Проникновение через клеточную мембрану идет путем растворения угле-

водородов в ней с последующим перемещением по системе канальцев эндоплазматического ретикулума и связанного с ним вакуолярного аппарата, а по некоторым данным (особенно в случае более вязкой консистенции углеводорода) путем пиноцитоза.

Наиболее распространенный путь окисления микроорганизмами *n*-алканов включает три основных этапа.

1. Первичное окисление *n*-алкана, приводящее к последовательному образованию соответствующего спирта, альдегида и, наконец, монокарбоновых кислот жирного ряда.

2.  $\beta$ -Окисление этих кислот с образованием в качестве основного промежуточного продукта ацетил-КоА.

3. Окисление ацетата в цикле трикарбоновых кислот.

В процессе первичного окисления к концевой метильной группе *n*-алкана с помощью оксидазы со смешанной функцией присоединяется атом кислорода из  $O_2$ . У дрожжей фермент первичного окисления имеет индуцибельную природу. Синтез фермента индуцируется карбоновыми кислотами и репрессируется глюкозой.

С помощью алкогольдегидрогеназы спирт или оксидазы окисляется до альдегида. Окисление альдегида в кислоту осуществляется альдегиддегидрогеназами.

Кислоты, образующиеся в результате окисления *n*-алканов, имеют то же число углеродных атомов, что и использованный алкан. В смеси парафинов, выделяемых из нефти, содержится равное количество *n*-алканов с четным и нечетным числом атомов углерода. Это приводит к тому, что в дрожжах, выращенных на смеси *n*-алканов, около половины жирных кислот имеет нечетное число атомов углерода, что нетипично для биологических объектов. Состав жирных кислот не повторяет состава *n*-алканов, использованных в качестве субстратов, а смещен в сторону  $C_{16}$ ,  $C_{17}$  и  $C_{18}$  кислот. Такое смещение происходит благодаря  $C_2$ -удлинению или укорочению жирных кислот, образующихся в результате окисления алканов.

В различных дрожжах, выращенных на *n*-алканах, обнаружено активное функционирование глиоксилатного цикла, как и в дрожжах, выращенных на ацетате. Активность ключевого фермента этого цикла — изоцитрат-лиазы — при этом резко повышена.

Специально был изучен вопрос об образовании побочных продуктов при росте дрожжей на *n*-алканах. Проведенные исследования позволили выявить штаммы — продуценты ряда органических кислот:  $\alpha$ -кетоглутаровой, лимонной и изолимонной.

При выращивании микроорганизмов в глубинных условиях на средах с жидкими углеводородами рост клеток происходит в эмульсии углеводорода в воде или воды в углеводороде. Крайне малая растворимость углеводородов в водных средах потребовала разработки специального математического описания процесса

роста на среде с углеводородами. За концентрацию органического субстрата принята поверхность капель парафина в единице объема среды. Основываясь на таком подходе, разработаны модификации моделей Моно и Иерусалимского зависимости скорости роста от концентрации лимитирующего рост органического субстрата и содержания в среде продуктов метаболизма. Анализ предложенных уравнений с учетом необходимости ограничения содержания парафинов в готовом продукте позволил разработать рациональные аппаратно-технологические решения для крупнотоннажного производства кормовых дрожжей на основе *n*-алканов.

### 28.5.3. Новые виды сырья

В последние годы основные направления исследований по микробиологическому получению белковых веществ несколько изменились. Прежде всего следует отметить повышение внимания к изысканию новых видов сырья для производства белковых веществ. В этой связи изучают фототрофные микроорганизмы, которые растут в автотрофных условиях, ассимилируя углекислоту.

Культивирование водорослей с целью получения белковых веществ исследуется уже несколько десятилетий. В настоящее время наиболее эффективный способ использования биомассы хлореллы и других водорослей заключается в применении их в качестве биостимуляторов. Обнадеживающие данные имеются по выращиванию цианобактерии спироулины. Жители района оз. Чад издавна используют спироулину в питании.

Может оказаться перспективным применение в качестве продуцентов белковых веществ водородных бактерий, относящихся к хемолитоавтотрофам. Но наиболее перспективными новыми видами сырья для микробного биосинтеза кормового белка на ближайшие годы являются спирты — метиловый и этиловый.

Повышение внимания к низшим спиртам объясняется рядом обстоятельств, среди которых следует отметить разработку новых эффективных способов крупнотоннажного производства метанола и этанола, высокую степень чистоты получаемых спиртов, хорошую растворимость их в воде.

Многие бактерии могут расти за счет использования метанола. Выходы биомассы при росте на метаноле составляют 50 % и более от массы использованного спирта. Энергетические выходы роста бактерий на метаноле (доля химической энергии органического субстрата, сохраняющаяся как химическая энергия в выросшей биомассе) достаточно велики (более 50 %), но ниже, чем при росте микроорганизмов на углеводах (до 65 %). При росте микроорганизмов на углеводородах энергетический выход роста ниже и составляет около 40 %. С этим связано более эффективное использование дорогостоящего растворенного кис-

лорода и повышение производительности ферментеров при использовании метанола по сравнению с культивированием микроорганизмов на *n*-алканах.

Процесс выращивания метанолиспользующих бактерий уже доведен до реализации. В этой связи следует прежде всего указать на работы западногерманской фирмы Хёхст, использующей в качестве продуцента *Methylomonas clara* и английской компании ICI, организовавшей промышленное производство на основе использования метанола бактериальной массы кормового назначения. В последние годы найден и интенсивно изучается ряд штаммов дрожжей, способных расти, используя метанол. Метанолассимилирующие дрожжи часто встречаются среди родов *Hansenula* и *Pichia*. К метанолассимилирующим дрожжам относится *Candida boidinii*.

Метанолиспользующие дрожжи наиболее часто выделяются из лесных почв, из коры деревьев или насекомых, живущих на поверхности деревьев. Возможно, это связано с наличием в таких местах лигнина — вещества, богатого метокси-группами.

Фермент, окисляющий метанол у дрожжей, является алкогольоксидазой, содержащей флавин (ФАД). Эта оксидаза может окислять и другие низшие спирты, но ее нет или содержание очень мало в клетках при выращивании дрожжей на этаноле или глюкозе. При окислении одной молекулы метанола до формальдегида метанолоксидазой образуется одна молекула пероксида водорода. Алкогольоксидаза, как и каталаза, локализована в пероксисомах, содержание которых резко увеличивается при росте дрожжей на среде с метанолом.

Согласно современным представлениям дрожжи ассимилируют углерод метанола на уровне формальдегида, включаемого через особый ксилулозо-монофосфатный цикл в строительный материал клеток.

Формальдегид — промежуточный продукт окисления метанола, может метаболизироваться в дрожжевой клетке разными путями, причем энергетическая эффективность путей существенно различается. Поэтому для целей практического выращивания микроорганизмов с высокими выходами роста следует изучить их зависимость от различных параметров выращивания. Наибольшие энергетические выходы при росте дрожжей на метаноле близки к 40 %.

Максимальные удельные скорости роста сравнительно невелики и обычно не превышают  $0,2 \text{ ч}^{-1}$ . Однако удельная скорость расходов на поддержание  $m_s$  примерно в 10 раз меньше этой величины. Поэтому в соответствии с формулой Иерусалимского — Перта, показывающей связь выходов и скорости роста,

$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{Y_{\max}} + \frac{m_s}{\mu} \quad (4)$$

при скоростях, составляющих  $1/3$  от максимальной, выходы биомассы уже близки к максимальным величинам для данных усло-

вий культивирования и практически не возрастают при дальнейшем повышении скорости роста. Константа насыщения  $K_s$  для некоторых штаммов метанонокисляющих дрожжей очень мала. Она составляет единицы мг метанола на 1 л среды. Отсюда следует, что в случае промышленного выращивания дрожжей при лимитировании их роста метанолом, т. е. при его содержании в среде, близком величине  $K_s$ , вынос данного спирта с аэрирующим воздухом и связанные с этим потери и загрязнение атмосферы будут ничтожны.

Различные дрожжи могут расти, используя этанол. Это позволяет подбирать для использования в производстве наиболее подходящие штаммы. Метаболизм этанола хорошо изучен. По-видимому, существенной особенностью дрожжей, выращенных на этаноле, является преобладание определенной алкогольдегидрогеназы, участвующей в его окислении. Состав липидов дрожжей, выращенных на этаноле, характеризуется почти полным отсутствием жирных кислот с нечетным числом атомов углерода. Вероятно, объясняется это легкостью образования из такого  $C_2$ -субстрата ацетил-КоА, служащего затравкой для биосинтеза жирных кислот с четным числом атомов углерода.

Выход по массе при росте дрожжей на этаноле составляет 80 % и более. Энергия, получаемая при окислении этого органического субстрата, используется дрожжами значительно более эффективно, чем при использовании *n*-алканов. Следовательно, при расчете на 1 т биомассы, получаемой на этаноле, расходуется меньше энергии и соответственно этому меньше потребляется кислорода. Экономленный кислород позволяет переработать в ферментере дополнительное количество этанола и получить больше биомассы. Поэтому ферментер, работающий по методу непрерывного выращивания дрожжей на этаноле, позволяет получить в час вдвое-втрое больше биомассы, чем при использовании *n*-алканов.

Применение этанола для получения микробной биомассы не встречает психологических возражений, нередко выдвигаемых против таких субстратов, как углеводороды или метанол. Это делает этанол привлекательным сырьем для производства дрожжей пищевого назначения.

В Англии организовано производство пищевого белка из гриба *Fusarium*. Продукт, названный микропротеином, используется как добавка к различным продуктам.

В СССР организовано сравнительно небольшое производство *Candida utilis* на этаноле. Из полученной биомассы выделяют белок, который добавляют в колбасы и другие мясные продукты. В США производится торутин — продукт высушенной биомассы *C. utilis*, полученной на синтетическом этаноле. Торутин используется для добавления в продукты питания человека с целью улучшения их органолептических свойств (вид, вкус, запах и др.), снижения себестоимости и повышения белковой ценности.

В СССР разработан способ производства на этаноле биомассы *Sacch. cerevisiae*. Используется штамм, применяемый в хлебопечении. Безвредность постоянного применения небольших количеств пекарских дрожжей в питании проверена опытом человечества на протяжении тысячелетий. Выход сахаромицетов при росте на этаноле несколько ниже, чем при выращивании *S. utilis*. Однако в белках сахаромицетов, выращенных на этаноле, содержание лизина очень высоко (около 10 % по массе). Как уже отмечалось, содержание лизина в белках злаков, особенно пшеницы, низкое. Поэтому добавление биомассы сахаромицетов в пшеничный хлеб позволяет не только повысить содержание в нем белка, но и улучшить аминокислотный состав белков. Благодаря двум положительным эффектам: повышению содержания белка и улучшению аминокислотного состава суммарного белка - от каждого грамма высушенной биомассы сахаромицетов, добавленной к пшеничной муке, белковая ценность хлеба повышается на один грамм в расчете на белок эталонного состава. При добавлении 5 % (от массы муки) биомассы сахаромицетов белковая ценность получаемого пшеничного хлеба повышается в 1,5 раза.

В настоящее время разработаны и другие способы производства пищевых дрожжей.

\* \*  
\*

Попытки микробиологического получения белка предпринимались давно, а производство кормовых дрожжей широко практиковалось еще до второй мировой войны. Но в настоящее время промышленный микробиологический синтез белка переживает второе рождение, определяемое возросшим уровнем знаний и технических возможностей общества. В исследованиях по изысканию сырья для микробиологического производства белковых веществ прослеживаются две противоположные тенденции.

1. Ориентация на чистые виды сырья, желателно, индивидуальны соединений.

2. Ориентация на использование различных отходов.

Использование «чистых» видов сырья соответствует общей тенденции технического прогресса. Применение «чистых» видов сырья позволит создать стабильно работающие крупные производства белка с получением продукта строго постоянного качества. Применение разного рода отходов, сточных вод химических заводов (синтетических жирных кислот, фенольных вод, капролактама и др.), сульфитных щелоков, навоза, различных отходов пищевых производств и т. д. означает, что сырье имеет отрицательную себестоимость, а это весьма заманчиво экономически. Важно и то, что переработка отходов способствует борьбе с местным загрязнением окружающей среды. Таким образом, каждое из указанных направлений заслуживает

развития. В связи с этим следует обратить внимание на изыскание новых сфер применения микробного белка. Их можно разделить на три группы:

1. Технические (добавки в корм на фермах по выращиванию пушных зверей, компоненты питательных сред для микроорганизмов, агенты, придающие гидрофильность синтетическим волокнам, различного рода наполнители, загустители — эмульгаторы, стабилизаторы и т. д.).

2. Кормовые для сельскохозяйственных животных.

3. Пищевые.

Очевидно, что требования как к качеству белковых веществ, так и к расходам на их получение связаны с областью применения продукта. Отходы нестабильного состава целесообразно использовать для получения белков прежде всего технического назначения. Для получения белковых веществ пищевого назначения необходимо использовать самое высококачественное сырье.

Исследования по получению белковых добавок микробного происхождения в пищу человека в последние годы резко интенсифицированы. Первым шагом использования белков микроорганизмов непосредственно в питании населения должно быть ограниченное добавление микробной биомассы в традиционные пищевые продукты. Целесообразным представляется добавление к пшеничной муке в количестве нескольких процентов биомассы *Sacch. cerevisiae*, полученной при использовании этилового спирта.

При добавлении дрожжей в пищу в количестве, превышающем допустимые для одного человека в сутки 10—20 г сухой биомассы, их необходимо подвергать денуклеинизации. Наконец, белок для пищевых целей можно выделять из микроорганизмов. В этом случае важным является не только создание экономичных процессов получения безвредного продукта, но и сохранение лизина в форме, «доступной» для организма.

Важное значение имеет совершенствование микробиологических методов получения белковых продуктов с точки зрения экологичности производства. Сюда относится сокращение выбросов в атмосферу при сушке биомассы, использование сточных вод в качестве эффективных жидких удобрений, снижение образования сточных вод путем многократного использования воды, являющейся основным по массе компонентом ферментационной среды. Большое значение имеет повышение содержания клеток в ферментационной среде. Уже разработаны способы, позволяющие достигать содержания биомассы (в расчете на высушенные клетки) до 100—150 г/л. При этом масса влажных клеток занимает половину объема ферментационной суспензии и ее можно направлять на сушку без сепарирования. Реализация таких способов в промышленном масштабе позволила бы понизить расход воды и энергии при микробиологическом производстве белка.

Тенденцией в промышленном производстве белка является

переход к проведению процесса в асептических условиях, что позволяет получать продукт строго постоянного качества и облегчает автоматизированное управление производственным процессом.

Дальнейшую перспективу промышленного микробиологического производства белка трудно переоценить. Многие тысячелетия пищевая база человечества основывалась на культивировании высших растений и животных. Прогресс наших знаний и практических возможностей приводит к дополнению пищевой базы путем использования низших форм жизни — микроорганизмов.

## *Глава 29*      **ПРОИЗВОДСТВО ВАКЦИН, БАКТЕРИОФАГОВ И ПРЕПАРАТОВ, НОРМАЛИЗУЮЩИХ МИКРОФЛОРУ ЧЕЛОВЕКА**

Под общим названием вакцины объединяют препараты, способствующие созданию активного иммунитета у людей и животных. Вакцины получают как из самих патогенных микроорганизмов, так и используя продукты их жизнедеятельности.

Применение вакцин вызывает выработку невосприимчивости к заражению соответствующим возбудителем и стимулирует защитные силы микроорганизма. Поэтому введение вакцин может осуществляться как с профилактической, так и с лечебной целью.

Первая вакцина была получена в конце XVIII в. Э. Дженнером, который предложил прививки против оспы содержащим оспенным капсουλ телят (вацца — корова). Вакцина в течение сравнительно короткого срока получила широкое распространение в ряде стран (в последнее время готовилась на куриных эмбрионах) и послужила основой для полной ликвидации оспы на всем земном шаре.

Дальнейшее развитие учения о вакцинах связано с работами Л. Пастера. Пастер установил важнейший факт ослабления вирулентности микроорганизмов под влиянием изменений внешних условий и создал учение об активной иммунизации, проводимой с помощью аттенуированных (ослабленных) возбудителей инфекционных болезней — бактерий и вирусов.

### **29.1. ВАКЦИНЫ**

В настоящее время препараты для активной иммунизации — вакцины можно разделить на четыре основные группы: 1) живые вакцины — ослабленные или наследственно измененные возбудители заболеваний; 2) убитые вакцины, полученные из убитых различными способами возбудителей заболеваний; 3) анатоксины



(токсины) — продукты жизнедеятельности микробной клетки, обработанные формалином и подвергнутые действию повышенной температуры; 4) химические вакцины, представляющие собой различные, извлекаемые химическим путем компоненты микробной клетки.

Исторически более ранними из всех вакцин являются живые вакцины. Сравнительно более поздними наблюдениями было установлено, что иммуногенными свойствами обладают не только живые, но и убитые микроорганизмы, а также их лизаты и даже отдельные антигены, входящие в состав клетки и экстрагированные различными способами.

Убитые вакцины получают нагреванием или используя другие методы физического и химического воздействия на микроорганизмы. Поэтому различают гретые, феноловые, формалиновые, спиртовые, ацетоновые вакцины. Могут быть применены ультрафиолетовое облучение, ультразвук и другие средства.

При приготовлении вакцин производство их делится на несколько технологических этапов. Первым можно назвать накопление биомассы микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности. Эта стадия производства связана с теорией и практикой управляемого биосинтеза.

Производственными этапами являются также инактивация микроорганизмов (различающаяся в зависимости от используемых методов), концентрация, очистка и лиофилизация. Расфасовка вакцинных препаратов зависит от способов их введения (жидкие — пероральные, таблетированные или дражированные препараты, ампулированные — для подкожного или внутримышечного введения).

Контроль изготовленной вакцины проводят на стерильность, густоту микробной взвеси, иммуногенность и другие свойства.

На примере отдельных вакцинных препаратов можно более подробно представить технологические этапы их приготовления. В качестве одного из примеров приготовления корпускулярной убитой и химической вакцины может быть приведена технология производства сухой спиртовой брюшнотифозной вакцины, обогащенной Ви-антигеном.

### **29.1.1. Получение спиртовой брюшнотифозной вакцины**

Для изготовления брюшнотифозной вакцины применяют штаммы бактерий, возбудителей брюшного тифа, отвечающие всем требованиям действующей «Инструкции по отбору, проверке и хранению штаммов сальмонелл и шигелл, применяемых для изготовления вакцин против кишечных инфекций». Одним из таких штаммов является штамм *Salmonella typhi* 4446.

Процесс изготовления сухой корпускулярной брюшнотифозной вакцины состоит из нескольких стадий: получение маточной

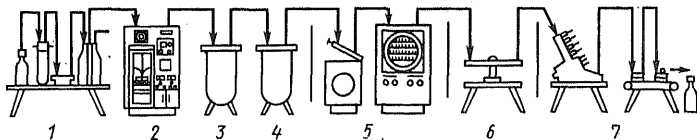


Рис. 29.1. Схема технологического процесса производства брюшнотифозных корпускулярных вакцин:

1 — работа с производственным штаммом, 2 — накопление биомассы, 3 — инактивация нативной микробной взвеси, 4 — стандартное разведение, 5 — лиофильное высушивание препарата, 6 — запаивание ампул, 7 — этикетировка и упаковка готового препарата

культуры, выращивание нативной культуры (микробной взвеси), инактивация микробной взвеси, приготовление вакцины, розлив в ампулы, лиофильное высушивание и запайка ампул (рис. 29.1).

Посевным материалом служит 18-часовая агаровая культура в изотоническом растворе хлорида натрия с густотой 500 млн. микробных клеток в 1 мл, вводимая в объеме 5—10% к объему засеваемой среды, или 5—6-часовая бульонная культура с густотой не менее 500 млн. микробных клеток в 1 мл, вводимая в той же пропорции.

Брюшнотифозные бактерии выращивают в условиях аэрации на белково-гидролизатных или полусинтетических средах, позволяющих получить достаточно высокий выход биомассы. Регламентировано использование в качестве питательных сред бульона из гидролизата казеина, которых должен быть прозрачным, соломенного цвета, иметь рН 7,2—7,6 и содержать 300—400 мг% общего азота, 200—250 мг% аминного азота и 0,1—0,6% пептона.

В настоящее время вакцину производят методом глубинного культивирования в реакторах из нержавеющей стали различной емкости, снабженных рубашками, в которые подается пар или вода (обеспечение условий стерилизации и термостатирования). Реакторы оснащены системой сифонов для подачи среды, проведения выемок, слива культуры после завершения культивирования. При выращивании культуры рекомендуется вводить стерильных воздух в реактор из расчета 1 л на 1 л среды в 1 мин. Дополнительное перемешивание аэрируемой среды обеспечивается турбинной или роторной мешалкой, скорость вращения 180—300 об/мин. Выращивание в реакторе проводят 10—12 ч до концентрации бактерий порядка 40—60 млрд. клеток в 1 мл.

В целях интенсификации размножения микроорганизмов и поддержания рН среды на уровне 7,6—7,8 к культурам периодически добавляют 40%-ный стерильный раствор глюкозы. Заданные режимы культивирования (температура, интенсивность аэрации, подача глюкозы) регистрируются и автоматически поддерживаются с помощью контрольно-измерительной аппаратуры пульта управления.

При приготовлении спиртовой вакцины взвесь микробных клеток, полученную в глубинных условиях культивирования,

обрабатывают при тщательном перемешивании в специальных мерниках стерильным 96%-ным этиловым спиртом двукратно (соотношение первой обработки 1:4, второй — 1:10).

После проведения соответствующего контроля нативной взвеси на стерильность и иммуногенность инактивированную биомассу разводят изотоническим раствором хлорида натрия с 0,25% фенола, используемого в качестве консерванта.

В 1 мл спиртовой вакцины содержится 5 млрд. микробных клеток. Разлитую в ампулы вакцину подвергают замораживанию при температуре от  $-40$  до  $-50^{\circ}\text{C}$  и высушиванию в сублимационных установках, после чего ампулы с препаратом запаивают под вакуумом.

Спиртовая сухая брюшнотифозная вакцина может быть использована как в чистом виде, так и после обогащения Ви-антигеном.

По той же принципиальной схеме может производиться лечебная сухая спиртовая дизентерийная вакцина, имеющая ограниченное применение при вяло текущих хронических формах заболевания.

### **29.1.2. Получение очищенного препарата Ви-антигена**

Многочисленными экспериментальными исследованиями показано, что Ви-антиген — один из важных компонентов, обеспечивающих в комплексе с О-антигеном создание в организме полноценного иммунитета. Поэтому усилия многих исследователей направлены к тому, чтобы сохранить эти антигены в составе микробной клетки в состоянии наиболее высокой иммуногенной активности или выделить их без снижения этой активности.

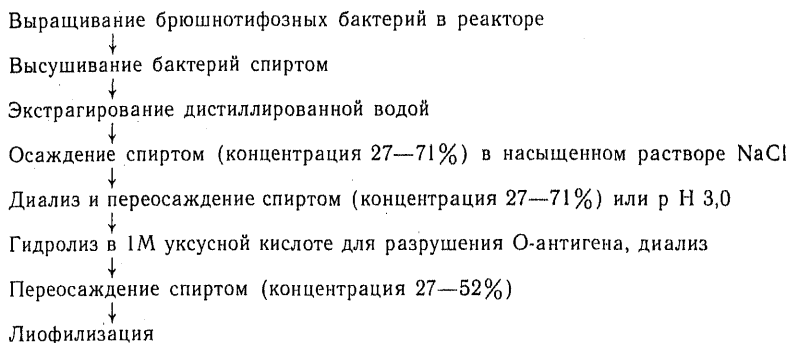
Одним из путей повышения иммуногенности вакцинных препаратов является увеличение в известных пределах их дозировки. Для О-антигена брюшного тифа эта возможность ограничена ввиду его высокой токсичности, которую пока не научились снижать без нарушения иммуногенных свойств. Что касается Ви-антигена, то некоторые из предложенных методов допускают его выделение в нетоксичной форме. Ряд иммунологических данных позволяет предполагать важное, даже ведущее значение Ви-антигена при формировании иммунитета к брюшному тифу. Поэтому повышение концентрации Ви-антигена в брюшнотифозной вакцине может увеличить ее иммуногенность.

В микробной клетке Ви-антиген присутствует в поверхностном слое и довольно легко переходит в окружающую среду. Структурной единицей полимерной цепочки Ви-антигена является  $\alpha$ -ацетиламино-2-дезоксид-Д-галактуроновая кислота.

Принцип получения Ви-антигена заключается в том, что он изолируется из водного экстракта сухой массы брюшнотифозных бактерий трехкратным переосаждением спирта в различных условиях.

Вначале активная фракция, содержащая Ви-антиген, осаждается спиртом (концентрация 27—71%) после насыщения экстракта хлористым натрием. Полученный осадок после диализа переосаждается при тех же концентрациях спирта после подкисления до pH 3,5—3,8. Наконец, третье осаждение производится в более узком интервале концентраций спирта (27, 46, 52%) после кислотного гидролиза, разрушающего остатки О-антигена.

Технологическая схема получения Ви-антигена состоит из следующих этапов:



Полученный сухой Ви-антиген растворяется изотоническим раствором хлорида натрия до концентрации 400 мкг в 1 мл, разливаается по ампулам по 5 мл и в качестве растворителя (вместо физиологического раствора) прилагается к сухой спиртовой вакцине. Возможно использование Ви-антигена и в качестве моновакцины.

Перед употреблением в ампулу с сухой вакциной добавляют 5 мл растворителя Ви-антигена. В 1 мл разведенной вакцины содержится 500 млн. микробных клеток и 400 мкг Ви-антигена брюшнотифозных бактерий.

Ревакцинацию производят той же дозой через два года после первичной иммунизации.

### **29.1.3. Особенности приготовления анатоксинов и использование аттенуированных штаммов**

Одним из примеров приготовления вакцинных препаратов из экзопродуктов бактерий является производство столбнячного анатоксина.

Проблема профилактики столбняка советское здравоохранение уделяет большое внимание, ибо широкое распространение возбудителя в почве создает реальную угрозу заболевания людей при самых незначительных травмах. Возбудитель столбняка — спорообразующий анаэроб *Clostridium tetani* — образуют сильный экзотоксин, обладающий нейротропным действием. «Анатоксин» — препарат, сохраняющий антигенные и иммуногенные свой-

ства и полностью лишенный токсичности. В настоящее время широко применяется очищенный столбнячный анатоксин, адсорбированный на гидроокиси алюминия.

Очищенный и адсорбированный столбнячный анатоксин — жидкий препарат, представляющий собой беловатую или слегка желтоватую гомогенную суспензию. Основным действующим началом препарата является очищенный от балластных белков токсин столбнячной палочки, обезвреженный формалином и сорбированный на гидроокиси алюминия. В качестве консерванта препарат может содержать 0,01% мертиолата или 0,25% фенола.

Препарат должен быть стерильным, безвредным, иммуногенным, содержать в 1 мл 20 ЕС (единиц связывания), иметь рН 6,8—7,6 и удельную активность не менее 500 ЕС на 1 мг белкового азота; содержать не более 0,02% формалина на 20 ЕС. Разовая прививочная доза анатоксина 0,5 мл (10 ЕС).

При производстве анатоксина используют вакцинные штаммы *C. tetani*, которые культивируются на казеиновой кислотно-гидролизатной питательной среде с содержанием общего азота 350—380 мг%, белкового азота 5—8 мг% и аминного азота 110—120 мг%. В питательную среду добавляют автолизат отрубей и дрожжевой экстракт.

Производственный цикл получения столбнячного анатоксина включает те же основные этапы, что и других бактериальных вакцинных препаратов: выращивание бактерий, проводимое в анаэробных условиях управляемого культивирования (целевой продукт не микробная масса, а экзопродукт — токсин), инаktivация токсина, очистка (несколько различных методов), адсорбция на гидроокиси алюминия, расфасовка и контроль.

Значительное место в активной иммунизации против ряда инфекций принадлежит вакцинам, изготовленным из аттенуированных, наследственно измененных штаммов соответствующих микроорганизмов. К ним относятся вакцина ВЦЖ — живая вакцина против туберкулеза, изготовленная из штамма, аттенуированного Кальметтом и Гереном в 1906 г.; туляремиальная живая сухая вакцина для кожного применения, изготовленная из наследственно измененного, стойко аттенуированного штамма — возбудителя туляремии, полученного Эльбертом и Гайским, и ряд других.

#### 29.1.4. Особенности вирусных препаратов

В последнее время среди живых вакцин распространение получили вирусные препараты. Культивирование вирусов проводится на куриных, утиных или перепелиных эмбрионах либо в тканевых культурах. Эмбрионы могут использоваться не только для непосредственного заражения, но и для приготовления из них тканевых культур (вакцина против кори). Вирусные препараты требуют особенно тщательного соблюдения правил стериль-

ности и строгой изоляции помещения от других видов работ. Необходимо исключить любую возможность контаминации исходных материалов посторонними вирусами. Эмбрионы берутся из специальных хозяйств от так называемых безлейкозных птиц. Строго определена видовая принадлежность животных, используемых для получения культуры тканей (например, африканские зеленые мартышки — для культуры клеток почек, на которых выращивается вирус полиомиелита). Животные выдерживаются в строгом карантине.

Для культивирования тканей используются особые питательные среды сложного состава. Накопление вируса на культуре тканей осуществляется в стеклянных сосудах. Для повышения выхода вируса могут быть использованы специальные приспособления для вращения сосудов. В настоящее время разрабатываются методы глубинного культивирования.

При приготовлении вирусных вакцин также проводится концентрация и очистка накопленной массы вируса. Освобождение от грубых примесей может достигаться путем сепарирования, а последующее получение вакцины — путем стерилизующей фильтрации вирусосодержащей жидкости (вакцина против полиомиелита). После тщательного контроля вакцины расфасовываются и используются либо в качестве жидкого препарата, либо подвергаются лиофильному высушиванию. Для перорального применения полиомиелитная сухая вакцина расфасовывается, например, в виде драже.

Вирусные вакцины могут быть и убитыми. Оригинальный способ хроматографии на широкопористом стекле разработан для очистки и концентрации вируса гриппа при приготовлении убитой гриппозной вакцины.

### **29.1.5. Требования, предъявляемые к вакцинам**

Все вакцины независимо от их происхождения должны отвечать нескольким основным требованиям, без которых они не могут быть применены для активной иммунизации.

1. Вакцины должны обладать специфической стерильностью; вакцины независимо от того, являются ли они корпускулярными, химическими или живыми, состоящими из аттенуированных штаммов микробов или вирусов, не должны содержать посторонних агентов.

Специфическая стерильность тесно связана с идентичностью вакцин, так как вакцина должна содержать в живом или убитом виде только те микроорганизмы или дериваты, которые соответствуют названию данной вакцины. Исходя из этого, как было указано выше, примесь к вакцинам посторонних агентов абсолютно не допустима.

2. Второе требование, которому должны отвечать вакцины, — их безвредность (проверяется, прежде чем вакцина поступит

для применения). Безвредность вакцины определяют на лабораторных животных; они не должны давать на введение вакцины местных или общих реакций, выходящих за пределы допускаемых инструкциями.

3. Третье требование, предъявляемое к вакцинам, — стандартность. Все ампулы соответствующей серии должны содержать одинаковое количество вакцины и обладать одинаковой или очень близкой антигенностью и иммуногенностью.

4. Четвертое требование к вакцинам — умеренная реактогенность. Ареактогенных вакцин в природе не существует. Микробные препараты могут обладать и обладают различной способностью вызывать ответную общую и местную реакции при введении. Они характеризуют «реактогенность» препарата или характер ответа организма на введение тех или иных вакцин.

5. Чрезвычайно важный вопрос — определение иммуногенности вакцин. В связи с этим обязательно иметь данные о качестве вакцин, оценивая их антигенность как в пробирке, так и на лабораторных животных. Под антигенностью соответствующих профилактических препаратов следует понимать способность данного антигена или нескольких антигенов вызывать образование специфических антител. Иммуногенность препаратов оценивают чаще всего по устойчивости лабораторных животных, иммунизированных данным препаратом, при последующем заражении их соответствующей культурой микроорганизма или продуктами его жизнедеятельности (токсины).

## **29.2. ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ БАКТЕРИОФАГОВ**

Для лечения и профилактики ряда инфекций наряду с другими препаратами применяют вирусы бактерий — бактериофаги, обладающие высокой специфичностью к патогенным и условнопатогенным бактериям. Избирательность их действия значительно выше, чем антибиотиков и других химиотерапевтических средств. Бактериофаги не оказывают влияния на нормальную микрофлору. Они сами фактически относятся к нормальной микрофлоре. Естественной средой обитания многих фагов служат фекалии, речные и сточные воды, куда они попадают вместе с фекалиями и где играют роль одного из факторов самоочищения внешней среды.

Феномен бактериофагии впервые наблюдал в 1898 г. Н. Ф. Гамалея. Однако выделен такой литический агент был лишь в 1917 г. д'Эреллем. Это был бактериофаг, специфичный для палочки дизентерии Григорьева—Шига. В 30—40-х годах бактериофаги заняли заслуженное место среди других лечебно-профилактических препаратов. Большую группу среди них составляют бактериофаги против кишечных инфекций: дизентерийный, брюшнотифозный, сальмонеллезный групп АВСДЕ, коли-протейный. Широкое распространение антибиотикорезистентных форм бак-

терий и осложнения, связанные с применением химиотерапевтических средств, привели к потребности в так называемых раневых бактериофагах — стафилококковом, протейном, синегнойной палочки.

Возможность приготовления бактериофагов, высокоспецифичных по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам (в том числе к антибиотико- и сульфаниламидоустойчивым формам), представляет большой интерес для лечения и предупреждения заболеваний, отягощенных дисбактериозом — нарушениями в нормальной аутофлоре.

Получение препаратов бактериофагов высокого качества достигается только благодаря хорошо организованной совместной работой производителей, сотрудников лабораторий и больниц. Широкая валентность и сила литического действия бактериофагов определяется систематическим подбором штаммов от больных и бактерионосителей, постоянным обновлением производственных штаммов за счет свежeweыделенных. Одновременно производится непрерывная работа по выделению изначально сильных штаммов вирулентных фагов из сточных и речных вод (реже из фекалий или гноя). Для повышения активности фагов используются пассажи *in vitro*, а также на животных. Одним из эффективных методов пассирования *in vivo* является использование изолированной петли тонкого кишечника морских свинок или белых мышей.

Из большой коллекции монофагов комплектуют комплексный маточный бактериофаг, поступающий для получения серии в производственный реактор. В качестве субстрата для размножения серийного препарата используют набор штаммов. Лечебная и профилактическая эффективность бактериофага определяется тем, в какой мере его структура соответствует этиологической структуре заболеваний на определенной территории. Вот почему при применении бактериофагов очень важно не только проверять чувствительность возбудителя к препарату, но и направлять все нeлизирyющие штаммы бактерий в институт, из которого получен бактериофаг. Нецелесообразно использовать для лечения (или профилактики) бактериофаг, к которому не чувствителен штамм бактерий, выделенный от больного (или большая часть штаммов бактерий, циркулирующих в данной местности). Возможен подбор и специальное приготовление для конкретных больных аутофагов к штаммам, которые не лизируются серийным препаратом.

Технологический процесс производства жидких бактериофагов состоит из следующих этапов: подбор штаммов для производства данного вида фага, получение маточных бактериофагов, приготовление серий жидкого бактериофага, контроль готового препарата на стерильность, безвредность и литическую активность, этикетировка и упаковка препарата (рис. 29.2).

Отобранные для производства штаммы должны находиться



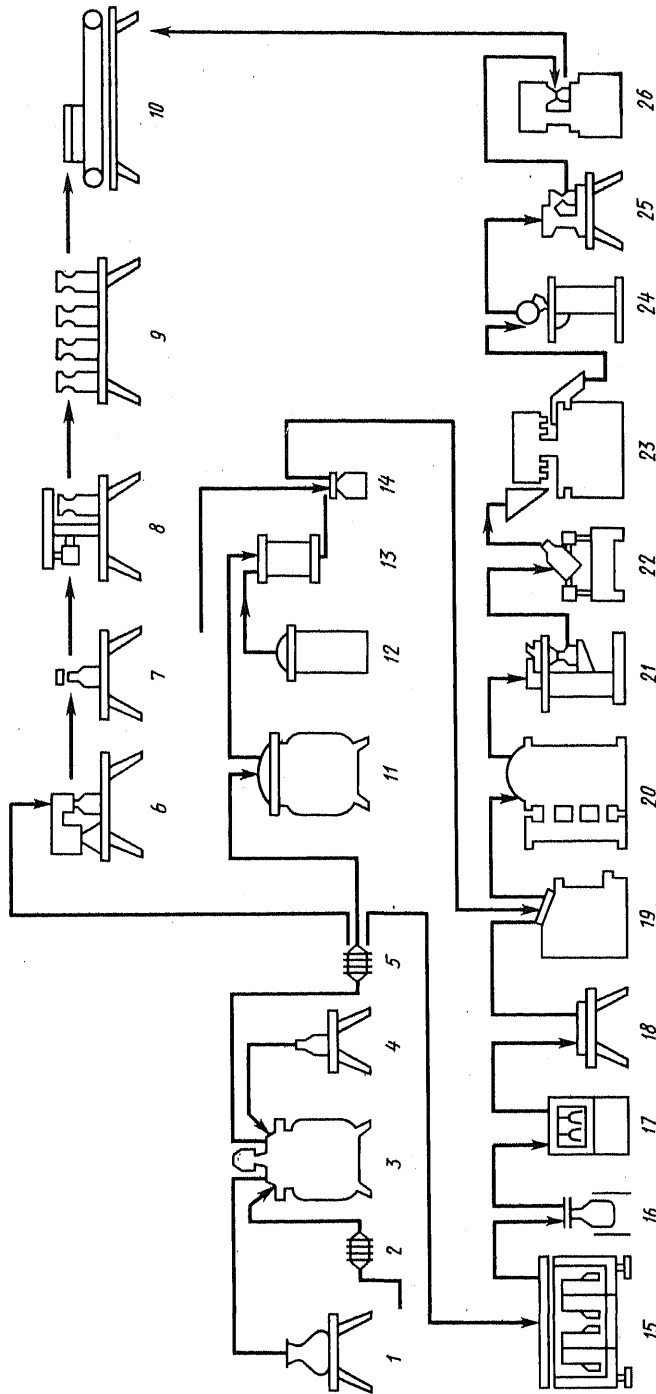


Рис. 29.2. Схема технологического процесса производства жидкого и сухого бактериофага:

1 — засев культуры (составление нативной взвеси), 2 — многограммный фильтр, фильтрующий питательную среду, 3 — реактор, 4 — бутылка емкостью 1 л со смесью маточных фагов, 5 — многограммный фильтр (стерилизующий), 6 — разлив препарата во флаконы, 7 — укупорка флаконов резиновой пробкой, 8 — закатка алюминевым колпачком, 9 — хранение продукции на период контроля, 10 — этикетировка и фасовка на кофвейере, 11 — реактор разведения 1 : 2, 12 — элюирующий раствор, 13 — колонки с ДЭА-целлюлозой, 14 — емкость (сбор концентрата и добавление обратного молока 1 : 2), 15 — ванна осаждения, 16 — бак для освобождения от жидкости, 17 — смеситель сырой массы, 18 — расфасовка массы в кассеты, 19 — емкость для предварительного замораживания, 20 — вакуум-сушильный аппарат, 21 — гранулятор, 22 — смеситель сухой массы, 23 — таблеточная машина, 24 — установка для покрытия таблеток, 25 — счетно-фасовочная машина, 26 — закаторная машина

в S- и O-формах, обладать типичными морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами. Для лучшего сохранения целесообразно после проверки свойств культур высушивать их под вакуумом до замороженного состояния (лиофилизировать) и хранить в темном месте при температуре +4, +6°C. Производственная коллекция непрерывно пополняется свежесвыделенными штаммами.

Для получения маточных бактериофагов к пробам речных и сточных вод подсевают соответствующую культуру бактерии и после инкубации при 37°C фильтруют через стерилизующие фильтры. Литическая активность фильтратов проверяется титрованием в жидкой питательной среде (по Аппельману) с набором штаммов данного вида. Наиболее активные используют для приготовления маточных фагов.

Серийный бактериофаг готовят в реакторах емкостью от 250 до 500 л. Реакторы имеют паровую рубашку с разрешающим давлением  $3 \cdot 10^5$  Па (3 атм), пропеллерную мешалку, спусковой вентиль и систему труб для аэрации среды. Реактор и все его части изготавливают из нержавеющей стали.

В состав питательных сред для получения кишечных и раневых бактериофагов входят белковые основы в виде кислотных или ферментативных гидролизатов казеина, мяса (гидролизат Хоттингера, пептон Мартена). В качестве источника ростовых факторов используют мясные экстракты, чаще с добавлением глюкозы, значение рН среды устанавливают в пределах 7,2—7,6 в зависимости от вида бактерий, для которых специфичен бактериофаг.

В реактор с питательной средой (37°C) засевают нативную взвесь бактерий из расчета 50—150 млн. клеток на 1 мл среды. Маточный фаг добавляют в количестве 0,01—0,1% объема питательной среды. Содержимое тщательно перемешивают воздухом. Воздух, подаваемый в реактор под давлением, поступает через стерильный ватно-угольный фильтр с активированным углем. Лизис проходит при температуре 37°C в течение 4—10 ч (в зависимости от вида бактериофага). Полноту лизиса определяют визуально (по полноте прозрачности). По завершении процесса добавляют консервант хинозол (0,01%). Через 1,5—2 ч после добавления консерванта фаголизат фильтруют через стерилизующие пластины и разливают в стерильных условиях во флаконы по 100, 50 и 25 мл.

Для получения сухого бактериофага первые три стадии аналогичны. Затем проводится концентрация фага, его высушивание, таблетирование, нанесение кислотоустойчивого покрытия. Контроль сухого препарата проводится на специфическую стерильность, на наличие постоянных микроорганизмов, безвредность, литическую активность, остаточную влажность, растворимость в искусственном желудочном соке. Бактериофаг фасуется подобно другим таблетированным препаратам, этикируется и упаковывается. Кроме таблетированной формы (по аналогии с

другими фармакопейными формами) бактериофаг может готовиться на мазевой основе или в виде ректальных свечей.

Концентрация жидкого бактериофага может проводиться путем высаливания сульфатом аммония, который добавляют в количестве 69% от объема фага. Высаливание продолжается 18 ч без последующего диализа при температуре (+2) — (+4°C), рН 6,9—7,0. К образовавшейся пастообразной массе добавляют в качестве стабилизатора глюконат кальция (9%). Если защитным покрытием служит пектин, его добавляют одновременно с глюконатом кальция (3% к массе). Массу наносят на кассеты (толщина слоя 1 см) и высушивают из замороженного состояния под вакуумом в аппаратах для лиофилизации до достижения остаточной влажности 2—4%. Высушенную массу размельчают в грануляторе, контролируют на специфическую стерильность, обсемененность посторонними микроорганизмами и литическую активность. С учетом литической активности различных компонентов составляется смесь для таблетирования поливалентного бактериофага и определяется масса одной таблетки (в пределах 0,11—0,25 г). Таблетирование производится на специальных прессах с использованием пуансонов, обеспечивающих получение таблеток чечевицеобразной формы, без резких граней. Таблетки, полученные из массы, к которой для защиты корпускул фага не добавлялся пектин, покрывают во вращающемся дражировочном котелке ацидорезистентной оболочкой из 5%-ного раствора ацетофталата целлюлозы. Растворителем служит смесь ацетона с этиловым спиртом в соотношении 7:3. Наносится покрытие с помощью специального распылителя (рис. 29.2).

Концентрацию жидкого бактериофага можно проводить методом ионообменной хроматографии с использованием волокнистой ДЭАЭ-целлюлозы. При этом профильтрованный бактериофаг разводят пополам стерильной дистиллированной водой и пропускают через хроматографические колонки с ДЭАЭ-целлюлозой. Затем проводят элюцию бактериофага 0,7—1,0 М раствором NaCl на 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0—7,4) с добавлением 1% серноокислого аммония. Концентрат стерильно собирают в емкости, добавляя в качестве стабилизатора 50% обратного молока и 2% глюкозы, а затем подвергают лиофилизации. В настоящее время бактериофаги выпускаются в широком ассортименте.

Бактериофаг дизентерийный — препарат, активный в отношении дизентерийных бактерий Флекснера, Зонне и Ньюкасл, Штуцера — Шмитца и Григорьева — Шига. Применяют для лечения и профилактики дизентерии.

Бактериофаг брюшнотифозный — смесь бактериофагов, активных в отношении возбудителей брюшного тифа различных фаготипов. Препарат применяют для предупреждения заболевания брюшным тифом контактировавших с больным.

Бактериофаг сальмонеллезный групп АВСДЕ — смесь фаголизатов разных сальмонелл. Сальмонеллезный бактериофаг

применяют для лечения и санации больных и носителей, а также с профилактической целью по эпидпоказаниям на предприятиях мясоперерабатывающей промышленности. Препарат может быть использован и в ветеринарной практике.

Коли-бактериофаг — смесь бактериофагов, активных в отношении наиболее распространенных серологических групп кишечной палочки. Применяется для лечения и профилактики коли-энтеритов.

Бактериофаг протейный представляет большой интерес в связи с проблемой дисбактериоза, так как активен по отношению к бактериям рода *Proteus* (*P. vulgaris* и *P. mirabilis*), одному из высокоустойчивых к антибиотикам микроорганизмов, агрессивность которого выявляется при нарушениях нормального состава микроорганизмов. Может выпускаться в ассоциации с коли-фагом под названием коли-протейный бактериофаг.

Бактериофаг стафилококковый — фильтрат фаголизата стафилококков. Его применяют местно для лечения гнойных заболеваний — фурункулеза, гнойно-осложненных ран, абсцессов и др. При кишечных заболеваниях, связанных со стафилококком, бактериофаг вводится через рот или в клизмах подобно кишечным фагам.

Бактериофаг пиоцианеус (синегнойный) — фильтрат фаголизата *Pseudomonas aeruginosa*, специфически лизирующий соответствующую бактерию. Применение подобно стафилококковому.

### **29.3. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ, НОРМАЛИЗУЮЩИЕ МИКРОФЛОРУ**

Организм человека и окружающая его среда представляют единую экологическую систему, в которой большая физиологическая роль принадлежит микробам — симбионтам человека. Многочисленные внешние факторы оказывают определенное влияние на микрофлору человека, но состав ее относительно постоянен. Однако нарушения состава нормальной микрофлоры макроорганизма (дисбактериоз) могут возникать под влиянием различных факторов.

В повседневной жизни человека некоторое влияние на состав его микрофлоры оказывают такие факторы, как сезоны года, возраст, характер питания, изменение климатогеографических условий и т. д., но способность здорового организма к саморегуляции обеспечивает относительное восстановление нормального биоценоза.

Существенно повлияло на постоянную микрофлору человека широкое применение антибиотиков и других химиотерапевтических средств. Изменилось симбиотическое равновесие микрофлоры полости рта, кожи, кишечника. Особенно чутко на введение антибиотиков реагируют микроорганизмы кишечника. Кишечный дисбактериоз — наиболее ранний сигнал заболевания организма

при антибиотикотерапии. Основная причина развития заболеваний, связанных со сдвигами в составе нормальной микрофлоры (аутофлоры), состоит в нарушении механизмов иммунологического гомеостаза организма. Кроме того, антибиотикорезистентные микроорганизмы, заселяющие кишечник при дисбактериозе (атипичные кишечные палочки, стафилококки, дрожжи рода *Candida* и др.), отличаются от нормальной микрофлоры по обмену веществ и не способны выполнять многие важные физиологические функции, присущие нормальной микрофлоре.

Поэтому дисбактериоз — это сложный процесс, отягощающий многие заболевания или являющийся основным звеном в патогенезе. При этом могут наблюдаться различные клинические проявления стафилококковой, протейной, кандидозной и другой этиологии: сепсис, бактериемия без видимых входных ворот, дисфункция кишечника.

Общей чертой различных видов микроорганизмов, принимающих участие в развитии патологических процессов при дисбактериозе, является их малая чувствительность к антибиотикам, ибо они наиболее часто становятся возбудителями болезни именно на фоне применения данных лекарственных препаратов.

В связи с широко распространенными изменениями в микрофлоре кишечника и совершенно очевидной связью дисбактериоза с рядом патологических состояний формируются определенные контингенты больных, безуспешное лечение которых затягивается надолго, а общепринятые лекарственные препараты не способствуют нормализации состава микроорганизмов у этих больных.

В этих случаях в комплексе лечебных средств большое значение приобретает метод бактериотерапии — применение препаратов из живых микробов нормальной кишечной микрофлоры, получившее признание абсолютного большинства ученых.

### 29.3.1. Колибактерин

Сухой колибактерин представляет собой лиофилизированную живую культуру кишечной палочки *Escherichia coli* штамма М-17, расфасованную в ампулы, флаконы или таблетированную.

Действующее начало колибактерина — живые клетки названного штамма, обладающие антагонистической активностью в отношении широкого круга патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Основные этапы технологического процесса производства колибактерина складываются из работы со штаммом; в начале производственного цикла его восстанавливают из состояния анабиоза путем пассажей на жидких и твердых питательных средах.

Для накопления биомассы применяют казеиновые питательные среды с содержанием аминного азота в пределах 200—270 мг%, с добавлением 1,25—2,0% пищевого желатина.

Накопление биомассы ведут в реакторах при 37°C, в условиях

перемешивания и аэрации. Оптимальные значения рН среды в зависимости от используемого режима питания находятся в пределах 7,2—8,0. Продолжительность процесса выращивания культур составляет 6—7 ч. Получаемая культура содержит 35—40 млрд. живых бактерий в 1 мл. Суспензию перед замораживанием разливают в стеклянные ампулы или замораживают без предварительной фасовки (для изготовления таблеток).

При лиофилизации колибактерина к суспензии бактерий перед замораживанием добавляют 10% сахарозы. Обезвоживание замороженного субстрата производят в сублимационных камерных установках, обеспечивающих высокий вакуум (до  $5 \cdot 10^{-3}$  мм рт. ст.) и остаточную влажность конечного продукта на уровне 2—4%.

Для таблетирования и приготовления других неампулированных форм к сухому полуфабрикату добавляют лактозу (2%), тальк медицинский (до 2%), стеарат кальция или магния (до 1%).

Колибактерин в таблетках или других готовых лекарственных формах фасуют в стеклянные флаконы или иную упаковку, обеспечивающую сохранность препарата без доступа воздуха и влаги. Доза сухого колибактерина должна содержать не менее 10 млрд. живых микробных клеток.

Контроль колибактерина осуществляют поэтапно, в процессе производства полуфабриката и готовой продукции. Поскольку действующим началом колибактерина являются живые бактерии, основу контроля качества препарата составляют определение числа живых клеток в расчете на дозу и учет антагонистической активности к тест-штаммам возбудителей дизентерии Флекснера и Зонне. Кроме этого в схему контроля входит определение остаточной влажности (не более 4—5%), агглютинабельности культуры специфической антисывороткой, определение безвредности на лабораторных животных, контроль на отсутствие постоянных микроорганизмов.

Колибактерин применяют *per os* для лечения ряда кишечных заболеваний: 1) хронических колитов различной этиологии, в том числе постдизентерийных; 2) неспецифических язвенных колитов; 3) дисбактериозов, возникших в результате применения антибиотиков и сульфаниламидных препаратов. Кроме того, препарат применяется для санации реконвалесцентов при кишечных инфекциях.

Ряд авторов оценивают колибактерин как эффективное профилактическое средство. Противопоказаний для применения колибактерина нет.

### 29.3.2 Лактобактерин и бифидумбактерин

В последнее время встает вопрос о необходимости расширения бактериотерапии не только применением препаратов из сапрофитных колиформ, но и молочнокислых бактерий. Последние имеют ряд существенных преимуществ. Во-первых, бифидобак-

терии и лактобактерии — симбионты макроорганизма с первых дней жизни. Это дает возможность использовать их для лечения и профилактики у детей в самом раннем возрасте. Во-вторых, молочнокислые бактерии относятся к кислоторезистентным организмам. Это обеспечивает их лучшую выживаемость при пероральном применении.

Бифидумбактерин и лактобактерин представляют собой лиофилизированные культуры соответствующих молочнокислых бактерий, расфасованные в ампулы, флаконы или таблетированные.

Технология приготовления препаратов бифидо- и лактобактерина в принципе аналогична технологии приготовления колибактерина. Различия относятся к составу питательных сред и условиям культивирования в соответствии с физиологическими особенностями бактерий.

Для работы с производственным штаммом бифидобактерий (*Bifidobacterium bifidum*) и накопления биомассы используют питательные среды на основе печеночного бульона с добавлением хлорида натрия, пептона и лактозы. Для лиофилизации препарата применяют сахарозо-желатиновую смесь с добавлением обезжиренного молока (30—40 %). Доза сухого бифидумбактерина при выпуске содержит  $10^8$ — $10^9$  живых клеток бактерий. Флаконы с сухим бифидумбактерином содержат 5 доз.

Контроль готового препарата проводится на содержание живых микробных клеток, на отсутствие посторонних микроорганизмов, проверяется антагонистическая активность препарата по отношению к дизентерийным тест-штаммам Флекснера и Зонне.

Бифидумбактерин назначают детям и взрослым для лечения хронических колитов, кишечных расстройств невыясненной этиологии, дисбактериозов, возникших в результате применения антибиотиков. Особенно рекомендуется бифидумбактерин детям первого полугодия жизни.

Производственные штаммы молочнокислых бактерий (*Lactobacillus fermenti* и *L. plantarum*) обладают высокой антагонистической активностью в отношении возбудителей дизентерии, патогенных энтеробактерий и условно-патогенных микроорганизмов (гемолитического стафилококка, протей и др.). Антагонистическая активность, по-видимому, в большой степени связана с действием молочной кислоты, накапливающейся при сбраживании бактериями лактозы и других углеводов. Молочная кислота участвует в кальциевом обмене, переводя кальций пищи в усваиваемый макроорганизмом лактат кальция, способствуя профилактике рахита у детей. Молочнокислые бактерии участвуют в образовании витаминов и аминокислот, в том числе так называемых незаменимых, т. е. не синтезируемых организмом человека.

Выгодным отличием молочнокислых бактерий является устойчивость к антибиотикам. Это позволяет применять их с профилактической целью параллельно с антибиотикотерапией.

Выращиваются молочнокислые бактерии на питательных

средах, приготовленных на основе гидролизата молока, солодового экстракта или капустного отвара с добавлением 1,5% желатинны глубинным методом с перемешиванием, но без аэрации, при 37° С. Пробы из реактора берут под давлением азота. В процессе культивирования добавляют раствор глюкозы или лактозы. За 8—10 ч культивирования получают микробные взвеси, содержащие 10—15 млрд. живых бактерий в 1 мл.

Перед лиофилизацией в суспензию бактерий добавляют в качестве стабилизатора сахарозу, пептон и обрат молока в количестве 5—10%. Ампулы с сухим препаратом запаивают под вакуумом, флаконы укупоривают в атмосфере инертного газа. Одна доза сухого лактобактерина содержит 6—7 млрд. живых клеток бактерий. В ампулах может содержаться 1—3 дозы, во флаконах — до 20 доз.

При контроле готового препарата учитывают содержание живых лактобактерий и осуществляют бактериологический контроль его чистоты. Кроме того, препарат должен быть безвреден и иметь остаточную влажность не более 4%. Контролируется также антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

Микробные препараты, нормализующие нормальную микрофлору, в отличие от многих химиотерапевтических средств физиологичны и не дают никаких побочных явлений.

### *Глава 30*    **ПОЛУЧЕНИЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Интенсивное возделывание сельскохозяйственных культур обедняет почву азотом, отчуждаемым с урожаем. Однако бобовые не только не обедняют почву, а наоборот, повышают ее плодородие. Поэтому с давних времен в сельском хозяйстве практиковалось восстановление и улучшение почв путем выращивания на них бобовых растений, способных накапливать азот. Они не только обогащают почву азотом, доступным для других растений, но и дают корни, богатые белками. К. А. Тимирязев писал по этому поводу: «Едва ли в истории найдется много открытий, которые были бы таким благодеянием для человечества, как это включение клевера и вообще бобовых растений в севооборот, так паразитально увеличившие производительность труда земледельца». Разведение бобовых трав в России было начато основоположником отечественной научной агрономии А. Т. Болотовым (1738—1833). В 1820 г. было организовано Общество сельского хозяйства, пропагандирующее, в частности, травосеяние бобовых. Большой хозяйственный эффект возделывания бобовых явился стимулом познания причин повышения плодородия земель, занятых под эти культуры.

В 1838 г. Буссенго, проводя опыты с клевером и горохом, показал, что при выращивании этих растений на прокаленном



песке они накапливают азот. Источник его мог быть только один — атмосфера. В 1888 г. Г. Гельригелю и Г. Вильфарту удалось установить, что бобовые растения могут «питаться» атмосферным азотом. Впервые наличие бактерий в клубеньках на корнях бобовых отметили Лахман (1858) и Воронин (1866). Окончательно образование клубеньков под влиянием бактерий, осуществляющих азотфиксацию, доказал М. Бейеринк (1888). Он получил эти микроорганизмы в виде чистой культуры и назвал *Bacillus radicicola*.

Вскоре были выделены и другие азотфиксаторы. В настоящее время прокариотных микроорганизмов известно довольно много. Среди них есть и симбиотические и свободноживущие виды. Из них наибольшее значение для повышения урожая сельскохозяйственных культур имеет использование клубеньковых бактерий.

### 30.1. СВОЙСТВА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

В настоящее время азотфиксирующие бактерии, образующие клубеньки на корнях бобовых растений, относят к родам *Rhizobium*<sup>1</sup> и *Bradyrhizobium*. Видовые названия их соответствуют роду того растения, на корнях которого они образуют клубеньки. Например, *Rhizobium lupini* — бактерия, образующая клубеньки на корнях люпина, *R. trifolii* — на корнях клевера и т. д. Однако такое деление в какой-то степени условно, некоторые виды *Rhizobium* способны поселяться на корнях большого числа видов и даже разных родов бобовых растений.

У современных бобовых (~13 000 видов, 550 родов) растений образование клубеньков выявлено примерно у 1300 видов. Клубеньковые бактерии встречаются также в почве, но не всегда в количестве, достаточном для активного образования клубеньков на корнях тех или иных бобовых растений.

Клетки клубеньковых бактерий в молодых культурах обычно палочковидные (0,5—0,9×1,2—3,0 мкм). Но в некоторых условиях могут становиться овальными, кокковидными, а также грушевидными и разветвленными. Такие крупные, часто неправильные по форме клетки (бактероиды) обнаруживаются, как правило, в клубеньках.

Многие клубеньковые растения в молодом возрасте подвижны благодаря наличию перитрихально расположенных жгутиков. Грамотрицательные. В качестве запасного продукта образуют поли-β-гидроксibuтират. Размножаются делением. Подразделяются на быстрорастущие (бактерии гороха, клевера, люцерны, фасоли, донника, бобов) и медленно растущие (бактерии люпина, сои, арахиса, эспарцета).

Растут бактерии в чистых культурах на средах, содержащих углеводы или некоторые другие органические вещества. Некоторые штаммы способны также расти в автотрофных условиях в присутствии молекулярного водорода как источника энергии.

<sup>1</sup> От греческого *rhizo* — корень и *bio* — жизнь.

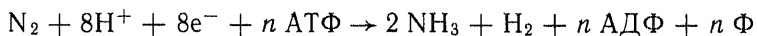
До недавнего времени считали, что все клубеньковые бактерии нуждаются для роста в наличии молекулярного кислорода, хотя способны развиваться в микроаэробных условиях. Но недавно обнаружено, что некоторые штаммы клубеньковых бактерий способны расти в анаэробных условиях в присутствии нитратов как акцепторов электронов.

Оптимальная температура для роста разных видов 25—30° С, оптимальное значение рН чаще всего 6,8—7,0.

Количество бактериальных клеток, необходимых для инфицирования одного растения, довольно велико (от 500 до 1 млн. на одно семя). Однако в ткани корня попадают лишь единичные клетки. Бактерия «узнает» своего хозяина при помощи особого гликопептида — лектина, расположенного на корневых волосках. При внедрении *Rhizobium* в корневые волоски образуются так называемые инфекционные нити, в которых находятся размножающиеся бактерии. Такие нити проникают в кору корня и достигают тетраплоидных клеток, после чего начинают формироваться клубеньки. В зрелом клубеньке на продольном срезе можно выделить четыре зоны тканевой дифференциации: кора, меристема, бактериоидная зона и сосудистая система. Меристема функционирует долго, даже во время некроза клубеньков. Бактериоидная зона занимает центральную часть клубенька (15—50% от его сухой биомассы), причем в начале формирования клубенька клетки находятся в обычной форме, а затем образуют бактериоиды, которые фиксируют молекулярный азот.

Появление клубеньков происходит во время развития первых настоящих листьев, и у однолетних растений функционируют они недолго — некроз начинается во время цветения растения. Часть бактериоидных клеток лизируется, другая попадает в почву в виде мелких кокков.

Фиксация молекулярного азота клубеньковыми бактериями, как и другими прокариотами, ведет к образованию аммиака, из которого затем синтезируются аминокислоты. Кроме того, процесс азотфиксации часто сопровождается выделением молекулярного водорода:



Многие клубеньковые бактерии содержат гидрогеназу, которая катализирует окисление  $\text{H}_2$ , в результате чего происходит его рециклизация. В образовании из молекулярного азота аммиака, а также молекулярного водорода участвует фермент нитрогеназа, состоящий из двух компонентов. Компонент I представляет собой железо- и молибденсодержащий белок, компонент II — железосодержащий белок. Нитрогеназа образуется и активна лишь в анаэробных условиях. В связи с этим аэробные азотфиксаторы должны тем или иным образом обеспечить такие условия для ее функционирования. У клубеньковых бактерий, находящихся в клубеньках, в этом участвует особый железосодержащий пигмент — леггемоглобин, который, как и гемогло-

бин крови, обратимо связывает молекулярный кислород. Образование леггемоглобина наблюдается только в клубеньках. Из практики использования клубеньковых бактерий известно, что чем краснее клубеньки (в результате наличия леггемоглобина), тем интенсивнее идет фиксация азота.

Ранее считали, что клубеньковые бактерии способны фиксировать молекулярный азот, лишь находясь в клубеньках в форме бактероидов. Но в последние годы показана возможность фиксации  $N_2$  и чистыми культурами некоторых из этих микроорганизмов в условиях низкого парциального давления  $O_2$ .

### 30.2. РОЛЬ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ В АЗОТНОМ БАЛАНСЕ ПОЧВЫ

Сложность азотного питания растений сводится к тому, что запасы доступных для них соединений этого элемента в почве незначительны. При благоприятных условиях естественное плодородие может обеспечить на дерново-подзолистых почвах урожаи зерновых культур в размере 12—15 ц/га, на черноземах 18—25 ц/га. Однако интенсивная эксплуатация почвы, связанная с постоянным ее истощением, приводит к неизбежному снижению плодородия. По имеющимся расчетам с урожаем зерновых ежегодно выносятся из разных почв 50—90 кг азота на каждые 10 центнеров зерна. Улучшение азотного баланса почвы может быть достигнуто внесением минеральных удобрений. Но даже при условии, что их количество будет постоянно возрастать, нельзя сбрасывать со счета такой дешевый источник азота, как  $N_2$ .

Азотфиксаторы создают естественное плодородие почвы и человечество до появления химически связанного азота при возделывании хлебов или использовании пастбищ могло рассчитывать на пополнение этого важнейшего элемента только в результате деятельности микроорганизмов. И в настоящее время значение азотфиксаторов в обогащении почв соединениями азота весьма существенно. Е. Н. Мишустин (1985) приводит следующие источники поступления азота в пашню (млн. т/год):

Минеральные удобрения . . . . .	6,5
Органические удобрения . . . . .	4,4
Корневые и пожнивные остатки бобовых . . . . .	1,4
Свободноживущие азотфиксаторы . . . . .	3,5
Атмосферные осадки . . . . .	1,3
Семена . . . . .	0,9
<hr/>	
Итого ...	18,0

Из этого количества усваивается около 9,0—12,0 млн. т.

Бобовые, поставляющие в почву около 1,4 млн. т азота, на самом деле связывает этот элемент в значительно больших величинах, но он переходит в снимаемый урожай. Приведем данные об уровне фиксации атмосферного азота различными бобовыми культурами, имеющими клубеньки, в год (кг/га):

Люцерна . . . . .	200—220
Клевер . . . . .	150—200
Люпин . . . . .	150—170
Соя . . . . .	50—60
Горох . . . . .	80
Бобы . . . . .	100
Вика . . . . .	90
Фасоль . . . . .	40
Чечевица . . . . .	110
Пастбища + бобовые . . . . .	120

При возделывании бобовых применять минеральные азотистые удобрения нецелесообразно, исключая небольшие стартовые дозы (25—30 кг/га), необходимые растению в начальной фазе роста. Так называемый «биологический азот» ассимилируется полностью в отличие от «минерального», последний по своей природе эфемерен из-за вымывания, денитрификации и улетучивания (в виде  $N_2$ ,  $N_2O$ ,  $NO$ ). Эффективное усвоение его не превышает 50%. Кроме того, биологический азот не загрязняет окружающую среду вредными веществами.

### 30.3. ПРЕПАРАТЫ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Сразу после открытия явления симбиотрофной фиксации молекулярного азота возникла мысль использовать клубеньковые бактерии для практических целей. Сначала для этого применяли почву, на которой выращивались бобовые культуры. Такую почву разбрасывали (2—4 т/га) на площадях, предназначенных для посева бобовых, где они ранее не выращивались. Более эффективным оказался другой метод: с корней бобовых собирали клубеньки, подсушивали и тонко размельчали. Таким материалом (с добавлением талька, бентонита) обрабатывали семена бобовых растений перед посевом. В препаратах содержались различные по азотфиксирующей активности бактерии, не считая посторонних микроорганизмов. В 1896 г. в Германии Ноббе и Гильтнер изготовили коммерческий препарат, содержащий смесь клубеньковых бактерий для девятнадцати видов бобовых. Препарат, получивший название «нитрагин», которое сохранилось до настоящего времени, повышал урожайность бобовых, что привлекло к нему внимание во всем мире.

Препараты клубеньковых бактерий стали готовить в США (1986), Венгрии (1898), Англии (1906). В России опыты с препаратами клубеньковых бактерий начали проводить Л. И. Будинов (1907), и затем И. А. Макринов (1915). После Великой Октябрьской социалистической революции работы по нитрагинизации значительно расширились. Использование нитрагина в начале не всегда давало положительный результат, но после улучшения качества препарата его применение стало оказывать существенное влияние на урожай.

Для приготовления препаратов клубеньковых бактерий их можно выращивать на средах, представляющих собой отвары

бобовых культур — зерна гороха, фасоли, безалкогольного люпина и других растений. Дополнительное внесение углеводов — глюкозы, сахарозы или иных соединений углерода, например маннита, увеличивает рост культур. Подобного рода агаризованные среды используются для получения препаратов клубеньковых бактерий до настоящего времени (Болгария, Румыния). Но промышленное производство нитрагина такой формы неоправданно из-за дефицита и высокой стоимости агара.

Относительно хорошие результаты были получены при использовании в качестве субстрата-носителя почвы, обычно садовой. Стерильную почву, размещенную в молочных бутылках, флаконах и в других сосудах, инокулируют жидкой культурой клубеньковых бактерий. Но высоких титров бактерий в почвенном нитрагине не удается достичь. Весьма заманчивой представлялась идея получения сухого нитрагина путем непосредственного высушивания жидкой культуры бактерий. На разработку такого вида нитрагина было затрачено много усилий, но результаты оказались негативными. Клубеньковые бактерии, как и другие неспоровые микроорганизмы, очень чувствительны к потере воды и, несмотря на добавку к культуре различных защитных веществ, щадящие методы высушивания (лиофилизации), высокие титры бактерий в препарате сохранить не удалось.

В результате многолетних исследований показано, что препараты клубеньковых бактерий эффективны только в активном состоянии. Для этого культура должна быть обеспечена влагой и питательными веществами, прежде всего углеводами, расти при оптимальной температуре и обеспечении газообмена. Эти условия могут быть легко выполнены при подборе подходящего субстрата-носителя — материала, отличающегося высокой влагоемкостью, содержащего большое количество органического вещества, доступного, дешевого и, по возможности, стандартного. Таким требованиям в наибольшей степени соответствует торф. Он отличается также весьма высокой удельной площадью поверхности (около 300 м<sup>2</sup>/г), что позволяет «посадить» на него большое количество микроорганизмов. Одним из недостатков торфа в качестве субстрата-носителя является его нестандартность; нередко в нем (например, в сфагновом) содержатся токсические вещества, ингибирующие рост клубеньковых бактерий. Поэтому образцы торфа предварительно должны быть испытаны на пригодность для производства препарата путем выращивания на них клубеньковых бактерий.

В Советском Союзе торфяной препарат клубеньковых бактерий впервые был приготовлен в 30-х годах (Израильский и др., 1933), но его промышленное производство тогда не было организовано. В странах, не располагающих запасами торфа, делались попытки использовать в качестве носителей другие материалы — активированный уголь, бентонит, цеолиты, лигнит, навоз или их смеси. Однако все они оказались менее благоприятными для выращивания клубеньковых бактерий, чем торф. Сей-

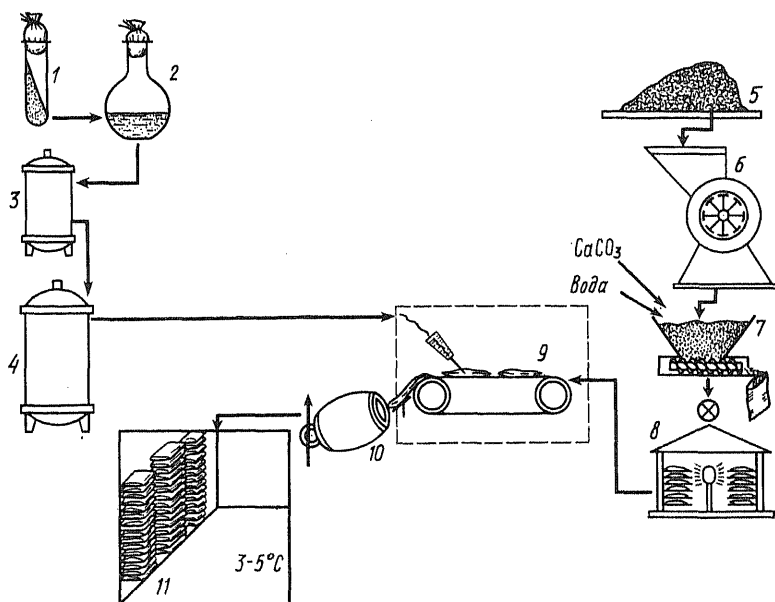


Рис. 30.1. Схема производства ризоторфина:

1 — косяк, 2 — колба, 3 — ферментер (посевной), 4 — ферментер (рабочий); 5 — торф, 6 — установка для размола, 7 — аппарат фасовки, 8 — камера гамма-стерилизации, 9 — инокулирование, 10 — перемешивание, 11 — термосклад

час торфяная форма препаратов клубеньковых бактерий является доминирующей во всем мире.

В нашей стране выпускается торфяной препарат клубеньковых бактерий с коммерческим названием «ризоторфин». Технология его производства разработана во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии ВАСХНИЛ. Принципиальная схема технологии получения ризоторфина представлена на рис. 30.1. Процесс включает несколько стадий.

1. Выращивание и хранение культуры клубеньковых бактерий.
2. Получение жидкой культуры (инокулята).
3. Подготовка торфа.
4. Стерилизация.
5. Инокуляция и хранение препарата.
6. Контроль производства.

### 3.1. Выращивание и хранение клубеньковых бактерий

Для выращивания клубеньковых бактерий, как уже отмечалось, используют растительные экстракты. Как правило, такие экстракты дополнительно обогащают сахарами или маннитом.

Быстрорастущие клубеньковые бактерии (БКБ) размножают и хранят в среде (г/л):

Отвар гороха . . . . .	100
Сахароза . . . . .	10—20
Агар . . . . .	20
Начальное значение рН . . . . .	6,8

Гороховый отвар готовят следующим образом: 100 г гороха тщательно промывают и заливают 1 л водопроводной воды, кипятят 30—40 мин, фильтруют и доводят до 1 л. Затем добавляют сахарозу, агар и стерилизуют при  $(0,8—1,0) \cdot 10^5$  Па (0,8—1,0 атм) в течение 30 мин.

Для медленнорастущих клубеньковых бактерий (МКБ) среды готовят аналогичным образом, но в качестве дополнительного источника углерода используют маннит, глюкозу или смесь сахарозы с глюкозой (1:1). Пробирки со скошенным агаром засевают соответствующим штаммом и выдерживают при 28—30°C 4—10 сут. Выросшие культуры хранят в холодильнике (3—5°C) и по мере необходимости используют для приготовления рабочей культуры (пробирки).

### 30.3.2. Получение жидкой культуры (инокулята)

Жидкую культуру клубеньковых бактерий получают выращиванием в качалочных колбах или 5-литровых бутылках. Колба объемом 750 мл содержит 200 мл среды, бутылка — 2 л. Среда состоит из отвара гороха, фасоли или безалкогольного люпина (готовится, как описано выше), в которую добавляют глюкозу (для МКБ) или сахарозу (для БКБ). Среда готовится на водном растворе солей (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 0,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  — 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,2;  $\text{CaCO}_3$  (стерильный) — 1,0; значение рН после стерилизации для БКБ 6,8—7,0, для МКБ 6,3—6,5. Для БКБ отвар гороха можно заменять кукурузным экстрактом — 7—10 г/л. Его предварительно разбавляют водой в 2—5 раз, выдерживают 18—24 ч при 35—37°C и стерилизуют при давлении  $2 \cdot 10^5$  Па (2 атм) 1 ч. Мел также стерилизуют при этом режиме и добавляют его навеску после доведения значения рН в среде.

Бактериями с одного косяка засевают одну колбу. Бутылка засеивается 3—5% жидкой культуры, полученной в колбе. Время выращивания для БКБ 48 ч, для МКБ 72—96 ч. При правильно выполненном режиме культивирования в колбах и бутылках получают по 8—15 млрд. клеток в 1 мл.

При выращивании клубеньковых бактерий в ферментере используют указанные выше рабочие среды; можно исключить приготовление отвара бобовых, загружая ферментер соответствующим количеством муки гороха. БКБ в ферментере выращивают 24—36 ч при аэрации 0,7—1,5 об/об/мин; МКБ культивируют

36—48 ч при аэрации 0,3—1,0 об/об/мин. Температура 28—30°C. Интенсивность аэрации определяется типом ферментера и особенностями штамма бактерий. В ферментер необходимо добавление пеногасителя. Получают титры клубеньковых бактерий не менее 5 млрд/мл. В случае получения более высоких титров допускается разбавление культуры холодной стерильной водой до плотности клеток 5 млрд/мл. Полученную таким образом культуру охлаждают до 10—15°C и используют для инокуляции торфа.

### 30.3.3. Подготовка торфа

Для производства ризоторфина используют преимущественно кислые или слабокислые торфа (рН 3,0—6,0). Нейтральные и слабощелочные торфа подходят в меньшей степени из-за высокой контаминации и накопления в них метаболитов микроорганизмов, которые не всегда разрушаются при стерилизации и могут ингибировать рост клубеньковых бактерий. Наиболее подходящими являются древесно-осоковые и осоковые торфа. Отсутствие методов предварительной экспресс-оценки пригодности торфов для производства ризоторфина вынуждает, как уже отмечалось выше, использовать «биологическую» пробу — изготовление препаратов на испытуемом торфе и хранение такого препарата в течение 3—6 месяцев (с подсчетом числа клубеньковых бактерий).

Отобранный торф освобождается от корней, камней и других посторонних материалов, после чего высушивается до 25—30% влажности. Сухой торф размалывают так, чтобы размер частиц не превышал 0,1 мм. Высокая дисперсность определяет в значительной мере «прилипаемость» препарата к инокулированным семенам. Размолотый торф загружают в смеситель, увлажняют до 35—40% и прибавляют такое количество мела (предварительная проба), чтобы довести рН до 6,8—7,0, тщательно перемешивают, расфасовывают в полиэтиленовые пакеты по 150—160 г и запаивают; коэффициент заполнения по объему пакета 40—50%. Толщина полиэтиленовой пленки не должна превышать 0,1 мм (оптимум 0,06—0,08 мм) для сохранения возможности газообмена. Для таких пакетов предпочтительнее использовать полиэтилен низкого давления. Пакеты с торфом подвергают стерилизации.

### 30.3.4. Стерилизация

Обычно применяемая в микробиологии термическая стерилизация оказалась неприемлемой для торфа прежде всего из-за его низкой теплопроводности, обусловленной высокодисперсной структурой и малой объемной массой. При термической стерилизации таких природных материалов, как почва, торф и т. п., в них накапливаются вещества, токсичные для растений и микроорганизмов.



Анализ возможных способов стерилизации торфа позволил прийти к выводу, что единственно приемлемым методом может быть радиационный. Предпочтение отдано гамма-излучению как более удобному в эксплуатации по сравнению со стерилизацией ускоренными электронами.

Облучение торфа, упакованного в полиэтиленовые пакеты, производится на промышленной установке дозой 2,5 Мрад (мощность установки 340 рад/с). Такая доза обеспечивает практически полную стерильность субстрата-носителя.

Радиационный способ стерилизации был успешно использован при лабораторных исследованиях. Он оказался также весьма удобным и недорогим при промышленном выпуске ризоторфина. В настоящее время завод, построенный для производства ризоторфина, оснащен мощной гамма-установкой, позволяющей стерилизовать около 2 тыс. т торфа в год. Способ радиационной стерилизации может оказаться перспективным и для других отраслей промышленной микробиологии.

### **30.3.5. Инокуляция и хранение препаратов**

В стерильный пакет с торфом вносят жидкий инокулюм клубеньковых бактерий. Эта операция выполняется инъекцией полый иглой (диаметр 5—8 мм) под давлением около 200—300 мм вод. ст. Давление и относительно большой диаметр иглы необходимы для быстрого введения инокулюма — 50—60 мл на каждые 140—150 г торфа (одна га/порция). Процесс может быть автоматизирован. Отверстие в пакете от укола заклеивается липкой лентой. Инокуляцию ведут в стерильном боксе, соблюдая соответствующие меры предосторожности, исключающие попадание в препарат посторонних микроорганизмов. Норму засева выбирают так, чтобы исходный титр бактерий в инокулированном торфе составлял 0,5—1 млрд. клеток на 1 г препарата, влажность 55—60%. В торфе имеется небольшое количество углеводов, но этого количества недостаточно для получения высоких титров клубеньковых бактерий в готовом препарате. Поэтому до инокуляции в жидкую культуру вносят дополнительно стерильные растворы углеводов (мелассу, декстрин, молочную сыворотку), чтобы их количество составляло в итоге около 3% к массе сухого торфа. Для большинства клубеньковых бактерий лучшим оказалось внесение декстрина, хотя при их росте на жидких и агаризованных средах он не используется.

Инокулированные пакеты загружаются во вращающийся барабан на 3—5 мин для тщательного перемешивания торфа с жидким инокулюмом. В случае, если необходимо быстро получить готовый препарат, инокулированные пакеты помещают на 4—6 сут в термостат при 20—21°C; если они предназначены для длительного хранения (гарантийный срок 6 мес), то препараты для сои, люпина и других МКБ сразу ставят на хранение при 12—15°C, а препараты БКБ — при 5—10°C.

### 30.3.6. Контроль производства

Все этапы технологического процесса приготовления ризоторфина находятся под тщательным микробиологическим контролем.

Жидкие стерильные питательные среды в колбах, бутылках и пробы из ферментеров выдерживают при 35—37°C в течение 3 сут и из них делают высевы на МПА с 0,5 % глюкозы и 0,5 % сахарозы. Высевы помещают в термостаты при 27 и 37°C и просматривают на 3-и сут. Аналогичным образом поступают с жидкими культурами. Клубеньковые бактерии (за исключением бактерий люцерны и донника) не растут на мясопептонных средах. Определение чистоты культуры производят также высевом на молоко с лакмуsom.

В жидкой культуре (посевная и рабочая из ферментеров) определяют титр клубеньковых бактерий: а) методом подсчета в камере Горяева; б) измерением плотности по отношению к стандарту с известной концентрацией клеток или методом серийных разведений ( $10^{16}$ — $10^8$ ) с последующим высевом на чашки Петри с гороховым отваром.

Стерилизованный торф проверяют на чистоту из водной вытяжки 1:10 (90 мл стерильной воды и 10 г стерильного торфа), делают высевы на чашки Петри с МПА + 0,5% глюкозы + 0,5% сахарозы, которые выдерживают 3 сут отдельно при 27 и 37°C, после чего подсчитывают количество бактерий. Не допускается наличие более трех колоний посторонних микроорганизмов на чашке при разведении  $10^7$ .

В ризоторфине определяют количество клубеньковых бактерий и посторонних микроорганизмов методом серийных разведений ( $10^8$ — $10^9$ ) как в свежеприготовленном, так и периодически во время хранения, а также перед отправкой потребителям. Для учета количества БКБ высевы производятся на чашки Петри с гороховым отваром + 1% сахарозы, МКБ — с гороховым агаром + 0,5% глюкозы и 0,5% сахарозы. Количество колоний БКБ учитывают на 3—4-е сут, МКБ — на 8—10-е сут. Количество посторонних микроорганизмов в ризоторфине определяют высевом на чашки Петри с МПА + 0,5% глюкозы + 0,5% сахарозы, пробы в разведении  $10^6$ . Высевы выдерживают при 25 и 37°C в течение 3 сут, после чего учитывают количество выросших колоний микроорганизмов.

Содержание клеток клубеньковых бактерий в ризоторфине через 6 мес после его изготовления должно быть не ниже  $2,5 \times 10^9$ , а посторонних микроорганизмов — не более 1% от числа клубеньковых бактерий. При правильном ведении технологического процесса их титры достигают обычно  $5$ — $8 \cdot 10^9$ .

### 30.4. ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Наиболее распространенный метод инокуляции бобовых растений — предпосевная обработка семян препаратами клубеньковых бактерий. Для этого семена увлажняют 2,0—2,5% воды

(от их массы), прибавляют ризоторфин и тщательно перемешивают вручную (перелопачивание) или в машинах, предназначенных для протравливания семян. Расход ризоторфина — 200 г на гектарную норму любых семян бобовых. Обработку проводят в день посева. Иногда применяют другой способ инокуляции: ризоторфин суспендируют в соответствующем количестве воды и этой суспензией обрабатывают семена. Поскольку по техническим условиям в ризоторфине должно содержаться не менее 2,5 млрд./г клеток клубеньковых бактерий, на каждое семя наносится их в следующем количестве: горох — 0,3 млн.; соя — 0,5 млн.; клевер, люцерна — 0,06 млн. Указанная величина определяется также числом семян, высеваемых на гектар.

Высокая степень исходной инокуляции определяет большую вероятность попадания клубеньковых бактерий в зону расположения корня. Практика применения ризоторфина показывает, что при прочих равных условиях, количество фиксированного азота пропорционально количеству бактерий, попадающих на корень. При этом отмечается, в общем, низкий коэффициент собственно инокуляции корня по отношению к числу наносимых на семя бактерий. Это определяется разными причинами. В оболочке семян многих видов или сортов бобовых содержатся вещества, главным образом фенольной природы, оказывающие ингибирующее действие на клубеньковые бактерии. Эпифитные микроорганизмы, особенно актиномицеты, псевдомонады, также снижают их число. При прорастании семян большинства бобовых происходит «вынос» семядолей вместе с инокулятом на поверхность почвы, что ведет к потере по меньшей мере половины клеток бактерий.

Прорастание семян в относительно сухой почве приводит к массовой гибели клубеньковых бактерий. «Противостоять» всем этим причинам может только очень большое число клеток, взятых для инокуляции.

В целом можно констатировать, что инокуляция семян с биологической точки зрения прием неудовлетворительный, но подкупающая простота ее выполнения определила повсеместное использование именно этого метода. Предпринимались попытки применения других способов инокуляции — обработка корней проростков, нанесение культуры бактерий на цветки бобовых, внесение больших количеств препаратов в почву. Удобной формой оказался гранулированный препарат, вносимый в почву вместе с семенами, но расход такого препарата достигает нескольких десятков кг/га, что экономически не всегда оправдано. В последние годы разрабатывается метод внесения суспензии клубеньковых бактерий в почву глубже расположения высеваемых семян. Для этого необходимы особые конструкции сеялок, оснащенные баками, дополнительными сошниками и другими приспособлениями.

Многочисленные опытные данные, а также результаты широкого использования ризоторфина при возделывании бобовых

культур в различных регионах страны показали его высокую биологическую и хозяйственную эффективность:

Культура	Прибавка урожаю, ц/га
Соя, зерно . . . . .	2,5—3,0
Горох, зерно . . . . .	1,0—1,5
Люпин, зерно . . . . .	1,0—1,5
Люцерна, клевер, сено . . . . .	5,0—10,0

Таким образом, ризоторфин оказался доступным и дешевым средством повышения урожайности бобовых, увеличения сбора кормового и пищевого белка.

### 30.5. ДРУГИЕ АЗОТФИКСАТОРЫ

В богатых органическим веществом, хорошо дренированных и увлажненных почвах значительное место среди микроорганизмов занимает азотобактер, способный активно фиксировать молекулярный азот. Делались попытки применить культуры этих свободноживущих бактерий в качестве «землеудобрительных» препаратов. Но многочисленные исследования, проведенные с азотобактером, показали его низкую эффективность в качестве азотфиксатора. Тем не менее в некоторых случаях при выращивании овощных культур — салата, томатов, огурцов удавалось получить значительный эффект. Благотворное влияние азотобактера на растения в основном определяется образованием биологически активных веществ — антибиотиков, стимуляторов роста, витаминов. Жидкой культурой азотобактера обрабатывают корни рассады указанных растений. Но промышленной технологии получения препаратов этого микроорганизма не существует.

Большой интерес вызывают так называемые ассоциативные азотфиксаторы. В последние годы эта группа микроорганизмов подвергается всестороннему изучению, делаются попытки получения на их основе препаратов для повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Наиболее интересны представители этих азотфиксаторов — бактерии рода *Azospirillum*, обитающие в ризоплане или гистосфере корней (иногда на зеленых частях растений). Именно на этих участках корней происходит интенсивная фиксация азота. Фиксация азота в хозяйственно-значимых величинах имеет место в ассоциации азоспирилл с  $C_4$ -растениями — кукурузой, сахарным тростником, просом.

Во Вьетнаме и некоторых других южных странах в качестве зеленого удобрения используют водный папоротник азолла (*Azolla*), в полостях листьев которого обитает азотфиксирующая цианобактерия *Anabaena azollae*. Такой симбиотический комплекс усваивает молекулярный азот весьма интенсивно. Азоллу выращивают в особых прудах и вывозят на рисовые поля, что дает существенную прибавку урожая.

Интенсивно ведется также изучение свободноживущих азотфиксирующих цианобактерий в целях их использования для обогащения почв соединениями азота.

Показана принципиальная возможность получать с помощью азотфиксирующих цианобактерий из  $N_2$  аммиак в промышленных условиях. В этих же целях могут быть использованы фототрофные пурпурные бактерии, многие из которых, как и цианобактерии, способны к фиксации молекулярного азота в результате конверсии энергии света.

Не исключено, что в будущем такой способ производства аммиака заменит химическое получение его из  $N_2$  и  $H_2$ ; химический способ требует больших энергетических затрат.

Таким образом, применение препаратов азотфиксирующих микроорганизмов рассматривается как реальный способ обеспечения растений азотом, обладающий преимуществами хозяйственного, экологического и социального характера по сравнению с традиционным использованием азотных минеральных удобрений.

### *Глава 31*    **ПРЕПАРАТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРОТИВ ЖИВОТНЫХ — ВРЕДИТЕЛЕЙ РАСТЕНИЙ**

Проблема защиты культурных растений и полезных животных от вредителей и болезней возникла одновременно с возникновением растениеводства и животноводства. Сначала это были примитивные приемы защиты, как и само земледелие. Использовались различные физические и механические средства отлова и истребления вредных животных (разнообразные ловушки, ловчие ямы, каналы, смывы и затопливания водой, ручной сбор и др.). Затем человек научился использовать против животных — вредителей растений таких хищных животных, как собаки, кошки, дикие и домашние птицы.

В последующем по мере совершенствования растениеводства и животноводства совершенствовались и способы их защиты от вредителей и болезней. Появились различные химические средства истребления насекомых и грызунов, получаемые главным образом из растений (древесная зола, растительные запахи, отвары, настои и др.). Химический метод защиты особенно интенсивно начали внедрять в практику сельскохозяйственного производства в период бурного развития химии. Появились многочисленные и разнообразные вещества химического синтеза, так называемые пестициды<sup>1</sup>, которые постепенно заняли главенствующее место в защите растений и животных от вредителей, болезней и сорняков. Массированное и часто неконтролируемое

---

<sup>1</sup> Пестицидами называют ядовитые вещества, используемые для борьбы с вредителями, болезнями и сорняками.

применение таких мощных средств защиты вызвало ряд серьезных отрицательных последствий. В первую очередь пестициды вступили в явное противоречие с глобальной проблемой охраны окружающей среды. Широкое применение пестицидов привело к загрязнению почв и водоемов. Известно, что при современных способах применения химических пестицидов лишь небольшая их часть (не более 10%) достигает вредного организма и действует на него. Другая же, более значительная часть пестицидов попадает мимо цели, а точнее попадает в непредназначенную цель — вызывает гибель многих, в том числе полезных организмов, нарушая тем самым веками сложившиеся в природе биоценотические связи и подавляя деятельность природных регулирующих факторов. Кроме того, пестициды, накапливаясь в почве и водоемах, попадают затем в организмы растений и животных, а через них — в организм человека, вызывая различные недуги. Вторым существенным недостатком, выявившимся после широкого применения пестицидов, оказалось постепенное снижение, а иногда и полная потеря их эффективности. Дело в том, что многие вредные организмы (микробы-патогены, насекомые, грызуны) в результате постоянного контакта с пестицидами приобретают или условные оборонительные рефлексы (грызуны, например, распознают отравленные приманки и не поедают их), или среди них формируются устойчивые к пестицидам популяции (ДДТ-устойчивые мухи, комары и т. п.). По данным ФАО, в мире уже зарегистрировано около 300 видов вредителей с повышенной приобретенной устойчивостью к пестицидам. Последнее обстоятельство вынуждает учащать обработку пестицидами или увеличивать их дозы, что в еще большей степени ведет к загрязнению окружающей среды.

Эти обстоятельства вызвали необходимость поиска и разработки других средств и приемов защиты, не причиняющих вреда природе и человеку. К ним относятся агротехнические, селекционно-генетические и биологические, в том числе микробиологические средства.

В настоящее время наиболее перспективным направлением решения проблем защиты растений считается рациональное сочетание различных методов с максимальным использованием природных сил, в первую очередь микроорганизмов, хищников и энтомофагов. Такой экологический подход называется «интегрированная защита растений». В разработке этой системы значительная роль принадлежит микробиологическому методу как одному из основных составных частей интегрированной защиты.

Насекомые и грызуны, подобно другим животным, подвержены инфекционным болезням, возбудителями которых являются микроорганизмы самых различных групп: бактерии, грибы, простейшие, а также вирусы. Все эти факты были известны человеку еще во времена Аристотеля (384—322 гг. до н. э.), когда происходило интенсивное одомашнивание пчел и тутового шелкопряда,

сопровождающееся нередко массовым заболеванием этих насекомых. Этот период можно считать началом зарождения так называемого микробиологического метода борьбы с насекомыми и грызунами. Однако научную основу и практическое воплощение этот метод приобрел после специальных исследований двух крупнейших биологов второй половины прошлого века — Л. Пастера и И. И. Мечникова. Пастер (1888) для борьбы с дикими кроликами в Австралии предложил использовать бактерию возбудителя куриной холеры, предварительно испытав этот прием во Франции. Мечников вел аналогичные эксперименты с другим вредным видом грызунов — сусликом и предложил испытать указанную бактерию против этого вредителя в западной части Украины. Еще раньше Мечников, изучая болезни хлебного жука, выделил возбудителя этой болезни — мускардинный гриб (*Metarrisium anisopliae*) и предложил применять его для борьбы с жуком — вредителем злаковых. Следует отметить, что указанный гриб и в наше время используется в некоторых странах (СССР, США) для изготовления препаратов, применяемых против разных видов насекомых.

После Пастера и Мечникова развитию и совершенствованию микробиологического метода защиты растений способствовали: в нашей стране — Н. Ф. Гамалея, Б. Л. Исаченко, С. К. Метальников, И. М. Красильщик, В. П. Поспелов, М. И. Прохоров, Е. В. Талалаев и др.; за рубежом — Г. Уайт, А. Пейо, д'Эрелль, Р. Глезер, Э. Штейнхауз, К. Ваго и др.

В настоящее время большая армия ученых как в нашей стране, так и за рубежом ведет исследования по этой проблеме. Выделено много микроорганизмов, патогенных для грызунов и насекомых, и на их основе разработаны и предложены для производства микробные препараты. Многие из предложенных препаратов приняты промышленностью к массовому производству. Другая часть микробных препаратов производится пока лабораторным способом на местах применения (иногда в значительных масштабах).

Для изготовления таких препаратов в качестве продуцентов используют бактерии, грибы, простейшие вирусы. Кроме микроорганизмов применяют гельминты. Разумеется, что технология производства препаратов также разнообразна, она разрабатывается с учетом физиологических и биохимических особенностей микробов-продуцентов и целевых назначений. Имеется ряд основных требований, предъявляемых к микробным препаратам, а именно: селективность (избирательность) и высокая эффективность действия, безопасность для человека, полезной флоры и фауны, удобство в применении и производстве, длительная (не менее одного года) сохранность ценных свойств препарата и его микроба-продуцента, хорошая смачиваемость, если это порошкообразный препарат и стабильность его суспензии, прилипаемость к растению, длительная удерживаемость и сохранность на нем.

В мире создано около 50 микробных препаратов (не считая

антибиотиков), предназначенных для защиты растений и животных от насекомых и грызунов. Большая часть из них производится на основе споровых энтомопатогенных бактерий.

### 31.1. МИКРОБНЫЕ И ВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ПРОТИВ НАСЕКОМЫХ

#### 31.1.1. Бактерии

Бактерии — самая большая и распространенная группа облигатных и факультативных энтомопатогенов. Из этой группы наибольший интерес представляют споровые бактерии, а из них *Bacillus thuringiensis*. Впервые эта бактерия была обнаружена Пастером в 60-х годах прошлого века у больных гусениц тутового шелкопряда. Он ее описал как «бактерию с необыкновенными ядрами», вызывающую паралич у гусениц, и присвоил название *Bacillus bombicis*. Теперь понятно, что это были не ядра, а белковые кристаллы эндотоксина. В 1902 г. японский ученый Ишивата выделил аналогичную бактерию из больных гусениц тутового шелкопряда и назвал ее *Bacillus sotto*. В 1911 г. Берлинер подробно описал эту бактерию и назвал ее *Bacillus thuringiensis* Berliner по названию провинции Тюрингии (в Германии), где она была выделена из мельничной огневки (*Ephestia kuchiella*). В дальнейшем было выделено большое количество штаммов этой бактерии, отличающихся от типового штамма некоторыми свойствами. Понадобилось упорядочить номенклатуру и идентификацию этих штаммов. Было предложено много схем идентификации, но принята схема французских ученых Де Баржак и Бонфуа из Института Пастера. В основу этой схемы заложены биохимические и серологические свойства. К настоящему времени выделено и включено в эту схему более 20 вариантов серотипов *Bac. thuringiensis*, отличающихся между собой не только таксономическими показателями, но и энтомоцидностью.

Эта бацилла, как и ряд других энтомопатогенных бактерий, относится к семейству Bacillaceae. Род *Bacillus* объединяет палочковидные, спорообразующие грамположительные виды, большинство из которых подвижны (имеют жгутики). Включает строгих и факультативных анаэробов. Многие распространены в почве. *Bac. thuringiensis* по своим свойствам близка к *Bac. cereus*, поэтому их объединяют в одну группу. Растет на искусственных средах и внутри насекомых.

Интерес к *Bac. thuringiensis* с каждым годом возрастает, так как бактерия обладает многими ценными свойствами: легко размножается, синхронно спорулирует на многих питательных средах; при завершении вегетативного роста образует не только споры, но и параспоральное тело — кристаллический эндотоксин — основное оружие поражения насекомых. Некоторые разновидности этой бактерии, помимо кристаллического эндотоксина, выделяют в среду культивирования термостабильный  $\beta$ -экзотоксин



и ферменты, токсичные для насекомых. Споры бактерии легко и устойчиво хранятся при разных условиях. Микроб технологичен, т. е. выдерживает различные технологические манипуляции: сепарацию, вакуум-выпаривание, различные способы сушки, смешивание с наполнителями и др. В высушенном состоянии готовый препарат хорошо хранится в течение года, не теряя своих первоначальных свойств. Все эти качества *Bac. thuringiensis* выдвинули ее на первое место в арсенале средств защиты растений от вредных насекомых. В мире уже создано около 20 промышленных форм препаратов, в основе которых содержится та или иная разновидность *Bac. thuringiensis*. Только в нашей стране таких препаратов разработано более 10.

**Энтобактерин.** Первый из отечественных препаратов, изготавливаемый промышленностью в виде порошка на основе *Bac. thuringiensis* var. *dalleriae*, получил название энтобактерин. Препарат содержит споры в количестве 30 млрд./г, столько же кристаллического эндотоксина и наполнители. Эффективен в борьбе с многими видами чешуекрылых насекомых: капустной и репной белянками, капустной молью, луговым мотыльком, американской белой бабочкой, яблонной и плодовой молями, пяденицей, боярышницей, кистевостом, шелкопрядом и др. Препарат кишечного действия, попадая с кормом в организм гусениц, энтобактерин вызывает сначала интоксикацию и паралич насекомого, обусловленные действием эндотоксина, который к тому же нарушает целостность кишечного тракта, затем споры проникают в гемолимфу, прорастают, клетки размножаются и начинается сепсис, завершающий процесс. Насекомое гибнет; его труп всегда наполнен бактериями. Энтобактерин не токсичен для человека, теплокровных, рыб, пчел и энтомофагов, но опасен для тутового и дубового шелкопряда.

Применяют препарат путем опрыскивания растений суспензией из расчета 2—5 кг/га и 300—1500 л/га с использованием серийных опрыскивателей наземного и авиационного типа. Оптимальная температура применения энтобактерина (+18)—(+32°C).

**Дендробациллин.** Промышленность производит дендробациллин уже много лет, в его основе *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus* — бацилла, выделенная Талалаевым из гусениц сибирского шелкопряда. Препарат в виде порошка с титром спор 30 или 60 млрд./г, содержащий столько же кристаллов эндотоксина, был разработан специально для защиты леса от сибирского шелкопряда (*Dendrolimus sibirika*). Последующие исследования показали не меньшую целесообразность использования его и в сельском хозяйстве для защиты овощных, плодовых и технических культур от насекомых разных вредных видов: совок, белянок, лугового мотылька, шелкопряда, молей, огневков, листоверток, пядениц, златогузки, боярышницы и др. Для защиты хлопчатника от совок дендробациллин рекомендован в смеси с инсектицидами. Нормы расхода препарата и рабочей жидкости

такие же, как и у энтобактерина. Препарат также не фитотоксичен, не опасен для полезной энтомофауны, за исключением тутового и дубового шелкопрядов, для его применения используются те же серийные наземные и авиационные опрыскиватели.

**Битоксибациллин (БТБ).** Препарат БТБ создан недавно и отличается от предыдущих двух тем, что содержит *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*, продуцирующий не только кристаллический эндотоксин, но и термостабильный  $\beta$ -экзотоксин. Это достигнуто благодаря оригинальности штаммов бактерий, обладающих экзотоксиногенными свойствами и специально разработанной технологии производства, обеспечивающей сохранение в препарате всех энтомоцидных компонентов — спор, эндотоксина и экзотоксина. Наличие в препарате энтомоцидного комплекса не только усиливает его действие на насекомых, но и расширяет спектр применения. Первоначально БТБ был рекомендован для борьбы с колорадским жуком и совками, на которых другие аналогичные препараты действуют слабо. В дальнейшем круг насекомых, против которых применяется БТБ, был значительно расширен. Препарат с успехом используется для защиты картофеля, томатов, баклажанов от колорадского жука; хлопчатника — от совок; овощных культур — от белянок, молей и совок; свеклы и люцерны — от лугового мотылька; плодовых и лесных культур — от комплекса листогрызущих чешуекрылых вредителей (американской белой бабочки, шелкопрядов, пядениц, молей, листоверток, златогузки, боярышницы и др.).

Препарат по форме аналогичен предыдущим, т. е. производится в виде порошка с титром спор 45 млрд./г, с годовым сроком годности при нормальных условиях хранения. Для применения готовят рабочие растворы, которыми опрыскивают растения из расчета 2 кг/га (200—600 л/га раствора) на картофеле и овощных, 3—4 кг/га (100—400 л/га раствора) на хлопчатнике и столько же на древесных культурах (плодовых и дикорастущих). Битоксибациллину в значительной степени присущи свойства метатоксического действия на насекомых. В сублетальных дозах он вызывает у насекомых тератогенез (уродства), резко снижает плодовитость инфицированной популяции до ее второго поколения.

БТБ малотоксичен для теплокровных животных и человека ( $LD_{50}$  для крыс 9000 мг/кг), не фитотоксичен в нормах, рекомендованных для применения; безопасен для многих энтомофагов и пчел; в больших дозах токсичен для трихограммы, криптолемуса, периллюса.

**БИП — биологический инсектицидный препарат.** Препарат изготавливается промышленностью в виде порошка с титром спор *Bac. thuringiensis* var. *darmstadiensis*<sup>1</sup> 30 млрд./г и в виде пасты

<sup>1</sup> Название бактерии дано согласно международной номенклатуре. Авторы препарата (Э. Г. Африкан и др.) назвали штамм *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus*.

с титром спор 20 млрд./г. Эффективен в защите овощных культур от белянок и молей; плодовых — от яблонной и плодовой молей, листоверток, шелкопрядов и пядениц. Порошок и паста применяются для приготовления растворов, которыми опрыскивают растения.

**Гомелин.** Препарат создан на основе *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* и предназначен для борьбы с вредными насекомыми леса: сосновым шелкопрядом, шелкопрядом монашенкой, дубовой хохлаткой, зеленой дубовой листоверткой, пяденицами (сосновой, зимней и обдирало) и др. Испытывается его эффективность против вредителей сельскохозяйственных культур (белянок, молей, совок, златогузки, шелкопрядов и др.).

В лесу гомелин применяется в дозе 1—3 кг/га в зависимости от концентрации препарата и вида вредителя. В некоторых случаях для подавления резистентности насекомых рекомендуется применять препарат в смеси с иммунодепрессантом димилином.

**Лепидоцид.** Препарат аналогичен по своему составу зарубежному дипелу. В его основе *Bac. thuringiensis* var. *kurstaki*. Производится в виде концентрированного порошка с титром спор 100 млрд./г и такого же количества кристаллов. Рекомендован для защиты плодовых и дикорастущих древесных культур от чешуекрылых насекомых (белянок, молей, совок, шелкопрядов и др.). Применяется так же, как и все предыдущие препараты, в виде рабочих растворов для опрыскивания растений. Расход препарата 0,5—2,0 кг/га в зависимости от условий применения.

**Бактокулицид.** В 1977 г. была выделена из водоема бактерия, отнесенная к группе *Bac. thuringiensis*. Ей был присвоен 14-й серотип. Она именуется *Bac. thuringiensis* H<sub>14</sub>. Эта бактерия продуцирует кристаллический эндотоксин, который обладает удивительными свойствами. Токсин этой бактерии высоко токсичен для личинок комаров и мошек, но совершенно не токсичен для других насекомых и гидробионтов, обитающих в комариных водоемах. Эти оригинальные свойства бактерии привлекли к ней большое внимание ученых всего мира и особенно Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ). Известно, что комары и мошки — переносчики многих трансмиссивных инфекций человека и животных. Особенно тревожное положение возникло с малярией, переносчиком которой является *Anopheles maculipennis*. Основным профилактическим мероприятием, предупреждающим массовые заболевания малярией, является борьба с комаром-переносчиком. Долгое время успешная борьба с комарами велась при помощи различных химических инсектицидов, но в последнее время применение этих инсектицидов резко сократилось. Они сильно загрязняют водоемы, и выяснилась их высокая опасность для многих гидробионтов, в том числе рыб. Сокращение работ по борьбе с малярийными комарами привело во многих развивающихся странах к новому подъему числа больных малярией. Отсюда большой интерес представляет микробиологический метод борьбы с комарами и, в частности, использование таких спе-

цифических бактерий, как *Bac. thuringiensis* H<sub>14</sub> и *Bac. sphericus*. Во многих странах начались интенсивные исследования по изучению этих бактерий и создание на их основе ларвицидных препаратов. В нашей стране на основе *Bac. thuringiensis* H<sub>14</sub> разработан препарат — бактокулицид.

Микробиологическая промышленность освоила производство бактокулицида и выпускает его в виде сухого порошка с титром около 90 млрд./г спор и столько же кристаллов. Проведены испытания эффективности бактокулицида в различных водоемах против разных видов комаров родов *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* и *Culisetta*. Испытания показали высокую его эффективность при обработке комариных водоемов как наземным, так и авиационным методом. Доза применения бактокулицида варьирует от 0,5 до 3,0 кг/га водной поверхности (определяется видами комаров и характером водоема). Препарат предварительно растворяют в воде, и такую рабочую жидкость равномерно разбрызгивают по поверхности водоемов. Гибель личинок происходит в течение 2—3 сут. Куколки и имаго комаров к препарату не восприимчивы.

За рубежом создан ряд аналогичных препаратов: текнар (фирма «Сандоз», Швейцария), бактимос (фирма «Биохем продакс», Франция), вектобак (фирма «Аббот», США) и москитур (ЧССР). Все эти препараты, как и отечественный бактокулицид, содержат *Bac. thuringiensis* H<sub>14</sub>. Сравнительная оценка отечественного и зарубежных препаратов, проведенная ВОЗ, показала, что бактокулицид и французский бактимос наиболее эффективны.

**Дипел.** Дипел — один из наиболее широко используемых за рубежом бактериальный препарат, выпускаемый в США на основе *Bac. thuringiensis* var. *kurstaki*. Получают препарат в виде смачивающего порошка с активностью 16 000 МЕА/мг<sup>1</sup>, жидкого концентрата, гранулированной приманки и других форм. В нашей стране испытан на эффективность смачивающийся порошок. Он зарегистрирован и рекомендован к применению на овощных, технических культурах, плодовых и древесных насаждениях против белянок, лугового мотылька, молей, огневков, совок, шелкопрядов, листоверток и других насекомых. Нормы расхода дипела зависят от условий применения и варьируют от 0,5 до 2 кг/га.

**Бактоспепин.** Второй зарубежный препарат предложен французскими исследователями в виде смачивающегося порошка, пасты и гранулированной формы, основу которого также составляет *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*. Препарат испытан и зарегистрирован также в СССР; рекомендован против белянок и молей на капусте в дозе 0,4 кг/га. Фирма-производитель рекомендует его применять против шелкопрядов, листоверток, золотушки, американской белой бабочки, пядениц, огневков с нормой расхода 0,4—1,0 кг/га.

---

<sup>1</sup> Зарубежные препараты оцениваются по активности действия на мельничную огневку и сравниваются с эталоном, имеющим активность 1000 МЕА/мг.

Наряду с разными штаммами *Bac. thuringiensis* для борьбы с насекомыми используется другая энтомопатогенная бактерия, также образующая споры и включения, напоминающие кристаллы — *Bacillus popilliae*. Данная бактерия была впервые описана как возбудитель молочной болезни личинок японского жука (*Popillia japonica*). Позже ее находили и у других видов жесткокрылых насекомых (жуков). *Bac. popilliae* в отличие от *Bac. thuringiensis* плохо растет на искусственных средах, поэтому первоначально для ее массового размножения использовали личинок жука, заражая их методом инъекции. Наиболее широко применяется этот метод в США. В других странах он не нашел такого применения, так как эффективность его была нестабильна.

Сходная с *Bac. popilliae* бактерия *Bac. lentimorbus*, отличающаяся лишь отсутствием параспоральных включений, не используется из-за нестабильности свойств и в первую очередь энтомопатогенности.

Для целей борьбы с комарами представляет большой интерес и бактерия *Bacillus sphaericus*, многие штаммы которой продуцируют кристаллический белковый эндотоксин, вызывающий гибель личинок комаров. Особенно чувствителен к этой бактерии и в первую очередь к ее токсину малярийный комар *Anopheles maculipennis*.

Второе достоинство этой бактерии — более длительное, по сравнению с *Bac. thuringiensis* Н<sub>14</sub>, сохранение ее в анофелогенных водоемах, что заманчиво в аспекте эпизоотологического приема использования бактерии, т. е. искусственного создания очагов эпизоотии в местах обитания личинок комаров. Ведется интенсивная разработка препаратов из *Bac. sphaericus*, но проблема осложняется нестабильностью свойств штаммов бактерий и сложностью в технологии промышленного производства товарных форм препаратов на ее основе.

Вопросы контагиозности перечисленных бактерий и возможности эпизоотологического способа их использования до сих пор изучены слабо. Имеющиеся на этот счет сведения противоречивы. В отношении *Bac. thuringiensis* следует отметить, что с помощью этой бактерии можно вызвать эпизоотию, но только среди наиболее восприимчивых видов и фаз развития насекомых и при оптимальных условиях внешней среды (в первую очередь температуры, влажности, плотности насекомых и тесного контакта между особями).

### 31.1.2. Грибы

Энтомопатогенные грибы очень широко распространены в природе и как агенты микробиологической борьбы с насекомыми интересны во многих отношениях. Во-первых, они поражают большой круг вредных насекомых. Во-вторых, у грибов разнообразны пути поражения насекомых, в том числе и контактный, что облегчает их использование в эпизоотологическом аспекте. В-третьих, грибы хорошо сохраняются в различных условиях в

виде покоящихся спор, спорангиев, склероциев, псевдосклероциев и плодовых тел, что очень важно для технологии производства и применения грибных препаратов. В-четвертых, многие грибы служат продуцентами различных биологически активных веществ, вызывающих и ускоряющих патогенез у насекомых. Однако перечисленные достоинства грибов как энтомопатогенов пока не реализуются в больших масштабах по двум причинам: 1) для получения препаратов необходимо поверхностное выращивание грибов, а это требует больших площадей и затрат; 2) энтомопатогенная активность грибов появляется только в условиях высокой и стабильной влажности, что ограничивает сферу их использования.

Наиболее интересны и перспективны две группы грибов: энтомофторовые — семейства *Entomophthoraceae* и так называемые мускардинные грибы из *Euascoomycetes*.

В нашей стране разработан ряд грибных препаратов, используемых для защиты растений.

**Боверин.** В основе этого препарата мускардинный гриб *Beauveria bassiana*. Разработан боверин очень давно, но по указанным выше причинам его массовое промышленное производство пока не налажено. Боверин действует на насекомых контактно и через кишечник. Конидии гриба, попадая на тело (кутикулу) насекомого, прорастают и через хитиновый покров проникают в полость. Гифы гриба, проникшие в полость тела насекомого, через определенное время отделяются от ротовой конидиальной трубки, начинают делиться и через гемолимфу заполняют все тело, вызывая гибель насекомого. В трупе образуются длинные гифы и на них — цилиндрические конидии. Последние прорастают, образуя новые гифы, которые вновь образуют конидии, и т. д. При этом труп насекомого твердеет. После этого при наличии влаги гифы прорастают на поверхность трупа, образуя мицелий, на котором развиваются воздушные конидии. Последние и являются инфекционными стадиями гриба.

Предложены разные способы производства боверина. Самый распространенный и легкодоступный — поверхностный способ выращивания гриба на жидкой среде с последующей сушкой. Второй способ двухэтапный или, как его называют, глубинно-поверхностный. Возможно выращивание гриба и на плотных питательных средах. Наконец, предлагался глубинный способ производства (гриб от начала до конца развивается в жидкой питательной среде). Но оказалось, что образовавшиеся при этом конидии менее активны и менее стабильны; они быстро инактивируются под воздействием различных неблагоприятных условий.

Боверин поражает в первую очередь ослабленных насекомых в условиях повышенной влажности, поэтому его применяют в смеси с пониженными дозами инсектицидов. Боверин рекомендован для борьбы с колорадским жуком, плодовой жук и другими насекомыми. Применяется методом опрыскивания растений рабочей жидкостью препарата и его синергиста — инсектицида, из

расчета 1—2 кг/га препарата и десятая часть производственной дозы инсектицида.

За рубежом разработан ряд аналогичных боверину грибных препаратов. С этой целью используются мускардинные грибы *Beauveria bassiana*, *B. tenella* и *Metarhizium anisopliae*, сходные по своим свойствам и в первую очередь по энтомоцидной активности. Но объемы производства и применения мускардинных грибов за рубежом и в нашей стране невелики.

Другая группа облигатных энтомопатогенных грибов, представляющая большой интерес, как уже отмечалось, для борьбы с насекомыми, относится к семейству Entomophthoraceae. Эта группа грибов интересна прежде всего тем, что многие ее представители нередко вызывают у насекомых массовые эпизоотии. Отсюда очень заманчиво научиться с помощью таких микробов создавать искусственные очаги эпизоотий в популяциях вредных видов насекомых. Заражение насекомых энтомофторовыми грибами происходит аналогично тому, как указано для мускардинных грибов. Характерным для энтомофторов является более активное распространение инфекционного начала — конидий, образовавшихся на теле хозяина. После завершения формирования конидий последние быстро и резко отлетают от тела хозяина, образуя круговую инфекционную зону, которая служит источником заражения здоровых особей.

В нашей стране предложен препарат энтомофторин на основе *Entomophthora thaxteriana*. Производится он пока в лабораторных условиях в небольших количествах и предназначен для борьбы с тлями на растениях закрытого грунта.

Из других грибов, используемых для защиты растений, следует отметить *Aschersonia aleuroides*, интродуцированный в нашу страну из Китая. Он применяется для борьбы с цитрусовой белокрылкой и *Verticillium lecanii*; последний начали использовать также для защиты растений в теплицах от белокрылки и тлей. В нашей стране разработан лабораторный способ производства из этого гриба препарата, названного вертициллином. За рубежом на основе *A. aleuroides* созданы два препарата: верталек — для борьбы с тлями и майкотал — для борьбы с белокрылкой.

### 31.1.3. Вирусы

Энтомопатогенные вирусы в защите растений весьма перспективны. Их перспективность обусловлена высокой контагиозностью и вирулентностью, узкой специфичностью патогенного действия, хорошей сохранностью в природе и в латентном состоянии, трансвариальной и трансфазной циркуляцией у насекомых.

Видовые названия энтомопатогенных вирусов состоят из группового названия и поражаемого хозяина (например, полиэдроз непарного шелкопряда, полиэдроз американской бабочки, гранулез озимой совки, гранулез американской белой бабочки и т. д.). Иногда в название включается слово, характеризующее локали-

зацию вируса в организме хозяина (например, ядерный полиэдроз с локализацией вируса в ядре клетки, цитоплазматический полиэдроз с локализацией в цитоплазме или кишечной полиэдроз рыжего пилильщика, указывая первоочередное поражение вирусом кишечника этого насекомого).

Энтомопатогенные вирусы, как и все другие вирусы, размножаются только в живых клетках хозяина. Последнее обстоятельство значительно усложняет возможность широкого использования их для борьбы с насекомыми. Для производства вирусных препаратов требуется массовое разведение насекомых как живой среды культивирования вирусов. Недавно начаты работы по размножению вирусов на культурах тканей насекомых, но пока эти исследования ограничены лишь небольшим числом лабораторных экспериментов.

В нашей стране разработан ряд вирусных препаратов, изготовляемых на живых насекомых. Некоторые из них рекомендованы к применению, например: вирин-ГЯП<sup>1</sup> — против яблонной плодовой гнили, вирин-КШ — против кольчатого шелкопряда, вирин-ЭНШ — против непарного шелкопряда, вирин-ЭКС — против капустной совки, вирин-ОС — против озимой совки на хлопчатнике и вирин-ХС — против хлопковой совки.

Перечисленные вирусные препараты, несмотря на их высокую эффективность и безопасность для окружающей среды, не нашли пока широкого применения; их массовое производство представляет собой очень сложный и трудоемкий процесс.

За рубежом также разработаны и рекомендованы вирусные препараты для борьбы с яблонной плодовой гнилью, хлопковой и озимой совками, белянками, листовертками, пилильщиками и другими насекомыми.

### **31.2. МИКРОБНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ПРОТИВ ГРЫЗУНОВ**

К отряду грызунов (Rodentia) относятся многочисленные и самые вредоносные виды животных из класса млекопитающих. В нашей стране обитает более 140 видов грызунов, большинство из которых причиняют экономический или санитарный вред. Борьба с грызунами ведется давно. Предложены разнообразные приемы их истребления: механические (использование ловушек, живоловок, ловчих ям и сосудов и др.), физические (затапливание водой, раскопка и распашка нор), химические (использование ядов для приготовления отравленных приманок, воды в поилках, опудривания или газации нор, помещений и др.) и биологический (различные приемы использования живых организмов — кошек, собак, хищных птиц, патогенов).

Использование патогенных для грызунов микроорганизмов,

<sup>1</sup> В названии препарата к слову вирин добавляются первые буквы названия насекомого, против которого он применяется: ГЯП — гусеницы яблонной плодовой гнили; КШ — кольчатый шелкопряд и т. д.



как уже отмечалось, началось со времен Пастера и Мечникова. Для этих целей предложен ряд микроорганизмов, но наиболее широкое применение нашли бактерии из группы сальмонелл: так называемые бактерии Исаченко (*Salmonella enteritidis* var. *issatschenko*), выделенные в 1897 г. из трупов серых крыс; бактерии Мережковского (*S. enteritidis* var. *mereschkovski*), выделенные в 1893 г. от больных сусликов во время лабораторной эпизоотии; бактерии Данича (*S. enteritidis* var. *danysz*), выделенные в 1893 г. из трупов обыкновенных полевых крыс во время эпизоотии в одной из провинций Франции.

Род *Salmonella* относится к семейству Enterobacteriaceae, объединяющему палочковидные, грамотрицательные, часто подвижные (имеют жгутики) гетеротрофные бактерии. Многие способны расти не только в аэробных, но и в анаэробных условиях. Ряд представителей семейства, в том числе сальмонеллы, патогенны для человека и животных. Основными местами обитания сальмонелл является пищеварительный тракт млекопитающих.

Для борьбы с грызунами в нашей стране широко используется *S. enteritidis* var. *issatschenko*. На основе этой бактерии многие ветеринарно-бактериологические лаборатории и биологические лаборатории при станциях защиты растений готовят препарат бактороденцид, применяемый ежегодно на общей площади 3—4 млн. га и до 20 млн. м<sup>2</sup> площади построек.

Бактороденцид готовится в двух формах — зерновой (на зернах пшеницы, ячменя, овса) и аминокостный (на костных опилках). Зерновой бактороденцид предназначен в первую очередь против полевых видов мышевидных грызунов: мышей (домовых, курганчиковых, лесных, мышей-малюток), полевых (обыкновенной, общественной, пашенной, водяной, рыжей лесной и др.), хомячков. Аминокостный бактороденцид применяется с приманочным продуктом для истребления крыс и мышей, обитающих в постройках населенных пунктов.

Контагиозность сальмонелл изучена довольно подробно. Однако результаты этих исследований долгое время были противоречивы, что объясняется условиями опытов и наблюдений. Сейчас достоверно установлено, что бактерии Исаченко могут передаваться от больных грызунов здоровым при определенных эпизоотических ситуациях: во-первых, в эпизоотическом очаге должны присутствовать высоковирулентные микробы и восприимчивые хозяева — грызуны; во-вторых, необходима высокая численность грызунов и тесный контакт между больными и здоровыми; в-третьих, необходимы благоприятные внешние условия, влияющие прямым и косвенным путем на микроба-патогена и макроорганизм-хозяина и на их взаимоотношения.

Пути передачи бактерий от больных грызунов здоровым могут быть самыми разными: через корм, загрязняемый больными зверьками и трупами, через гнезда грызунов и особенно путем каннибализма, широко распространенного среди этих животных. При наличии вышеперечисленных условий и путей передачи

патогена возможно напряженное развитие эпизоотий. Это было подтверждено неоднократно в вольерных и полевых исследованиях. Однако эпизоотия на ограниченном участке длится непродолжительно, не более 30 сут, после чего затухает. Причиной прекращения эпизоотии является прежде всего снижение численности восприимчивых зверьков и приобретение временного иммунитета у оставшейся части популяции. Возобновление эпизоотии возможно лишь при вновь создавшихся благоприятных условиях.

Естественный иммунитет грызунов к сальмонеллам у разных видов различен. Сильнее выражен он у крупных видов (крыс, сусликов, песчанок, тушканчиков, хомяков, сурков и др.), мелкие виды — мыши и полевки — гораздо менее иммунны. Приобретенный иммунитет нестабилен и непродолжителен, особенно у высоковосприимчивых мелких мышевидных грызунов.

Бактерии обладают строгой специфичностью, т. е. избирательной патогенностью. Они безопасны для человека, для домашних и диких полезных животных: лошадей, крупного и мелкого рогатого скота, свиней, кур, уток, гусей, индеек, собак, кошек, а также хорьков, горностаев, колонка. На основании этих данных Минздрав СССР разрешил широкое применение бактороденцида для борьбы с грызунами.

Применение бактороденцида основано на учете видового состава, численности и распределения грызунов на площади, подлежащей обработке. Главная цель — препарат должен поедаться грызунами. Зерновой бактороденцид очень охотно поедается мышевидными грызунами. Отсюда важно применять его умело. На пастбищах и посевах злаковых препарат разбрасывают в норы или около них; в садах, лесополосах, лесах закладывают в траву, кустарник, у стволов деревьев и в обнаруженные норы. В этих условиях эффективным приемом применения бактороденцида является раскладывание его в долговременные очаги отравления, которые устраивают из небольших куч соломы, бурьяна, листьев. Такие очаги эффективны осенью и зимой — они привлекают к себе грызунов как зимние убежища. Норма расхода бактороденцида варьирует от 0,5 до 2,0 кг/га в зависимости от численности грызунов.

В стогах и скирдах, где грызуны скапливаются на осень и зиму, бактороденцид раскладывают в ниши, сделанные в приземной части и на высоте 1—1,5 м в шахматном порядке или предварительно размещают препарат в специальные дератизационные ящики, которые закладывают в ниши стогов и скирд. Борьба с грызунами в стогах и скирдах осенью и зимой — очень рациональный прием, позволяющий уничтожить основную массу полевых видов с наименьшими затратами сил и средств.

За рубежом бактериальный метод борьбы с грызунами применяется в меньших масштабах и лишь в небольшом числе стран — Болгария, Куба, Монголия, Франция.

### 31.3. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ НАСЕКОМЫХ И ГРЫЗУНОВ

Эффективность применения микробиологических средств защиты растений определяется рядом факторов, главным образом экологического порядка. Поэтому разработка эффективных приемов применения микробных препаратов основывается на особенностях используемого микроба и его хозяина (насекомого или грызуна), на их взаимоотношениях. Учитывается прежде всего механизм патогенного или токсического действия микроба на макроорганизм и зависимость этого действия от внешних условий. Следует подчеркнуть неидентичность энтомоцидного и родентицидного действия микробов и химических пестицидов. В случае применения микроорганизмов мы имеем дело с двумя биологическими агентами, каждый из которых отвечает на взаимоотношение реакций экологического или физиологического свойства.

Технология применения микробных препаратов и химических пестицидов имеет не только общие подходы и принципы, но и значительные отличия. Перечислим основные из них. Прежде всего эффективность средства в значительной мере зависит от его рецептурной формы. Если это сухие препараты (порошки) или пасты, они должны хорошо смачиваться и образовывать стабильную рабочую суспензию. Кроме того, препарат, нанесенный на растение, должен как можно дольше сохраняться на нем, не смываться дождем, не инактивироваться фитонцидами, инсоляцией или другими биотическими и абиотическими факторами. Эти качества препаратам придают специальные наполнители (эмульгаторы, стабилизаторы, прилипатели, протекторы и др.), добавленные в состав препарата при его изготовлении или в процессе применения. Второй фактор, влияющий на эффективность препаратов, — способ их применения. В данном случае преследуется главная цель — донести до целевого агента (насекомого, грызуна) наибольшее количество препарата. С сожалением надо отметить, что в настоящее время способы обработки растений таковы, что лишь небольшая часть используемого средства попадает в цель, остальная часть или сносится воздушными массами, оседает на почву, минуя растение, или испаряется до того, как достигнет растения (при авиаобработке) и т. д. Следовательно, много еще предстоит сделать, чтобы усовершенствовать приемы обработок и уменьшить потери препаратов. Важен также характер распределения препарата на обрабатываемых растениях. При наземных и авиационных обработках травянистых растений препараты большей частью закрепляются на верхней части листовой поверхности и значительно меньше попадают на нижнюю (обратную) сторону листьев. Поэтому нужны поиски таких способов обработки, которые обеспечат равномерное распределение применяемых средств на верхней и нижней поверхности листьев (многие вредители обитают и питаются на нижней стороне листьев).

Порошковые препараты, применяемые методом опрыскивания, должны быть тончайшими, их частицы не должны превышать в диаметре 100 микрон. Немаловажное значение при опрыскивании имеет размер капель. Крупные капли будут скатываться и распределение препарата окажется неравномерным; очень мелкие капли могут сноситься воздушными массами или испаряться в воздухе, не достигая растения, особенно при авиаобработках. Оптимальный размер капель, обеспечивающий наибольшую эффективность при истреблении листогрызущих насекомых, равен примерно 50 мкм. Имеется ряд других специфических условий эффективного применения микробных препаратов: характер обрабатываемого растения, экологические особенности вредителей и т. д.

Специфика применения микробиологических средств заключается прежде всего в механизме их действия на насекомых и грызунов. Если пестициды действуют как яды, отравляя вредителей, то у микроорганизмов характер действия несравненно сложнее и разнообразнее, и это несомненно должно учитываться при определении основы технологии их применения.

Большинство микробных препаратов в отличие от пестицидов действует медленно, гибель насекомых или грызунов начинается на 2—3-и сут и продолжается на протяжении 10—15 сут. Часто этот фактор трактуется как недостаток метода, но это не так. Вредитель, испробовавший зараженного корма, заболевает и питается слабо или не питается совсем и уже не вредит. Энтмопатогенные микроорганизмы и их метаболиты обладают антифидагнтным действием на насекомых. Последние, получив сублетальную дозу препарата, перестают питаться, развитие их замедляется, метаморфоз нарушается (табл. 31.1), в результате образуются особи и целые популяции с физиологическими аномалиями (тератогенезами). Тератогенез (уродство) может быть самым различным: незавершенный метаморфоз — превращение личинки в куколку, в результате чего образуется полуличинка — полукуколка; образовавшаяся куколка имеет значительные морфологические и физиологические отклонения; имаго (взрослое насекомое), вышедшее из зараженной личинки, гусеницы или куколки,

**Т а б л и ц а 31.1.** Влияние сублетальных доз битоксиациллина на развитие колорадского жука

Концентрация препарата, %	Фазы развития жука				
	на 18-е сутки после заражения L <sub>3</sub> , %		на 27-е сутки после заражения L <sub>4</sub> , %		
	личинки	куколки	личинки	куколки	жуки
0,1	95,8	4,2	32,7	67,3	0
0,5	—	—	78,4	21,6	0
0,0	0	100	0	45,7	54,3

**Т а б л и ц а 31.2. Репродуктивность колорадского жука, инфицированного битоксиациллином и боверином**

Препарат и его концентрация в рабочей жидкости, %	Среднее число яиц на одну самку	Снижение плодовитости, %
Инфицированная фаза жука — L <sub>4</sub>		
Битоксиациллин, 0,1	121	44,8
» 0,5	110	49,8
Боверин, 0,1	135	38,4
» 0,5	106	51,6
Битоксиациллин + боверин, 0,1 + 0,1	100	54,8
Контроль	219	0,0
Имаго		
Битоксиациллин, 0,5	87	67,8
» 2,0	46	82,9
Контроль	271	0,0

тоже имеет резкие отклонения от нормы — у одних редуцирован хоботок, у других — конечности, у третьих на голове вместо антенн образуются лапки с коготками и т. д. Разумеется, что такие насекомые обречены. Кроме того, выявлен дерепродукционный эффект энтомопатогенных микроорганизмов и их метаболитов. Насекомые, получившие сублетальную дозу микробных препаратов, теряют в значительной степени репродукционные способности (табл. 31.2): они меньше откладывают яиц, часть отложенных яиц оказывается стерильной, из них не отрождаются личинки и гусеницы. Даже во втором поколении пораженной популяции заметна пониженная плодовитость.

Есть еще один специфический характер действия микроорганизмов на насекомых и грызунов — эпизоотологический, о котором частично говорилось выше. Основоположителем эпизоотологического направления в микробиометодике следует считать Мечникова, придававшего этому направлению исключительное значение. В дальнейшем эти идеи развивали и воплощали Поспелов, Талалаев, Прохоров и другие исследователи. К сожалению, в последнее время как у нас, так и за рубежом данному вопросу уделяется неоправданно мало внимания. А ведь многие энтомопатогены, особенно из числа вирусов и энтомофторных грибов, обладают высокой контагиозностью. Имеются наблюдения, показавшие, что спонтанные вирусные и грибные эпизоотии способны удерживать численность вредных насекомых на безвредном уровне. Эпизоотии нередко являются одним из основных регуляторов численности насекомых и грызунов, особенно массовых видов. Следовательно, необходимо научиться провоцировать такие эпизоотии в популяциях вредных видов созданием оптимальных для этого условий или разработать приемы воссоздания и регулирования искусственных очагов эпизоотий, действующих длительно и эффективно. Напряженность эпизоотии зависит в первую очередь от вирулентности и контагиозности микроба- возбу-

дителя и популяционной восприимчивости макроорганизма-хозяина. Большое значение имеет также плотность популяции и степень контакта больных особей со здоровыми. Эти условия можно направленно регулировать и тем самым усиливать напряженность эпизоотии и ее влияние на численность насекомых и грызунов. В качестве наглядного примера эпизоотологического регулирования численности грызунов может служить разработанный эффективный и рациональный способ снижения численности и вредоносности мелких мышевидных грызунов (мышей, полевок и хомячков) на посевных угодьях. Известно, что мелкие грызуны после уборки урожая и наступления холодов на зиму скапливаются в стогах, скирдах, ометах, лесополосах. Это так называемые станции-резерваторы мышевидных грызунов. В таких станциях некоторые виды (например, обыкновенная полевка) могут размножаться всю осень и зиму. С наступлением весны грызуны из станций-резерваторов расселяются на посевы, где причиняют вред. Применение бактериального препарата бактороденцида зимой в станциях-резерваторах дает высокий технический и экономический эффект. Внесением бактороденцида в стога, скирды и лесополосы создаются искусственные очаги эпизоотий, где условия для ее развития и распространения наиболее оптимальны. Истребление таким путем грызунов позволяет обезопасить весенние посевы от заселения их этими вредителями. Прием не требует больших затрат, он проще и эффективнее, чем истребление грызунов на самых посевах, где грызуны рассредоточены по большой площади. Возможен и другой прием усиления эпизоотологической ситуации — применение энтомофторовых грибов для защиты растений закрытого грунта от паутинного клеща и тлей. Известно, что грибы наиболее активны в условиях повышенной и стабильной влажности, поэтому их применение рекомендуется совмещать с поливом, т. е. искусственным повышением влажности, что ведет к усилению напряженности энтомофторовой эпизоотии.

#### **31.4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА ПРОТИВ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ**

Растения так же, как и животные, подвержены разнообразным заболеваниям инфекционного порядка. Возбудителями инфекций являются различные микробы из числа бактерий, грибов, простейших, а также вирусы и гельминты, которым присвоено общее название — фитопатогены. Микробиологическая борьба с фитопатогенами осуществляется пока в небольших масштабах. В настоящее время проблема имеет три основных направления: применение антибиотиков микробного происхождения, использование микробов-антагонистов и гиперпаразитизма.

Применение антибиотиков для борьбы с вредителями растений началось недавно. В нашей стране разрешены два антибиотика: трихотекцин — на основе гриба *Trichotecium roseum* — против корневых гнилей пшеницы и ячменя и мучнистой росы огур-

цов в закрытом грунте; фитобактериомицин — на основе *Streptomyces lavendulae* — против бактериозов фасоли и рассады капусты и корневых гнилей пшеницы. За рубежом ассортимент применяемых антибиотиков несколько шире. В США и Англии против возбудителей ожогов плодовых деревьев применяют агриомицин, хемофорин, герокс, римоцидин и другие антибиотики стрептомицинового ряда. В некоторых странах на овощных культурах применяют антибиотики типа гризеофульвина (фулеин, фульвицин, гризетин, грифульвин, мурфульвин). Наиболее широко используются антибиотики в Японии против возбудителя пирикулярриоза риса (*Piricularia oryzae*): касумин, бластицидин, полиоксин, циклогексимид, пиомицин, валидомицин.

С другой стороны, в некоторых странах к антибиотикам такого назначения относятся настороженно и не разрешают применять в растениеводстве, считая их опасными мутагенами, вызывающими индуцированное повышение резистентности не только у фитопатогенов, но и у возбудителей заболеваний животных и человека. Кроме того, стоимость антибиотиков очень высока, что ограничивает их применение в растениеводстве.

Использование микробов-антагонистов возможно лишь для защиты растений от почвенных фитопатогенов. Имеется два пути их применения: 1) искусственное размножение антагонистов и насыщение ими сферы обитания фитопатогенов с целью их подавления; 2) создание оптимальных условий в почве для массового спонтанного размножения антагонистов. В последнем случае это достигается путем использования различных агроприемов, способствующих созданию благоприятных условий размножения и активной деятельности антагонистов, подавляющих фитопатогенов в почве. К таким агроприемам прежде всего относятся обработка почвы и внесение органических удобрений, способствующие развитию почвенных микроорганизмов, в том числе антагонистов. Большое значение для освобождения почв от фитопатогенов имеет построение рациональных севооборотов, ибо известно, что при монокультурах в почве постепенно накапливаются фитопатогены и устойчивость растений к ним снижается.

Гиперпаразитизм в фитопатологии пока не используется. Между тем накопленные экспериментальные материалы по явлению гиперпаразитизма свидетельствуют о перспективности этого направления в защите растений от болезней.

## Глава 32 ПОЛУЧЕНИЕ ГАЗООБРАЗНОГО И ЖИДКОГО ТОПЛИВА

Современная энергетика является топливной. Около 98 % производимой в мире и потребляемой энергии дают уголь, нефть и природный газ, и только 2 % — гидроэнергетика и атомная энергетика.

Постоянно растущие темпы добычи и потребления ископае-

мых органических топлив приводят, с одной стороны, к резкому сокращению их запасов и, с другой стороны, к тепловому и углекислотному загрязнению биосферы благодаря выведению в атмосферу дополнительных количеств тепла и  $\text{CO}_2$ .

Известные запасы природного газа и нефти при сохранении сегодняшних темпов роста потребления будут исчерпаны через 40—50 лет. Запасов угля будет достаточно на 100—200 лет. Перевод энергетики на уголь приведет к резкому увеличению выброса  $\text{CO}_2$  в атмосферу, так как для получения эквивалентного количества тепловой энергии необходимо сжигать вдвое больше углерода угля, чем нефти или природного газа. Увеличение  $\text{CO}_2$  в атмосфере приводит к повышению «парникового эффекта» или к повышению среднегодовой глобальной температуры на планете, что чревато крупными отрицательными экологическими последствиями, несущими опасность для существования самого человека.

Поэтому все острее становится вопрос об изыскании надежных, альтернативных, экологически «чистых», постоянно возобновляемых источников энергии и создании энергосберегающих технологий.

С проблемами современной энергетики тесно смыкается решение задач по проблеме охраны окружающей среды. Необходимо разработать научные методы и технологии получения энергии при одновременном решении вопросов, связанных с защитой окружающей среды от непрерывно поступающих в биосферу загрязнений.

В качестве одного из основных источников энергии будущего рассматривают конверсию энергии Солнца. Благодаря прямому использованию различных форм солнечной энергии (тепловой, фотоэлектрической, энергии ветра и биомассы, образуемой в результате фотосинтеза) можно избежать теплового загрязнения, твердых и газообразных выбросов в биосферу, сохранить тепловой и углекислотный баланс в атмосфере и существенно уменьшить потребление ископаемых топлив. В последнее время серьезное внимание уделяется биологическим методам конверсии солнечной энергии, среди которых фотосинтез занимает ведущее место.

В процессе фотосинтеза ежегодно конвертируется  $3 \cdot 10^{24}$  Дж солнечной радиации. Это позволяет только в континентальных лесах накапливать до 70 млрд. т биомассы, что по своему энергосодержанию втрое превышает современное потребление энергии в мире. Использование биомассы в качестве источника топлива открывает определенные перспективы решения проблемы энергетики и охраны окружающей среды. Наиболее реальными являются два основных метода получения топлива из биомассы: биологическая конверсия и термохимическая конверсия.

*Биологическая конверсия* включает анаэробные микробиологические процессы: получение метана (биогаза), молекулярного водорода, этилового спирта, бутанола, ацетона и других растворителей, а также органических кислот. Несколько в стороне



от этих процессов стоит метод получения тепловой энергии при аэробной микробиологической деструкции твердой биомассы.

Основную часть воспроизводимой биомассы составляет древесина (лигноцеллюлоза), которая из-за особенностей своего строения с большим трудом поддается биологической конверсии. Поэтому в ближайшие годы основным сырьем для производства топлив методом биоконверсии будут служить легко трансформируемые органические соединения — отходы, образовавшиеся в результате промышленных и других переработок первичной биомассы. В развитых странах в год на одного человека приходится до 5 т органических отходов по сухому веществу. Многие из них представляют серьезную экологическую опасность и требуют незамедлительного обеззараживания, утилизации и уничтожения. С ростом производств и урбанизацией происходит концентрация этих отходов, что требует, с одной стороны, применения неотложных мер с целью их обезвреживания, с другой — позволяет применить прогрессивные технологии переработки с возможным вторичным получением топлива.

Для решения этих задач в ближайшее время будут использованы в основном два метода биологической конверсии органических отходов в топливо: 1) так называемое метановое брожение с получением биогаза; 2) спиртовое брожение с получением этанола. Это определено, во-первых, физическими характеристиками получаемых топлив, во-вторых, относительной простотой и низкой стоимостью технологий, конкурентоспособных с технологиями получения обычных топлив и, в-третьих, особенностями процессов, позволяющих эффективно обезвреживать и утилизировать отходы.

### **32.1. ПОЛУЧЕНИЕ БИОГАЗА**

Получение биогаза, основным компонентом которого (до 80—85 %) является метан, — сложный бактериальный процесс, протекающий в анаэробных условиях. В нем участвуют разнообразные по физиолого-биохимическим свойствам микроорганизмы. Венцом таких ассоциаций являются метаногены — древнейшие представители так называемых архебактерий.

#### **32.1.1. Свойства метанобразующих бактерий**

Полагают, что метанобразующие бактерии, или метаногены, возникли около 3,0—3,5 млрд. лет тому назад и достигли своего расцвета в архее.

Сейчас эти микроорганизмы имеют достаточно широкое распространение, приуроченное к анаэробным условиям. Вместе с другими бактериями они активно участвуют в деструкции органических веществ в различных экологических нишах: в болотном, речном и озерном иле, в осадках морей и океанов, в искусствен-

ных технических сооружений — метантенках, в рубце жвачных и пищеварительном тракте ряда других животных.

К настоящему времени удалось выделить в виде чистых культур более двадцати метанообразующих бактерий, причем обнаруживаются все новые виды.

Среди этих бактерий есть организмы, клетки которых близки к сферическим, образующие агрегаты, похожие на сарцин, ланцетовидные, палочковидные и нитевидные формы. Большинство неподвижны, но отдельные виды проявляют способность к движению в результате наличия жгутиков.

Как и другие архебактерии, метаногены отличаются от остальных прокариот (эубактерий) составом ряда компонентов клеток, в том числе клеточной стенкой, не содержащей муреина, а также характером липидов, в которые не входят жирные кислоты. Большую часть нейтральных липидов составляют простые эфиры глицерина и длинноцепочечного спирта фитанола.

В метаболизме метанообразующих бактерий участвует кофермент М (2-меркаптоэтансульфоновая кислота), фактор F<sub>420</sub>, представляющий собой особый флавин, и ряд других соединений, которые у остальных организмов не обнаружены или встречаются крайне редко. Но главное, что отличает метаногенов, как и других архебактерий, от остальных организмов, — это нуклеотидная последовательность в 16S рРНК, о чем свидетельствует изучение состава получаемых из нее олигонуклеотидов.

В то же время отдельные виды метанообразующих бактерий по этому показателю, а также содержанию ГЦ в ДНК (от 30,7 до 61,0 мол. %) могут отличаться весьма значительно. На этом основании их подразделяют на три порядка, включающих несколько семейств и родов. Наиболее изученными видами являются *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanobrevibacter ruminantium*.

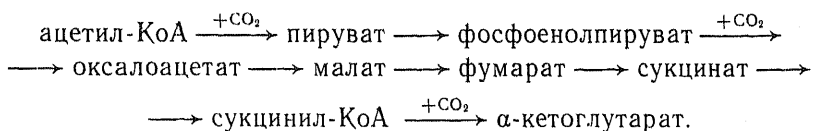
Все метанообразующие бактерии — строгие анаэробы. Некоторые из них мезофилы, другие, растущие при 60—80 °С и более высокой температуре, термофилы. К числу термофилов относится, например, *M. thermoautotrophicum*. Оптимальное значение рН для роста разных видов 6,5—8,0. Некоторые штаммы способны расти при наличии в среде до 5—7 % и более NaCl.

Как источник серы бактерии чаще всего используют сульфид, а как источник азота — аммоний. Некоторые виды нуждаются для роста в наличии дрожжевого автолизата или смеси витаминов. Известны также метанообразующие бактерии, для роста которых необходимо присутствие ацетата и (или) других органических веществ.

Но довольно многие из этих микроорганизмов могут расти в автотрофных условиях (при наличии в качестве единственного источника углерода углекислоты).

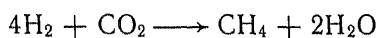
Ассимиляция углекислоты в автотрофных условиях, как показано для *M. thermoautotrophicum*, происходит особым нециклическим путем. Началом его является образование из углекислоты

C<sub>2</sub>-соединения в виде ацетил-кофермента А (КоА). Дальнейшее превращение ацетил-КоА включает следующие реакции:

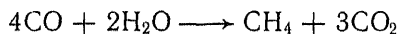


Образующиеся пируват, оксалоацетат, 2-кетоглутарат используются частично для синтеза аминокислот, а фосфоенолпируват — углеводов.

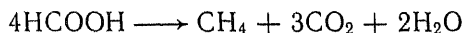
Субстратами, из которых большинство известных видов метаногенов образуют метан, служат молекулярный водород и углекислота:



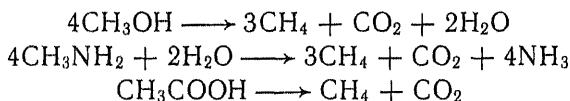
Ряд видов синтезируют метан из окиси углерода:



Некоторые виды образуют метан из муравьиной кислоты:



Известны метанобразующие бактерии, образующие метан из метанола, метиламина, диметиламина, триметиламина и (или) ацетата:



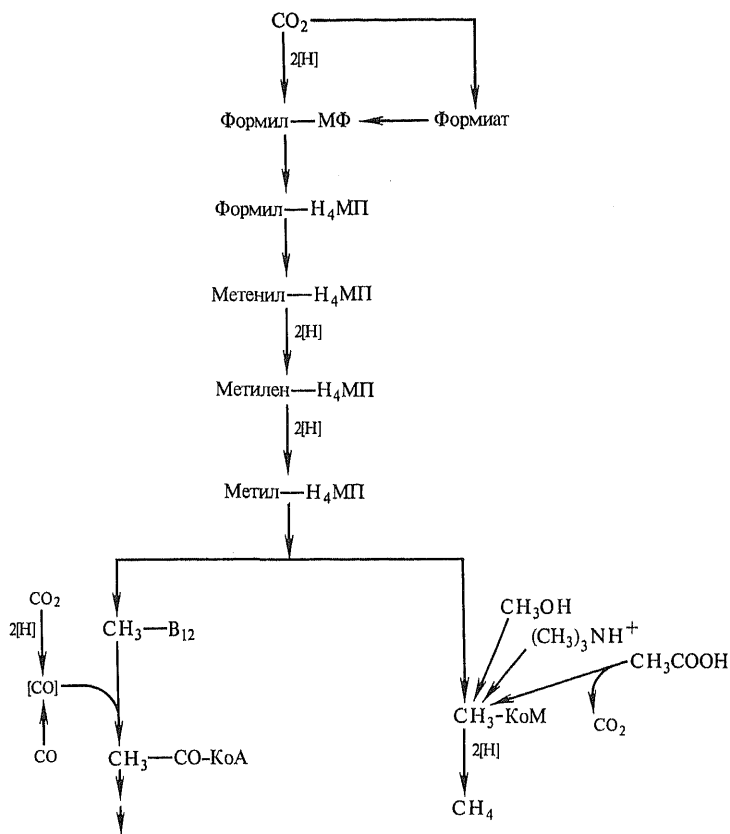
При превращении метилированных аминов, метанола и ацетата в метан в него переходит метильная группа субстрата.

Еще в 1956 г. известным биохимиком И. Х. Баркером предложена схема восстановления CO<sub>2</sub> в метан, которая сейчас детализирована (рис. 32.1). Эта схема послужила отправной точкой для формулирования гипотезы о том, что метанобразующие бактерии могут аккумулировать энергию в процессе окислительного фосфорилирования.

В исследованиях, проведенных с чистыми культурами разных видов метаногенов, установлено, что синтез метана протекает в мембранах, причем этот процесс сопряжен с генерацией трансмембранного потенциала, энергия которого трансформируется в АТФ.

Таким образом, метанобразующие бактерии, видимо, осуществляют (во всяком случае, когда окисляют H<sub>2</sub>) не брожение, а анаэробное дыхание, используя CO<sub>2</sub> в качестве акцептора электронов.

Но выход энергии на каждый образованный моль метана у метаногенов не превышает двух молей АТФ. Поэтому для обеспечения своего роста метанобразующие бактерии должны синте-



Вещества клеток

МФ — метилфуран

Н<sub>4</sub>МП — 5,6,7,8-тетрагидрометаноптерин

КоМ — кофермент М

КоА — кофермент А

Рис. 32.1. Схема образования метана из  $\text{CO}_2$  и других соединений

зировать значительные количества метана. Из 100 % метаболизированного соединения углерода они трансформируют в клеточный материал только 5—10 %, остальное конвертируется в метан.

Важная особенность метаногенов — способность активно развиваться в анаэробных условиях в тесном симбиозе с другими группами бактерий, создающими для них благоприятные условия и обеспечивающих необходимыми субстратами для роста и синтеза метана.

К микроорганизмам, образующим ассоциации с метаногенами, относится ряд представителей облигатных и факультативных

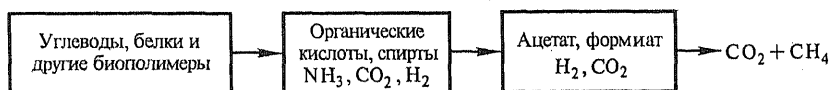


Рис. 32.2. Деструкция биополимеров до метана природными ассоциациями микроорганизмов

анаэробов, осуществляющих брожение различных высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ. Такие ассоциации функционируют в природных условиях, а также широко используются в практических целях.

Процессы, протекающие при анаэробном разложении органических веществ смешанными культурами микроорганизмов, включающими метаногенов, разделяют на две стадии. Первая стадия, часто происходящая в два этапа, ведет к образованию органических кислот, молекулярного водорода и  $\text{CO}_2$  как основных продуктов. Вторая стадия приводит к синтезу метана (рис. 32.2).

Образование ряда органических кислот в метантенках осуществляют бактерии семейств *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, а также представители родов *Clostridium*, *Butyrivibrio* и некоторых других способных к брожению. Активное участие в превращении таких органических соединений в уксусную кислоту принимает особая группа анаэробных бактерий — ацетогенов. Процесс разложения органических веществ смешанными культурами микроорганизмов в анаэробных условиях, заканчивающийся образованием  $\text{CH}_4$ , часто называют «метановым брожением», хотя этот термин не совсем правилен, поскольку сами метанобразующие бактерии многоуглеродные субстраты не сбраживают.

### 32.1.2. Технология получения метана

Технологически метановое брожение подразделяют на два этапа: созревание метанового биоценоза и ферментацию. В течение первого этапа развиваются бактерии, участвующие в анаэробном разложении исходных органических веществ и продуктов их распада. В результате деятельности этих микроорганизмов создаются оптимальные условия для активного биосинтеза метана.

Несмотря на сложность и далеко неполную изученность, такая биологическая система достаточно надежна и проста для получения биогаза в промышленных масштабах.

Метановое брожение жидких органических веществ осуществляется в строго анаэробных условиях при  $30\text{--}40\text{ }^\circ\text{C}$  (мезофильный процесс) или  $52\text{--}60\text{ }^\circ\text{C}$  (термофильный процесс). Ферментацию проводят в реакторах (метантенках) объемом от одного до нескольких тысяч кубических метров. Метантенки выполняются из железобетона или металла. Они могут иметь разную форму и конструкцию, от кубической до цилиндрической, расположены

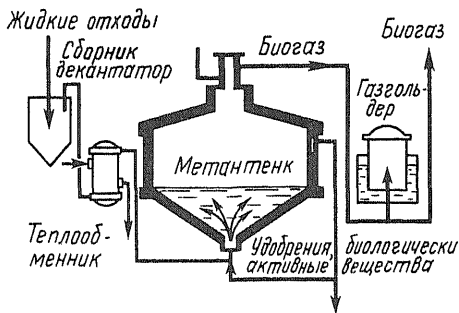


Рис. 32.3. Схема биогазовой установки

горизонтально или вертикально. Лучшей признается яйцеобразная конструкция. Ферментация протекает непрерывно, полупериодически и периодически. Схема биогазовых установок для переработки жидких субстратов представлена на рис. 32.3.

Сырье, содержащее 2—12 % органических веществ, подается в метантенк через теплообменник, где оно подогревается или

охлаждается до температуры ферментации в метантенке. Место введения сырья в реактор и отбора сброженной массы зависит от конструкции метантенка. Реакторы снабжаются мешалками для перемешивания бродящей массы с целью ускорения процессов и теплообменниками для поддержания необходимой температуры внутри реактора. Образующиеся газы удаляются через газовый колпак, расположенный в верхней части метантенка. Газ, содержащий 50—85 % метана и 15—50 %  $\text{CO}_2$ , по газопроводу поступает в газохранилище — газгольдер, откуда подается в газовую сеть.

Скорость процесса определяется температурой ферментации (в термофильных условиях она в 2—3 раза выше, чем в мезофильных), химическим составом сырья, его вязкостью, плотностью бактериальной ассоциации и степенью перемешивания. Ферментация протекает при значениях pH среды, равных 7,0—8,5. При более низком или высоком значении pH она обычно тормозится или прекращается совсем. Снижение величины pH среды («прокисание») связано с нарушением равновесия скоростей образования летучих жирных кислот (муравьиной, уксусной, особенно пропионовой, а также масляной) и дальнейшим их превращением, заканчивающимся образованием метана. Подобные дефекты вызываются, как правило, увеличением поступления в реактор легкображиваемых углеводов, а также нарушением соотношения углерода и азота в субстрате. Оптимальные значения соотношений C:N находятся в пределах 11—16:1. Повышение значений pH среды (> 8,5) связано либо с высокой концентрацией азотсодержащих органических веществ в субстрате и образованием из них в процессе брожения больших количеств аммония, либо наличием в среде значительных концентраций щелочно-земельных металлов.

Указанные нарушения процесса обычно устраняются остановкой загрузки ферментера новыми порциями сырья. В результате избыток образовавшихся жирных кислот постепенно конвертируется в метан, pH среды повышается до необходимых оптималь-

ных значений, и процесс продолжается. В некоторых случаях уменьшают объем загрузки сырья в реактор.

Важным моментом промышленной технологии получения метана является скорость поступления сырья в реактор или время выдерживания сырья в реакторе. Указанные параметры зависят прежде всего от скорости конверсии органических веществ в метан. Чем интенсивнее процесс брожения, тем выше скорость загрузки сырья в реактор, меньше время выдерживания сырья в реакторе и рентабельнее сам процесс. Существующие в настоящее время нормы скорости загрузки сырья находятся в пределах 7—20 % объема субстрата от рабочего объема ферментера в сутки. Следовательно, цикличность процесса равна 5—14 сут. Однако разработаны технологии, в которых цикличность сокращена до 5—15 ч, или скорость загрузки в пределах 150—400 % в сутки. С большей скоростью происходит образование метана при наличии хорошо растворимых и легко разлагаемых бактериями органических соединений (некоторые виды жидких отходов пищевой, микробиологической и других отраслей промышленности, перерабатывающих сельскохозяйственное сырье). Медленнее сбраживаются отходы сельскохозяйственного производства (животноводства и растениеводства), содержащие твердые органические включения.

Применяемые широко в настоящее время в практике метантенки относятся к реакторам первого поколения. В них все процессы протекают в одной емкости без разделения на стадии или фазы, бактериальные клетки находятся во взвешенном состоянии и, по мере нарастания удаляются вместе со сброженной массой. Важным условием нормального функционирования таких реакторов является необходимость поддержания равенства скоростей размножения бактерий и поступления сырья в реактор при условии, что концентрация органического вещества в сырье составляет не менее 2 %.

При меньших концентрациях органического вещества плотность бактериальных клеток на единицу объема реактора резко падает, и процесс практически останавливается.

Этот недостаток реакторов первого поколения полностью устраняется при использовании реакторов второго поколения, в которых бактерии при необходимой для процесса плотности находятся в закрепленном (иммобилизованном) состоянии. В реакторах второго поколения можно сбраживать субстраты с низким содержанием органических соединений (0,5 % сухих веществ) при высокой скорости пропускания через реактор (такие реакторы часто называют «анаэробными фильтрами»). В качестве носителей для закрепления бактерий широко используются галька, керамические, полихлорвиниловые, полиуретановые кольца и стекловолно. Применение реакторов второго поколения позволяет резко повысить процессы деструкции и соответственно снизить их объемы, что имеет важное значение при их широком производстве и эксплуатации.

В последние годы в практику внедряются технологии, основанные на разделении процесса метанового брожения на стадии — фазы: кислотную и метановую. Двухфазный процесс осуществляется в двух реакторах, соединенных последовательно. Скорость поступления сырья и объемы реакторов рассчитываются так, чтобы в первом протекала только стадия образования кислот, значение рН среды не должно быть выше 6,5. Такая бражка подается во второй реактор, в котором с большой скоростью протекает непосредственно образование метана. Двухфазный процесс позволяет увеличить его общую скорость в два-три раза. Иногда в практике при использовании двухфазного процесса с целью дополнительного получения товарного биогаза процесс брожения в первом ферментере проводят при 35—37 °С, во втором — при 55 °С. При нормальных условиях ферментации на каждую тонну сброженного органического вещества образуется до 300—600 м<sup>3</sup> биогаза. Процент разложения органических веществ до метана зависит от скорости процесса и времени выдерживания сырья в реакторе, обычно эта величина равна 30—60 %.

Концентрация метана в образующемся биогазе зависит от химического состава субстрата: углеводы дают больше углекислого газа, жиры — больше метана (до 85 %). Чем больше восстановлен субстрат, тем выше концентрация метана.

Метановое брожение — процесс эндотермический, требует постоянного подогрева для поддержания необходимой температуры ферментации. Как правило, метантенки и сырье подогреваются за счет сжигания образующегося биогаза. В среднем на поддержание требуемой температуры ферментации расходуется от 15—20 % (мезофильный процесс) до 30—50 % (термофильный процесс) биогаза. Поэтому одним из важных моментов эксплуатации метантенков является их хорошая теплоизоляция.

Рассмотренный выше процесс метанового брожения касался использования только жидких субстратов. В последние годы широкое развитие имеет технология твердофазной метангенерации, или получение биогаза, при деструкции органических веществ с влажностью 30—40 %. Такие процессы уже имеют практическое применение в США и некоторых странах Западной Европы, например, при переработке городского твердого мусора. Основное условие такого процесса — анаэробиз и необходимая влажность.

Биогаз кроме метана и углекислого газа может содержать примеси сероводорода (до 2 %), что требует его соответствующей очистки.

Теплотворная способность биогаза составляет 5—7 ккал/м<sup>3</sup> и зависит от концентрации в нем СО<sub>2</sub>. Один кубический метр биогаза эквивалентен 4 кВт/ч электроэнергии, 0,62 л керосина, 1,5 кг угля, 3,5 кг дров, 0,43 кг бутана. Он может быть использован для получения тепловой энергии, электроэнергии, заменить моторное топливо. Из биогаза можно получить «синтез-газ»



(смесь угарного газа и молекулярного водорода), из которого синтезируют метанол, или искусственный бензин.

Образующийся в процессе метанового брожения шлам (жидкий или твердый) является хорошим органо-минеральным удобрением. Он может также использоваться для производства ценных биологически активных соединений, применяемых в медицине и сельском хозяйстве.

Перечисленные выше физические особенности биогаза и относительная простота его получения, возможность использования в качестве сырья для его производства разнообразных отходов положительным образом отразились на создании и развитии биогазовой промышленности в ряде стран. Китайская Народная Республика в 1983 г. имела до 7 млн. биогазовых установок семейного типа с общим объемом реакторов около 60 млн. м<sup>3</sup>. Эти установки позволяют производить в год до 110 млрд. м<sup>3</sup> биогаза, заменить до 60—80 млн. т сырой нефти и обеспечить топливом до 30 млн. крестьян КНР.

В странах Европейского экономического сообщества в 1983 г. действовало 570 установок, использующих жидкие отходы, и 17 установок, перерабатывающих в биогаз твердый мусор.

В США широкое развитие получает производство биогаза при переработке городского твердого мусора. Например, в пригородах Нью-Йорка действует станция, производящая в год 100 млн. м<sup>3</sup> биогаза.

В СССР метановое брожение широко применяется в системе биологической очистки городских сточных вод на станциях аэрации. В метантенках сбрасывают осадки сточных вод и активный ил, образующийся в аэротенках. Две станции, обслуживающие город с населением 8 млн. человек, дают в год 110 млн. м<sup>3</sup> биогаза. Термофильное метановое брожение отходов микробиологической промышленности используют в нашей стране для производства биогаза и кормового препарата витамина В<sub>12</sub>. Два цеха, перерабатывающие жидкие стоки ацетоно-бутиловой промышленности, производят в год до 7 млн. м<sup>3</sup> биогаза и до 1 т витамина В<sub>12</sub>. В Венгерской Народной Республике мезофильное метановое брожение применяется для промышленного производства кристаллического препарата витамина В<sub>12</sub> медицинского назначения.

Промышленное получение биогаза из отходов — это первый шаг к созданию биогазовой промышленности. Постоянно растущая потребность в дешевой и технически удобном топливе ставит вопрос о получении биогаза из торфа, биомассы специально выращиваемых пресноводных и морских водорослей, а также быстрорастущих деревьев. Такие проекты уже проходят лабораторную и промышленную проверку.

### 32.2. ПОЛУЧЕНИЕ СПИРТОВ

Возможность широкого использования низших спиртов: метанола, этанола, бутанола, бутандиола, а также ацетона и других

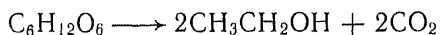
растворителей— в качестве моторного топлива для двигателей внутреннего сгорания и дизельных двигателей вновь вызвала большой интерес к получению перечисленных соединений биоконверсией из растительной биомассы.

Смесь этилового или метилового спиртов с бензином в отношении 10:90 или 20:80 под коммерческим названием «газо-хол» уже широко применяется в ряде стран для автомобильного транспорта.

В свете вышесказанного стоит конкретная задача по разработке конкурентоспособной промышленной технологии производства этанола для технических целей методами биоконверсии. Метиловый спирт предполагается производить из биомассы методом термохимической конверсии. Бутанол и бутандиол — хорошие заменители мазута, их также необходимо добавлять в качестве присадок к спиртово-бензиновым смесям для лучшего смешивания спиртов и углеводородов.

Микробиологическое получение этилового, бутилового спиртов и бутандиола из углеводов достаточно хорошо изучено и имеет многолетний промышленный опыт.

Этиловый спирт обычно получают из гексоз с помощью брожения, вызываемого дрожжами (см. гл. 21):



В качестве сырья используются меласса (отходы сахарного производства), зерновой, картофельный, кукурузный крахмал, который предварительно осахаривается.

Этиловый спирт образуют также в большом количестве бактерии, например из рода *Zygomonas* (*Z. mobilis*, *Z. anaerobica*), *Sarcina ventriculi* и *Erwinia amylovora*. Среди продуцентов этанола имеются и клостридии, к их числу относятся *Clostridium thermocellum* и *Cl. thermohydrosulphuricum*. В последнее время эти микроорганизмы интенсивно изучают, так как некоторые из них способны использовать в качестве сбраживаемого субстрата не только крахмал, но такой непригодной и дешевый продукт, как целлюлоза. Бутиловый спирт и ацетон в промышленности также получают с помощью клостридий (см. гл. 24).

Использование этанола и бутанола как моторных топлив требует их промышленного производства в объеме десятков миллионов тонн. Первая задача, которую необходимо решать в связи с поставленной целью, — это выбор непригодного, дешевого, массового и легкоконвертируемого сырья.

В некоторых странах (например, в Бразилии) для производства технического этанола используют отходы сахарного тростника — багассу, в других странах — маниок, батат, сладкое сорго, тапинамбур (земляная груша). Указанные культуры являются представителями южных растений. Для стран с умеренным климатом и обладающими большими лесными массивами дешевым сырьем для крупнотоннажного производства спиртов служит древесина.

Древесина может использоваться как сырье при условии разрушения структурных связей лигнина с целлюлозой и гидролизом последней до гексоз, т. е. требуется определенная химическая или биохимическая предобработка. Это сдерживает широкое использование древесины для получения спиртов, хотя в ряде стран, в первую очередь в Советском Союзе, в течение многих лет существует промышленное производство этилового спирта путем брожения гидролизатов древесины. Такой способ основан на кислотном или щелочном гидролизе древесины до гексоз, которые далее сбраживаются дрожжами до этанола. Но такая технология достаточно энергоемкая и требует использования коррозионно-устойчивого оборудования (основное препятствие ее широкого использования в практике).

Для возможного применения древесины в целях получения биопродуктов в настоящее время интенсивно разрабатываются различные технологии деструкции лигноцеллюлоз: механические (размалывание), физические (гамма-облучение), физико-химические (паровой взрыв, или парокрекинг), химические (гидролиз), биологические (ферментативный гидролиз) и различные комбинации перечисленных методов. К наиболее перспективным следует отнести сочетание «парокрекинга» с ферментативным гидролизом — это предварительная обработка лигноцеллюлоз или гемицеллюлоз паром при высокой температуре и высоком давлении, при котором происходит взрыв кристаллических структур указанных субстратов и отделение лигнина от целлюлозы с последующим гидролизом клетчатки целлюлозолитическими ферментами.

К растительным материалам, используемым для гидролитического получения сахара с последующей их биоконверсией в спирты, относят различные виды отходов лесопиления и деревообработки, сельскохозяйственного производства (солома, хлопчатник, кукурузная кочерыжка, подсолнечная лузга, костра льна, конопля, кенафа), тростник, малоразложившийся торф.

Из одной тонны древесины можно получить до 170—180 л этанола и 40 кг биомассы дрожжей, из тонны картофеля — 100 л этанола, из тонны зерна ржи — до 270 л этилового спирта.

Следовательно, одна тонна древесины при производстве этанола заменяет около 0,6 т зерна или 1,7 т картофеля.

Большие перспективы для использования целлюлозы в качестве сырья для получения самых разных продуктов открывает ферментативный гидролиз, осуществляемый комплексами целлюлаз и гемицеллюлаз, продуцируемых некоторыми грибами и бактериями. Гидролиз протекает при 40—60 °С и рН 4,0—7,0, не требует больших энергозатрат и коррозионностойкого оборудования.

Перспективы использования лигноцеллюлозы для получения этанола и других спиртов, а также иных органических соединений открывают широкие возможности не только для производст-

ва моторных топлив, но и для создания важной сырьевой базы для промышленного органо-химического синтеза, например для получения искусственного каучука по методу Лебедева.

### **32.3. ПОЛУЧЕНИЕ ТЕПЛОВОЙ ЭНЕРГИИ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОМ ОКИСЛЕНИИ**

Несколько в стороне от вышеописанных методов анаэробной биоконверсии биомассы в топливе стоит еще один микробиологический процесс получения энергии — аэробное окисление твердой биомассы (отходов) с выделением больших количеств тепла.

Твердое органическое сырье погужается в шахту, снизу подается воздух. В результате окислительных процессов, осуществляемых микроорганизмами, происходит интенсивное выделение тепловой энергии и проходящие газы нагреваются до 80 °С. С помощью компрессии температуру газов можно увеличить до 100—110 °С и получаемую энергию аккумулировать в виде горячей воды или пара. Коэффициент полезного действия установок с учетом затрат электроэнергии на эксплуатацию воздуходувок составляет 95 %. Такие установки промышленного типа работают в Японии. Образующийся шлам используется в качестве высокоэффективного органо-минерального удобрения.

Таким образом, биомасса при ее рациональном использовании может стать эффективным источником возобновления энергетических ресурсов с использованием микробиологических процессов. Однако вклад биомассы в общую энергетику большинства развитых стран не превысит 10 %, в отдельных странах он может составить 25—30 %, но не более, так как в противном случае она перестает быть возобновляемым источником. Более перспективным способом использования солнечной энергии является ее прямая конверсия в молекулярный водород при фотоллизе воды.

### **32.4. ПОЛУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА**

Молекулярный водород считается наиболее перспективным видом топлива. По энергоемкости (в расчете на единицу массы) он превосходит все другие соединения, которые можно использовать в этих целях. Сжигание молекулярного водорода не сопровождается загрязнением среды большим количеством вредных веществ и, более того, ведет к регенерации воды. Водород может храниться, транспортироваться и легко преобразуется в электроэнергию с помощью топливных элементов.

В настоящее время молекулярный водород используется в ряде областей химической промышленности. Особенно много его расходуется при переработке нефти, синтезе метанола, а также аммиака, соединения которого используются в качестве удобрений. Кроме того, молекулярный водород может обеспечивать как источник энергии рост ряда бактерий, некоторые из которых являются перспективными продуцентами биомассы, богатой бел-

ком, а также других практически важных продуктов. Среди микроорганизмов, способных использовать  $H_2$ , имеются аэробные и анаэробные виды, к последним, как уже говорилось, относятся многие метанобразующие бактерии.

Производство молекулярного водорода в развитых странах ежегодно составляет около 30 млн. т и продолжает увеличиваться.

Большую часть молекулярного водорода получают химическим путем, главным образом из природного газа (метана). Используют, кроме того, продукты газификации жидких и твердых топлив. Предложены также разные способы получения  $H_2$  из воды. К ним относятся методы паровой конверсии природного газа и электролиза  $H_2$ , имеющие практическое применение. Но все эти способы производства молекулярного водорода требуют большой затраты энергии и достаточно дороги. Помимо этого масштабы получения  $H_2$  из метана и ряда других веществ ограничиваются их запасами. Поэтому изыскание других, более дешевых способов получения молекулярного водорода и расширения на их основе его производства, а также областей применения является актуальной проблемой.

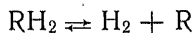
В последние годы большое внимание привлекают к себе микроорганизмы, способные к образованию  $H_2$  в процессе своей жизнедеятельности. Таких микроорганизмов известно довольно много, обнаруживаются все новые виды, выделяющие молекулярный водород. Среди них есть и хемотрофы, и фототрофы.

### 32.4.1. Образование молекулярного водорода хемотрофами

К числу хемотрофов, образующих в значительном количестве молекулярный водород, относится прежде всего ряд облигатных и факультативных анаэробных бактерий. Кроме того,  $H_2$  выделяют некоторые простейшие (главным образом из числа трипанозом), растущие в анаэробных условиях. Показана также возможность образования молекулярного водорода азотфиксирующими аэробами, например азотобактером.

В наибольшем количестве молекулярный водород выделяют бактерии, осуществляющие брожение разных органических веществ, но чаще всего углеводов.

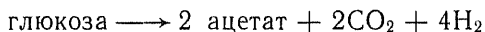
Фермент, катализирующий выделение хемотрофами при брожениях  $H_2$ , гидрогеназа осуществляет следующую обратимую реакцию:



где R — переносчик электронов, взаимодействующий с гидрогеназой. Переносчиком может быть ферредоксин или другое соединение.

К числу наиболее активных продуцентов  $H_2$  относятся отдельные виды клостридий (например, *Clostridium butyricum*, *C. perf-*

*ringens*), энтеробактерий (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*), *Ruminococcus* и некоторых других родов. Однако даже у самых активных продуцентов  $H_2$  его количество не превышает 4 молей на моль сброженного сахара:



КПД преобразования энергии в этом случае составляет не более 33 %, а практически бывает еще ниже, тогда как при переработке органических веществ в метан он может достигать 85 %.

Поэтому получение молекулярного водорода в результате брожения вряд ли найдет широкое применение даже в тех странах, где много дешевого растительного сырья. Однако если выделение хемотрофами  $H_2$  сочетается с образованием двух полезных продуктов, то такой способ его получения может использоваться. Примером является ацетонно-бутиловое брожение, сопровождающееся выделением  $H_2$ , давно имеющее практическое применение. Возможно также использование водородобразующих бактерий для разложения некоторых вредных веществ, попадающих в стоки, например формиата, до  $CO_2$  и  $H_2$ .

Кроме того, хемотрофные бактерии, выделяющие  $H_2$ , входят в состав ассоциаций микроорганизмов, которые разлагают разные органические субстраты с образованием метана. В связи с этим важно знать их особенности, для того чтобы повысить активность и соответственно скорость выделения  $H_2$ , так как он служит одним из субстратов для образования метана.

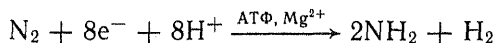
### 32.4.2. Образование молекулярного водорода фототрофами

Из фототрофных организмов способность к выделению  $H_2$  проявляют многие пурпурные бактерии, цианобактерии и ряд водорослей. Среди последних есть не только микро-, но и макроформы. Есть данные о выделении в небольшом количестве  $H_2$  и высшими растениями.

Пурпурные бактерии осуществляют так называемый аноксигенный фотосинтез (фотосинтез без выделения молекулярного кислорода). Объясняется это тем, что они не могут использовать воду при фотоассимиляции  $CO_2$  и в других конструктивных процессах в качестве исходного донора электронов; такую функцию у них выполняют сульфид, сера, тиосульфат, органические вещества или  $H_2$ .

Анаэробное окисление многими пурпурными бактериями органических веществ и неорганических соединений серы в определенных условиях ведет к образованию ими  $H_2$ . Особенно в большом количестве эти микроорганизмы выделяют молекулярный водород в присутствии света. Поэтому данный процесс часто называют фотовыделением водорода. В отличие от образования  $H_2$  при брожении фотовыделение  $H_2$  пурпурными бактериями катализирует обычно не гидрогеназа, а нитрогеназа — фермент, глав-

ная функция которого заключается в превращении  $N_2$  в аммиак. Но даже при наличии  $N_2$  часть электронов, поступающих к нитрогеназе, расходуется на восстановление протонов, что ведет к выделению  $H_2$ :



К фотовыделению  $H_2$  способны растущие культуры, суспензии клеток, а также иммобилизованные клетки пурпурных бактерий. Некоторые субстраты, например ацетат, лактат, малат, глюкоза, могут полностью разлагаться клетками этих микроорганизмов до  $CO_2$  и  $H_2$ .

К числу наиболее активных продуцентов  $H_2$  относятся некоторые штаммы *Rhodobacter capsulatus*. Растущие культуры этой бактерии, используя лактат, выделяют в некоторых условиях  $H_2$  со скоростью 300—500 мл  $ч^{-1} \cdot г^{-1}$  сухой биомассы. При использовании клетками пурпурных бактерий 1 кг лактата можно получить до 1350 л  $H_2$ . КПД конверсии энергии света при образовании пурпурными бактериями  $H_2$  достигает 2,0—2,8 %.

Среди цианобактерий также обнаружены штаммы, выделяющие при наличии света  $H_2$  в довольно большом количестве и со значительной скоростью (30—40 мл  $ч^{-1} \cdot г^{-1}$  сухой биомассы). К таким организмам относятся в основном нитчатые формы, образующие особые клетки — гетероцисты (например, *Anabaena cylindrica*, *A. variabilis*, *Mastigocladus thermophilus*, *M. laminosus*).

Выделение  $H_2$  чаще всего отмечается у суспензий клеток, причем может продолжаться 30 сут и более. Такую же способность проявляют иммобилизованные клетки микроорганизмов. В отличие от пурпурных бактерий для образования  $H_2$  цианобактериями не требуется каких-либо экзогенных доноров электронов, кроме воды. Важно также, что нитчатые формы бактерий, образующие гетероцисты, и некоторые одноклеточные виды способны выделять  $H_2$  не только в анаэробных, но и в аэробных условиях.

Фотообразование цианобактериями  $H_2$ , как и у пурпурных бактерий (за редким исключением) катализирует нитрогеназа. Этот фермент очень чувствителен к молекулярному кислороду. Но у цианобактерий, выделяющих  $H_2$  в аэробных условиях, он защищен от инактивирующего действия  $O_2$  разными способами. У нитчатых форм, образующих гетероцисты, нитрогеназа локализуется в основном в этих специализированных клетках, которые в процессе фотосинтеза молекулярный кислород не выделяют.

КПД преобразования энергии света в  $H_2$  у цианобактерий по имеющимся расчетам может достигать около 10 %.

Выделение молекулярного водорода водорослями обнаружено лишь у суспензий клеток и в небольшом количестве, кроме того, процесс не стабилен. Одной из главных причин этого является инактивация гидрогеназы, катализирующей образование водородослями  $H_2$ , под действием молекулярного кислорода, который они выделяют при фотосинтезе.

Из вышесказанного следует, что из разных фототрофов наиболее просто использовать в качестве продуцентов водорода пурпурные бактерии. Но масштабность процесса получения с их помощью  $H_2$  ограничивается запасами и ценой тех субстратов (органических веществ или неорганических соединений серы), которые могут разлагаться с выделением молекулярного водорода.

Более перспективны в данном отношении цианобактерии, поскольку выделение ими  $H_2$  связано с биофотолизом воды, которая пока остается наиболее дешевым и доступным субстратом. Не прекращаются работы и с водорослями, так как они также способны выделять  $H_2$  при разложении воды. Предлагается, кроме того, использовать комплексные системы, образующие  $H_2$ , в которые входят разные фототрофы или фототрофы и хемотрофы.

Показана также принципиальная возможность получения  $H_2$  из воды с помощью хлоропластов при добавлении к ним гидрогеназы и некоторых других компонентов, хотя скорость выделения водорода и стабильность такой системы невелики. Но исследование образования  $H_2$  подобными модельными системами может помочь созданию аналогичных искусственных катализаторов для преобразования солнечной энергии в молекулярный водород.

Наконец, следует отметить интерес к некоторым ферментам, образуемым фототрофами и хемотрофами, выделяющими  $H_2$ , прежде всего к гидрогеназам. Помимо использования для получения  $H_2$ , гидрогеназы могут быть применены в других практически важных целях, включая восстановление кофакторов, например НАД, требующихся в некоторых производственных процессах, при синтезе соединений, меченных дейтерием и тритием, а также в топливных элементах.

Таким образом, хотя микробиологический способ получения молекулярного водорода еще не реализован, но работы в данном направлении развиваются и аспекты исследований водородобразующих видов микроорганизмов достаточно широки.

## Глава 33 БИОГЕОТЕХНОЛОГИЯ МЕТАЛЛОВ

Биогеотехнология металлов — это наука об извлечении металлов из руд, концентратов, горных пород и растворов под воздействием микроорганизмов или их метаболитов при нормальном давлении и температуре (от 5 до 80—90°C). Составными ее частями являются: 1. Биогидрометаллургия, или бактериальное выщелачивание металлов. 2. Обогащение руд. 3. Биосорбция металлов из растворов.

### 33.1. БАКТЕРИАЛЬНОЕ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МЕТАЛЛОВ

Бактериальное выщелачивание металлов — это извлечение отдельных химических элементов из руд, концентратов и горных пород с помощью бактерий или их метаболитов. Извлечение со-



вмещается с выщелачиванием металлов слабыми растворами серной кислоты бактериального и химического происхождения, а также растворами, содержащими  $\text{Fe}^{3+}$ , органические кислоты, белки, пептиды, полисахариды и другие вещества. В основе выщелачивания лежит процесс окисления (растворения) минералов и перевод химических элементов (цветные, редкие) из нерастворимого в растворимое состояние.

Кроме бактерий в выщелачивании металлов, по последним данным, могут принимать участие и другие микроорганизмы. Однако возможность их применения в технологических процессах изучена недостаточно. Поэтому принято обычно говорить о бактериальном выщелачивании металлов.

Выщелачивание металлов из руд известно с давних времен. В 1566 г. в Венгрии осуществляли полный цикл выщелачивания меди с использованием системы орошения. В Германии выщелачивание меди из отвалов практиковалось с XVI в. Еще в 1725 г. в Испании на руднике Рио-Тинто выщелачивали медные руды. На территории СССР кучное выщелачивание осуществлялось в Кедабеке (Азербайджанская ССР) в конце прошлого столетия, в 30—50-е годы на Урале практиковалось подземное выщелачивание меди из руд. Это были первые шаги практического применения бактериального выщелачивания, механизм которого (участие бактерий) не был известен. Масштабы этой технологии, известно, были небольшие. В 1947 г. американскими микробиологами Колмером и Хинклем был выделен из рудничных вод ранее неизвестный микроорганизм *Thiobacillus ferrooxidans*, окисляющий сульфидные минералы,  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{S}^0$ . В середине 50-х годов исследования этого микроорганизма были начаты в СССР. При обследовании рудных месторождений было показано, что число клеток этой бактерии в зоне окисления достигает от 1 млн. до 1 млрд. в 1 г руды или 1 мл воды.

Позже, в 70-е годы, в зонах окисления сульфидных руд были обнаружены и другие мезофильные и термофильные бактерии, окисляющие  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{S}^0$  и сульфидные минералы.

Была доказана биогенная природа окислительных процессов в сульфидных месторождениях и выщелачивания металлов в природных условиях при температуре до 80—90 °С. Первый патент на использование *T. ferrooxidans* для выщелачивания металлов из руд и концентратов был получен в США в 1958 г.

В настоящее время бактериальное кучное и подземное выщелачивание используется для добычи меди и урана в промышленных масштабах во многих странах (США, Канада, Австралия, Испания и др.) и внедряется в практику добычи меди на ряде рудников в СССР.

Разрабатываются также бактериальные методы чанового выщелачивания металлов из концентратов и горных пород. Почему же возникла необходимость использовать микроорганизмы в гидрометаллургии?

Обеспеченность минеральным сырьем является одним из опре-

деляющих факторов научно-технического прогресса. Однако ископаемые ресурсы Земли хотя и велики, но не безграничны и невозполнимы. По имеющимся сведениям, даже при сохранении нынешних масштабов использования металлов (например свинец, медь, цинк, олово, золото, серебро, уран) их разведанные запасы, имеющие промышленное значение, будут истощены еще в этом столетии. Для обеспечения растущих потребностей человечества в металлах возможны следующие меры: разработка месторождений, залегающих на больших глубинах; переход к эксплуатации более бедных, а также более мелких месторождений; утилизация отходов; переработка горных пород с низким содержанием ценных элементов. Уже сейчас возникла необходимость использовать сложные по составу руды и концентраты, которые не поддаются переработке традиционными способами.

Кроме того, в современной металлургии возникают трудности другого рода: значительно возросли требования к технологическим процессам в связи с задачами охраны окружающей среды. Возникла необходимость полной очистки стоков от тяжелых металлов. Решить эти проблемы позволяют микроорганизмы.

### 33.1.1. Микроорганизмы, важные для гидрометаллургии

Как уже отмечалось выше, в основе бактериального выщелачивания металлов лежит процесс окисления сульфидных минералов и перевод металлов из нерастворимого в растворимое состояние. Перечень микроорганизмов, важных для гидрометаллургии, приведен в табл. 33.1.

Наиболее широко используется в практике добычи металлов *T. ferrooxidans* — граммотрицательная палочковидная бактерия (0,3—0,5 × 0,7—1,5 мкм) с полярным жгутиком (рис. 33.1,А), аэроб, оптимальная температура роста разных штаммов 28—35°C.

Оптимальные значения pH среды 2,0—2,5. Большинство штаммов — облигатные автотрофы, т. е. используют в качестве единственного или основного источника углерода углекислоту. Источниками энергии, как и для других тиобацилл, могут служить сульфидный и сульфитный ионы ( $S^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$ ), сера, тиосульфат. Кроме того, *T. ferrooxidans* использует в качестве источника энергии соли двухвалентного железа, окисляет  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$ . Он способен также окислять практически все известные сульфидные минералы,  $Cu^+$ ,  $U^{4+}$  и, вероятно,  $Se^{2-}$ ,  $Sb^{3+}$  при pH 1,0—4,8 (оптимум 1,8—2,2) и температуре 5—35°C.

Второй облигатно автотрофной бактерией, окисляющей  $Fe^{2+}$ , является *Leptospirillum ferrooxidans* (рис. 33.1,Б). Эта небольшая спирилла по ряду свойств похожа на *T. ferrooxidans*. Однако элементную серу и сульфидные минералы не окисляет. Но при наличии *Thiobacillus thiooxidans* или *T. organoparus* (синоним *T. acidophilus*), окисляющих элементную серу, такой процесс

Т а б л и ц а 33.1. Микроорганизмы, важные для гидрометаллургии, и перспективные сферы их применения

Микроорганизмы	Источник энергии и оптимальные условия	Перспективные сферы применения
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Сульфидные минералы, сера, $Fe^{2+}$ ; pH 1,8—2,2; $t$ 28—35 °C	Кучное, подземное и чановое выщелачивание металлов из сульфидных и смешанных руд и концентратов, из отходов пирометаллургического производства; обессеривание углей
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	$Fe^{2+}$ ; pH 1,8—2,2; $t$ 28—35°	
<i>L. ferrooxidans</i> в бинарной культуре с <i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>T. organoparus</i> ( <i>T. acidophilus</i> )	Сульфидные минералы, сера, $Fe^{2+}$ pH 1,5—2,5; $t$ 28—35°C	
Термофильные бактерии, близкие к тиобациллам	Сульфидные минералы, pH 1,6—2,2; $t$ 30—55°C	
<i>Sulfobolus brierleyi</i>	Сульфидные минералы, pH 1,5—2,0 $t$ 45—75 °C	
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	Сульфидные минералы; pH 1,7—3,5; $t$ 28—60° (оптимум 45—50 °C)	
Нитрифицирующие бактерии	Окисление $NH_4^+$ и $NO_2^-$ ; pH 7,5—8,0; $t$ 25—30°C	Переработка марганцевых и алюмосиликатных материалов
Гетеротрофные микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности (сульфатредуцирующие, денитрифицирующие и другие бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы)	Окисление органических веществ; pH 2,0—9,0; $t$ до 80°C	Извлечение химических элементов из карбонатных и силикатных руд, горных пород, выщелачивание золота. Использование биомассы и продуктов жизнедеятельности бактерий при флотации руд, селективном извлечении металлов из растворов (биомасса, полисахариды, другие органические соединения)

происходит. Имеются также данные, свидетельствующие о том, что некоторые штаммы *L. ferrooxidans* и в монокультуре способны окислять пирит ( $FeS_2$ ).

Недавно выделен еще один прокариотный микроорганизм, окисляющий  $Fe^{2+}$ ,  $S^0$  и сульфидные минералы при pH 1,7—3,5 и температуре до 60 °C (оптимум 45—50 °C). Этот микроорганизм получил название *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (рис. 33.1, B). В культуре доминируют палочки с размерами 0,6—0,8 × 1,0—3,0 мкм. Способны ветвиться, встречаются также кокковидные, клиновидные и булавовидные клетки. Неподвижные клетки образуют эндоспоры. Грамположительные. Для активного роста нуждаются в дрожжевом экстракте, который добавляют в количестве 0,02 %. Аэроб.

Кроме того, окислять  $S^0$ ,  $Fe^{2+}$  и сульфидные минералы способны некоторые представители родов *Sulfobolus* и *Acidianus*,

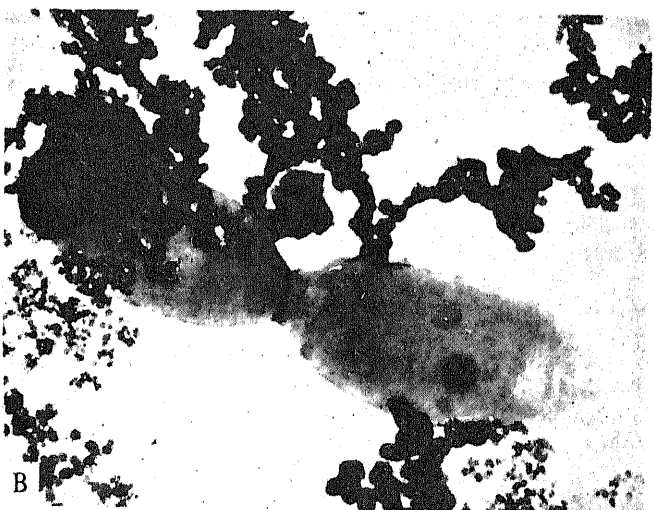
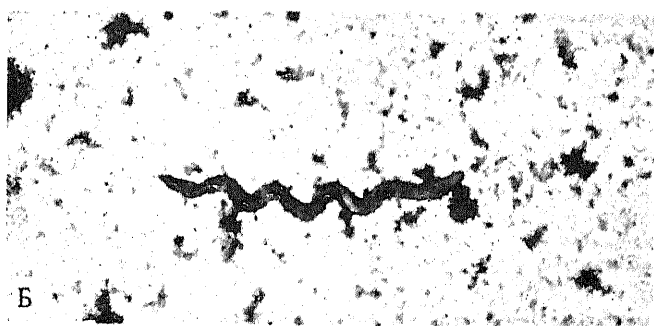
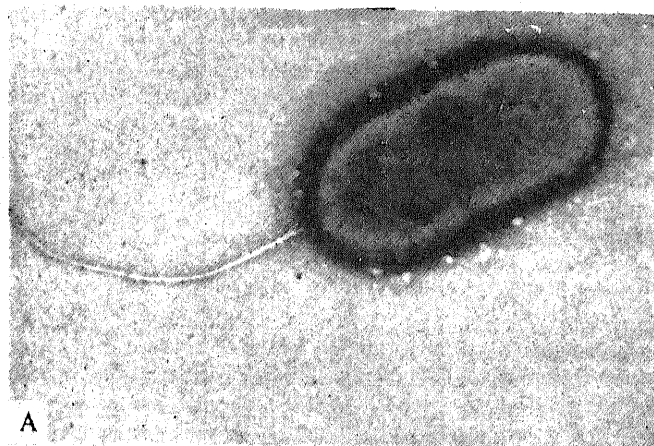


Рис. 33.1. Микроорганизмы, важные для гидрометаллургии:  
А — *Thiobacillus ferrooxidans*; Б — *Leptospirillum ferrooxidans*;  
В — *Sulfolobus thermosulfidooxidans*

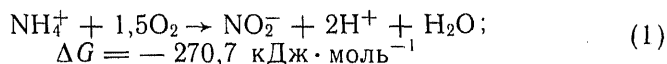
относящихся к архебактериям. Клетки этих бактерий бывают сферические (0,8—1,5 мкм в диаметре), в виде многогранников или неправильной формы, неподвижные. Термофилы, аэробы. Оптимальная температура для роста 70—75 °С, оптимум рН 2,0—3,0. Относятся к факультативным автотрофам.

Известен также ряд штаммов термофильных бактерий (ТН 1, 2, 3), похожих на тиобацилл, окисляют  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{S}^0$  и сульфидные минералы при рН 1,4—3,0 (оптимум 1,6—2,2) и температуре 30—55 °С.

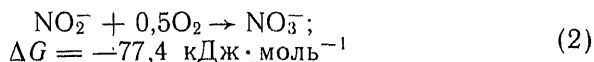
Процессы окисления неорганических субстратов служат для этих бактерий источником энергии. Углерод для синтеза органического вещества клетки получают из  $\text{CO}_2$ , а другие элементы — из руд. Практически все термоацидофильные бактерии для активного роста нуждаются в добавках дрожжевого экстракта (0,02 %). Могут расти и на некоторых органических субстратах. Однако в смешанных культурах с другими хемолитоавтотрофными бактериями, например с *L. ferrooxidans* и *T. ferrooxidans*, они не нуждаются в добавках органических веществ. Это свидетельствует о тесных метабиотических связях бактерий в рудах.

Нитрифицирующие бактерии проявляют активность в разрушении некоторых алюмосиликатов, а также в выщелачивании марганца из карбонатных руд. Это высокоспециализированная группа хемолитоавтотрофных бактерий, осуществляющая окисление  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{NO}_2^-$ .

Аммонийокисляющие бактерии осуществляют первую стадию нитрификации:



Нитритокисляющие бактерии осуществляют вторую фазу нитрификации:

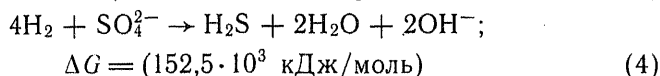
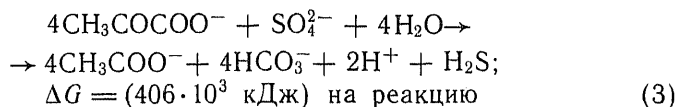


Это одноклеточные, неспорообразующие бактерии, строгие аэробы, грамотрицательные. Оптимальное значение рН 7,5—8,0, температура 25—30 °С. Известны следующие роды нитрифицирующих бактерий: I — *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrospirilla*, *Nitrosolobus*; (осуществляющие первую фазу нитрификации); II — *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* и *Nitrospira*, осуществляющие вторую фазу нитрификации. Некоторые штаммы могут расти в миксотрофных условиях.

Денитрифицирующие бактерии представляют интерес для биосорбции металлов из растворов и очистки сточных вод от нитратов при выщелачивании. Способность к денитрификации свойственна многим видам бактерий. Наиболее активными денитрификаторами являются представители родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes* и *Bacillus*. Они, как правило, являются факультативными анаэробами и используют в качестве акцепторов электронов

O<sub>2</sub> или соединения азота (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N<sub>2</sub>O), восстанавливающиеся до N<sub>2</sub>. Донорами электронов могут быть различные органические соединения, молекулярный водород и восстановленные соединения серы.

Сульфатредуцирующие бактерии используют органические вещества (лактат, пируват, малат, фумарат, этанол и др.) и молекулярный водород в качестве доноров электронов. Акцепторами электронов служат сульфаты, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, реже S<sup>0</sup>. Строгие анаэробы. Восстанавливают SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> до H<sub>2</sub>S по схеме:



Сероводород бактериального происхождения активен в сульфидизации окисленных форм минералов, в осаждении металлов из растворов и т. д. Известно несколько родов сульфатовосстанавливающих бактерий. Например, представители рода *Desulfovibrio* — вибрионы, спириллы и сигмоидные формы, подвижные, грамотрицательные. Бактерии рода *Desulfotomaculum* — палочки, образуют споры. Другие роды (*Desulfomonas*, *Desulfobulbus*, *Thermosulfobacterium*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium*) включают бактерии различной формы и размеров. Имеются подвижные и неподвижные формы (например, *Desulfomonas*). Встречаются мезофильные и термофильные формы. Оптимум pH для роста около 7,0.

Ряд гетеротрофных микроорганизмов (мицелиальные грибы, дрожжи, бактерии) способны разрушать минералы горных пород благодаря выделению органических кислот, полисахаридов и других метаболитов, в широком диапазоне значения pH среды (2,0—9,0) и при температуре до 80—90 °C. Например, *Bacillus mucilaginosus*, *B. megaterium* и ряд других бактерий способны растворять силикатные минералы, разрушая силоксанную связь Si—O—Si. В деструкции силикатов активны грибы *Aspergillus niger*, *Scopulariopsis* sp., *Penicillium notatum* и другие микроорганизмы. Специфичность процессов определяется как характером выделяемых метаболитов, так и физико-химическими особенностями минералов. В качестве источника энергии и углерода гетеротрофы используют органические вещества.

### 33.1.2. Механизм бактериального окисления сульфидных минералов, Fe<sup>2+</sup> и S<sup>0</sup>

Бактериальное окисление сульфидных минералов происходит в тесном контакте с бактериями. Сложный процесс, включающий адсорбцию бактерий на их поверхности, деструктирование кри-

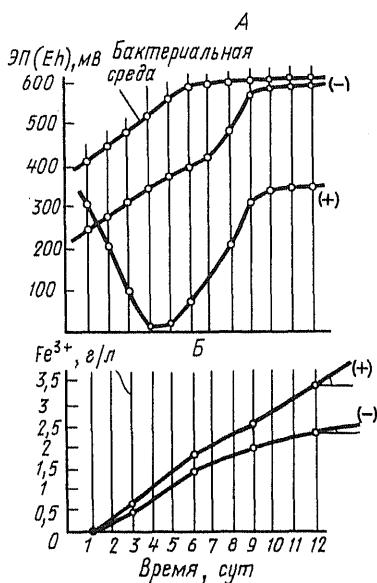


Рис. 33.2. Изменение электродного потенциала (ЭП) пирита с положительной (+) и отрицательной (-) проводимостью при окислении его *Thiobacillus ferrooxidans* и Eh среды (рН 2,5) (А); выщелачивание Fe<sup>3+</sup> из пирита (Б)

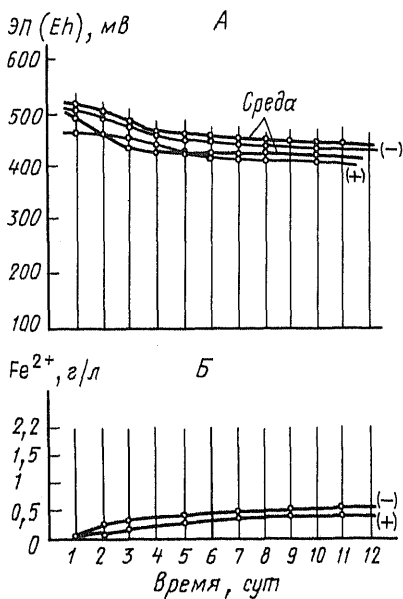
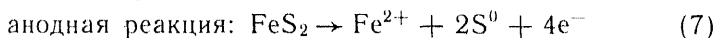
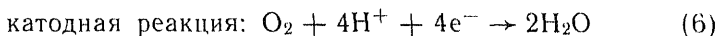
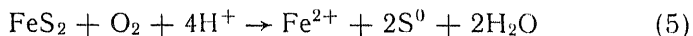


Рис. 33.3. Изменение ЭП пирита с положительной (+) и отрицательной (-) проводимостью и Eh среды без бактерий (рН 2,5) (А); выщелачивание Fe<sup>2+</sup> из пирита (Б)

сталлической решетки минералов, транспорт в клетку окисляемых элементов и их ферментативное окисление, получил название прямого бактериального окисления сульфидных минералов. По современным представлениям, оно осуществляется по законам электрохимической коррозии и зависит от состава и структуры минералов.

После прикрепления к минералам бактерии пассивируют их поверхность, увеличивая гидрофильность ее, и воздействуют на электродный потенциал (ЭП). Так, при окислении пиритов разного типа ЭП снижается в сравнении с контролем (без бактерий), а окислительно-восстановительный потенциал среды (Eh) возрастает (рис. 33.2 и 33.3).

Разница между Eh и ЭП составила в случае FeS<sub>2</sub><sup>+</sup> около 600 мВ и в случае FeS<sub>2</sub><sup>-</sup> — около 200 мВ. При уменьшении этой разницы окислительный процесс замедляется. Это особенно отчетливо видно при окислении FeS<sub>2</sub><sup>-</sup> (рис. 33.2, А, Б) по вероятной реакции:



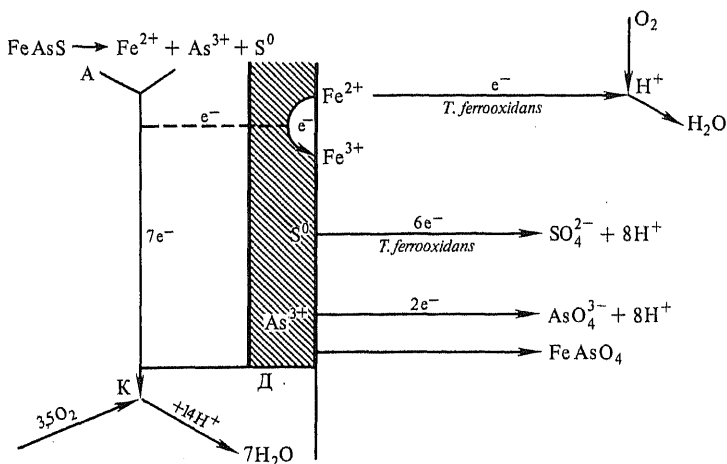
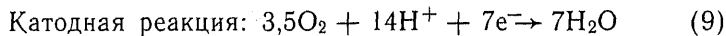
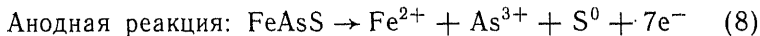


Рис. 33.4. Модель бактериально-химического окисления арсенопирита *Thiobacillus ferrooxidans*. А — анод; К — катод; Д — диффузионный слой

Без бактерий, когда ЭП пирита и Eh среды близки, окисление его не происходит (рис. 33.3, А, Б). Отсутствие разницы между ЭП и Eh свидетельствует об энергетическом равновесии между средой и минералом, а следовательно, и о невозможности окисления последнего в таких условиях.

Эта закономерность, подтвержденная и на других сульфидных минералах — арсенопирит, халькопирит и др., свидетельствует об электрохимической сущности бактериального окисления сульфидных минералов. Схематическую модель бактериального окисления сульфидов можно рассмотреть на примере окисления арсенопирита (рис. 33.4).

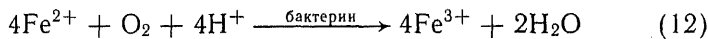
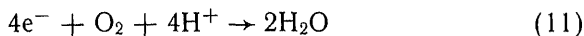
Реакции, происходящие на поверхности минерала в диффузионном слое, могут быть представлены в следующем виде:



Бактерии ускоряют этот электрохимический процесс несколькими путями.

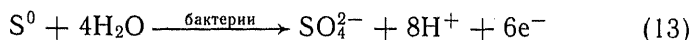
1. Прикрепляясь к поверхности сульфидных минералов, бактерии снижают ЭП и повышают Eh, создают резко окислительную обстановку в среде.

2. Окисляют  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{S}^0$  до конечных продуктов:



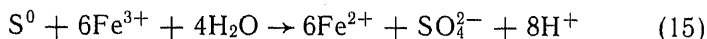
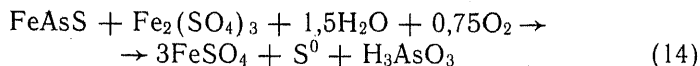
$$\Delta G = -74,4 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$$





Аналогичный механизм окисления характерен и для халькопирита ( $CuFeS_2$ ).

Окисление  $Fe^{2+}$  и  $S^0$  происходит непосредственно в диффузионном слое, соответствуя реакциям 8—13. Это способствует также быстрому взаимодействию  $Fe^{3+}$  с минералами и серой по реакциям:

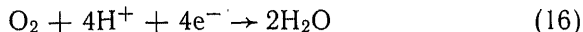


Это так называемый косвенный механизм окисления сульфидных минералов. Прямой механизм бактериального окисления таких сульфидных минералов, как халькозин ( $Cu_2S$ ) или сфалерит ( $ZnS$ ), имеет электрохимическую природу и связан с ферментативным окислением (в случае  $Cu_2S - Cu^+$  и  $S^{2-}$ ; а в случае  $ZnS - S^{2-}$ ).

Электрохимическая природа бактериального окисления сульфидных минералов особенно отчетливо проявляется при их совместном присутствии, когда создаются гальванические пары (табл. 33.2).

Бактерии прежде всего окисляют минералы, имеющие более низкий ЭП, т. е. анодные минералы, находящиеся на более низком энергетическом уровне.

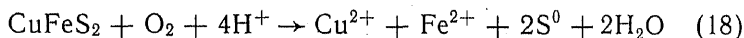
Например, при контакте пирита (ЭП = 0,6 В) с халькопиритом (ЭП = 0,5 В) последний корродируется активнее. Кислород восстанавливается на поверхности пирита (катод):



Халькопирит (здесь анод) окисляется по схеме



Следовательно, гальваническую реакцию можно представить уравнением



Т а б л и ц а 33.2. Окисление *T. ferrooxidans* сульфидных материалов при их взаимодействии

Минералы в концентратах	Электродные потенциалы, В	Минерал, окисляемый бактериями в первую очередь
$CuFeS_2$ } $FeAsS$ }	0,76—0,77 0,62—0,64	$FeAsS$
$CuFeS_2$ } $ZnS$ }	0,60—0,68 0,23—0,43	$ZnS$
$FeS_2$ } $CuFeS_2$ }	0,60 0,50	$CuFeS_2$

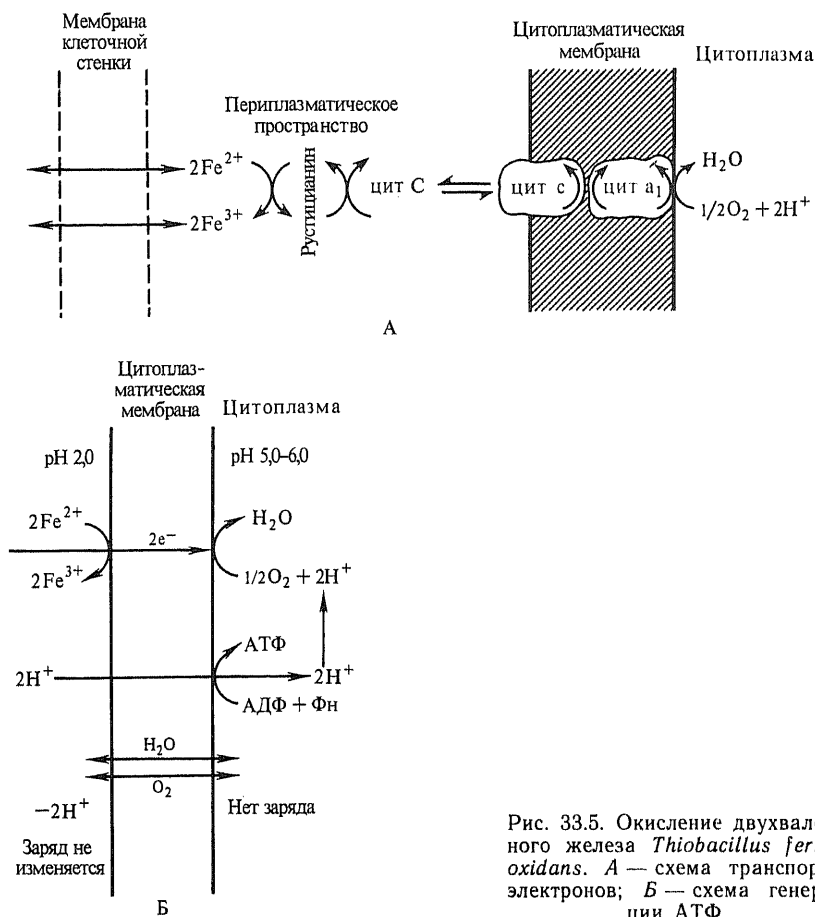


Рис. 33.5. Окисление двухвалентного железа *Thiobacillus ferrooxidans*. А — схема транспорта электронов; Б — схема генерации АТФ

Бактерии дальше окисляют Fe<sup>2+</sup> и S<sup>0</sup> по реакциям 12 и 13.

При окислении ZnS и CuFeS<sub>2</sub> в концентрациях ЭП сфалерита изменялся от 430 мВ при рН 1,5 до 230 мВ при рН 2,3, в то время как ЭП халькопирита составляет 600 мВ при рН 1,5 и 680 мВ при рН 2,3. В такой системе более активно окисляется сфалерит, причем при повышении рН создаются более благоприятные условия для этого процесса.

Механизм окисления Fe<sup>2+</sup>, S<sup>2-</sup> и S<sup>0</sup> бактериями также изучается. При окислении двухвалентного железа по реакции 12 оно поступает в периплазматическое пространство клетки, где электрон, по данным Ингледью, акцептируется медьсодержащим белком рустацианином, а затем переносится по цитохромной цепи через цитоплазматическую мембрану (рис. 33,5, А). При переносе двух электронов на мембране возникает потенциал в 120 мВ, а при транспорте двух протонов — около 210 мВ. Суммарный по-

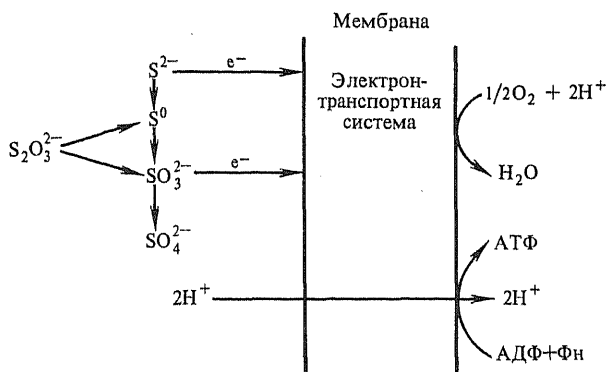


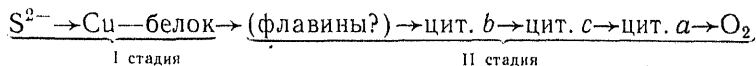
Рис. 33.6. Модель окисления восстановленных соединений серы тионовыми бактериями

тенциал в 330 мВ обеспечивает синтез одной молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) по схеме, представленной на рис. 33.5, Б.

Вторая половина реакции окисления железа ( $2e^- + 2H^+ + 1/2O_2 \rightarrow H_2O$ ) происходит на внутренней стороне цитоплазматической мембраны и внутри цитоплазмы. Сульфидная сера, вероятно, окисляется иначе (рис. 33.6).

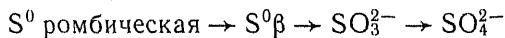
На примере изучения *Thiobacillus neapolitanus* показано, что окисление сульфида осуществляется в две стадии. Предполагается, что первый этап катализируется растворимой фракцией и сходен с реакцией, катализируемой серуокисляющей системой.

Медьсодержащий белок, по-видимому, является первичным акцептором сульфида (I стадия). Затем электроны от полисульфида переносятся по дыхательной цепи (II стадия). Схему эту можно представить в следующем виде:



Можно предположить, что эта схема справедлива и для *T. ferrooxidans*.

Элементарная сера, как показали исследования, окисляется *T. ferrooxidans* до серной кислоты по схеме



где  $S^0\beta$  — редкий тип серы, напоминающий  $\beta$ -модификацию селена.

Серя растворяется липидами, которые выделяются бактериями во внешнюю среду, и в коллоидном состоянии поступает в периплазматическое пространство клетки. Окисление серы идет на поверхности цитоплазматической мембраны и в хорошо развитой внутриклеточной мембранной системе. Начальным про-

дуктом ферментативного окисления серы является сульфит. Реакция окисления серы осуществляется с участием глутатиона. Механизм генерации АТФ при этом окислении, очевидно, такой же, как и при окислении двухвалентного железа, и  $S^{2-}$  и реализуется в соответствии с хемиосмотической теорией Митчелла.

### 33.1.3. Условия бактериального окисления сульфидных минералов

Бактериальное окисление сульфидных минералов активно протекает при использовании плотной суспензии клеток (1—5 г/л по сырой биомассе), адаптированных к условиям процесса, и зависит от физико-химических особенностей минералов. Наблюдается корреляция между действием различных факторов среды. Так, например, процесс бактериального окисления  $Fe^{2+}$  в аэрируемых воронках оптимален при концентрации сырой биомассы 4,0—6,0 г/л и концентрации  $Fe^{2+}$  6,0—8,0 г/л, а на качалке — при плотности биомассы 1,0—2,0 г/л и  $Fe^{2+}$  3,0—4,0 г/л. Наибольшая скорость окисления сульфидных минералов достигается при тонком измельчении руды или концентрата (размер частиц около 40 мкм и меньше) в плотных пульпах (до 20 % твердого), при активном перемешивании и аэрации пульпы, а также при оптимальных для бактерий рН, температуре и высоком содержании *T. ferrooxidans* ( $10^9$ — $11^{11}$  кл./мл пульпы). Из минеральных солей следует добавлять соли азота и фосфора. Другие соли могут поступать из руды или концентратов.  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  — постоянные компоненты растворов, способные как ускорять, так и подавлять бактериальное окисление сульфидных минералов. Содержание клеток бактерий необходимо регламентировать в каждом конкретном случае.

При благоприятных условиях из концентратов в раствор за 1 ч переходит: Cu до 0,7 г/л, Zn — 1,3 г/л, Ni — 0,2 г/л. До 90 % и выше As извлекается из олово- и золотосодержащих концентратов за 50—80 ч. Скорость окисления сульфидных минералов в присутствии бактерий возрастает в сотни и тысячи раз, а  $Fe^{2+}$  — примерно в  $2 \cdot 10^5$  раз и более по сравнению с химическим процессом.

### 33.1.4. Технология бактериального выщелачивания металлов

#### 33.1.4.1. Кучное и подземное выщелачивание

Бактериальное выщелачивание цветных металлов проводят из отвалов бедной руды (кучное) и из рудного тела в месте залегания (подземное). Технологическая схема бактериального выщелачивания приведена на рис. 33.7. Орошение руды в отвале или в рудном теле осуществляется водными растворами  $H_2SO_4$ ,

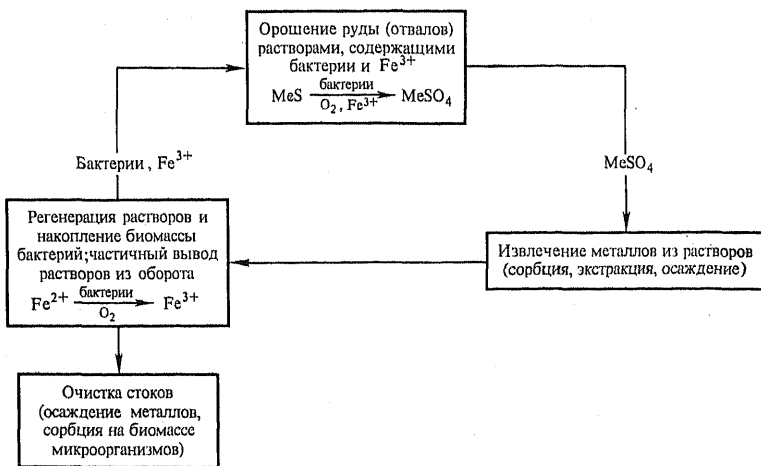


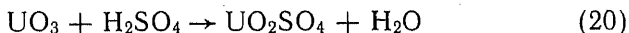
Рис. 33.7. Схема кучного и подземного выщелачивания металлов из руд

содержащими  $\text{Fe}^{3+}$  и бактерии (*T. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*, *S. thermosulfidooxidans* и др.). Наиболее широко распространены в отвалах и месторождениях при нормальной ( $20\text{--}30^\circ\text{C}$ ) или пониженной ( $2\text{--}15^\circ\text{C}$ ) температуре тионовые бактерии *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans*, а также *L. ferrooxidans*.

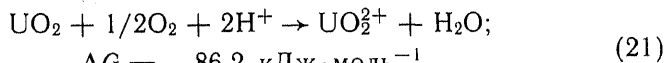
Раствор подается через скважины при подземном или путем разбрызгивания на поверхности при кучном выщелачивании. В руде в присутствии  $\text{O}_2$  и бактерий сульфидные минералы окисляются, а медь и другие металлы переходят из нерастворимых соединений в растворимые (см. реакции 5—7, 10—22). Раствор, содержащий медь, поступает на цементационную или другие установки (сорбция, экстракция) для ее извлечения, а затем опять на отвал или в рудное тело (схема замкнутая).

При выщелачивании меди из вторичных минералов (халькозин —  $\text{Cu}_2\text{S}$ , борнит —  $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ), а также ванадия и урана роль основного окислителя выполняет  $\text{Fe}^{3+}$ .

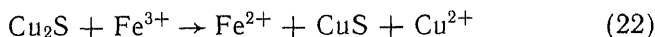
Окисное железо в кислой среде окисляет  $\text{U}^{4+}$  до  $\text{U}^{6+}$ , последний растворим в сернокислых растворах. Процесс можно представить в следующем виде:



*T. ferrooxidans* также окисляет  $\text{UO}_2$  по схеме



В случае халькозина или халькопирита  $\text{Fe}^{3+}$  взаимодействует с ним по схеме



Бактерии в подобных случаях используются для регенерации  $\text{Fe}^{3+}$  при окислении  $\text{Fe}^{2+}$ .

Редкие элементы входят в кристаллические решетки сульфидных минералов или вмещающих пород и при их окислении или деструктировании переходят в раствор и выщелачиваются. Следовательно, в выщелачивании редких элементов бактерии играют, как правило, косвенную роль.

Интенсификация выщелачивания достигается активизацией жизнедеятельности тионовых и других сульфидокисляющих бактерий, присутствующих в самой руде и адаптированных к конкретным условиям среды (тип руды, химический состав растворов, температура и др.). Для этого необходим низкий рН (1,5—2,5), высокий окислительно-восстановительный потенциал ( $E_h$  600—750 мВ), благоприятный и стабильный химический состав растворов. Достигается это путем режима аэрирования и увлажнения (орошения) руды. В отдельных случаях следует добавлять соли азота и фосфора, а также бактерии, выращенные на оборотных растворах в прудах — регенераторах. Число клеток бактерий в выщелачивающем растворе и руде должно быть не ниже  $10^6$ — $10^7$  клеток соответственно в 1 мл или 1 г.

Себестоимость 1 т меди, полученной бактериальным кучным способом, в 1,5—2 раза ниже, чем при обычных гидрометаллургических или пирометаллургических способах добычи.

*T. ferrooxidans* также эффективен при кучном и подземном выщелачивании урана. Этот процесс в промышленных масштабах осуществляется в ряде стран (США, ЮАР и др.).

### 33.1.4.2. Чановое выщелачивание

Бактериальное выщелачивание упорных сульфидных концентратов проводится прямоточно в серии последовательно соединенных чанов (рис. 33.8) с перемешиванием и аэрацией, эрлифтом или механически при 30 °С для мезофилов и от 45—50 до 70—80 °С для термофильных бактерий. Значение рН 1,7—2,2, концентрация клеток бактерий  $10^{10}$ — $10^{11}$  в 1 мл пульпы. Схема переработки сульфидных концентратов замкнутая. Оборотные растворы после частичной или полной регенерации используются в качестве питательной среды для бактерий и выщелачивающего раствора. В отдельных случаях регенерация растворов может и не проводиться. Наиболее активными в выщелачивании металлов являются штаммы бактерий, адаптированные к комплексу факторов (рН, тяжелые металлы, тип концентрата и т. д.) в условиях активного процесса бактериального выщелачивания. В качестве примеров чанового выщелачивания можно привести следующие.

#### 1. Переработка коллективных медно-цинковых концентратов.

Эти концентраты содержат минералы халькопирит ( $\text{CuFeS}_2$ ), пирит ( $\text{FeS}_2$ ) и сфалерит ( $\text{ZnS}$ ). В такой системе минералов (табл. 33.2) происходит селективное окисление  $\text{ZnS}$ , имеющего

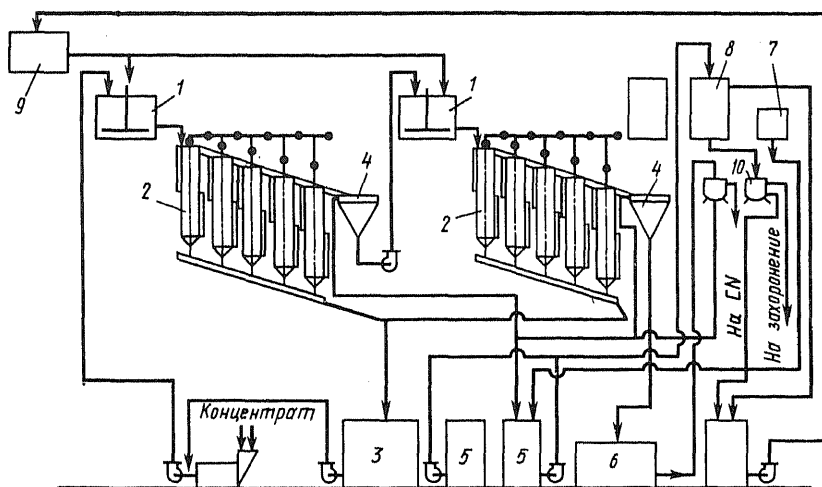


Рис. 33.8. Схема установки чанового выщелачивания металлов:

1 — контактный чан, 2 — чук, 3 — чан для сбора оборотных растворов, 4 — обезвоживающий конус, 5 — чан для сбора остатка после выщелачивания, 6 — отстойник конечного продукта, 7 — питатель подачи известкового молока, 8 — чан-отстойник, 9 — чан для сбора оборотных растворов, 10 — нутч-фильтр

более низкий ЭП, и выщелачивание цинка. Активно выщелачивается также кадмий, присутствующий в виде примесей. Другие минералы окисляются слабо. Так, за 72—96 ч извлекается в раствор до 90—92% Zn и Cd при извлечении Cu и Fe соответственно около 25 и 5%. Технологическая схема процесса представлена на рис. 33.9. Видно, что этот способ позволяет селективно при бактериальном выщелачивании извлечь Zn и получить медно-кадмиевый концентрат (остаток).

## 2. Переработка олово- и золотосодержащих концентратов.

Оловосодержащие концентраты содержат пирит, халькопирит, арсенопирит и оловянные минералы в виде окислов. В этой смеси минералов бактерии окисляют прежде всего арсенопирит ( $\text{FeAsS}$ ) как более низкопотенциальный минерал (табл. 33.2). Это позволяет удалить мышьяк из концентрата как вредную примесь и получить селективно оловянный и медный концентраты (рис. 33.10).

Золотосодержащие концентраты содержат минералы пирит, арсенопирит и ряд других. Золото и серебро тонко вкраплено в кристаллические решетки арсенопирита и пирита. Поэтому извлечь благородные металлы методом цианирования можно только после их вскрытия, т. е. после деструктурирования кристаллических решеток. Пирометаллургический способ (обжиг) не обеспечивает полноты извлечения этих металлов и загрязняет окружающую среду арсинами ( $\text{AsH}_3$ ) и поэтому неприемлем. Другие методы либо дороги, либо не обеспечивают полноту извлечения золота и серебра, в особенности последнего.

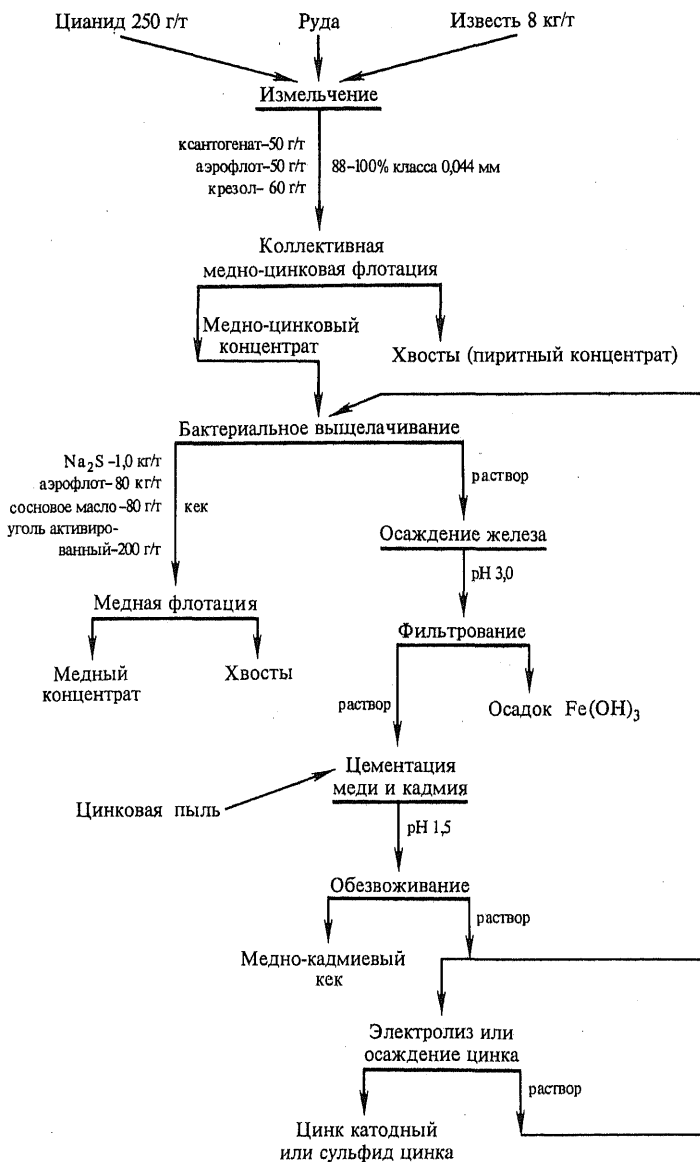


Рис. 33.9. Комбинированная схема переработки метаколлоидных медно-цинковых руд

После бактериального окисления арсенопирита и частично пирита по схеме (рис. 33.11) методом цианирования из остатка извлекается более 90 % Ag и Au. Бактерии перспективны и для переработки свинцово-цинковых концентратов. Из них полностью извлекаются Cu, Zn и Cd и получают свинцовый концентрат





(остаток от выщелачивания), Cu—Cd и цинковые продукты из растворов.

**3. Выщелачивание урана.** При чановом выщелачивании урана (см. реакции 19—21) из пиритсодержащих руд в пачуках при рН 1,5—1,6 извлечение его за 6 сут составляло 91 %. В полунепрерывных условиях за 5 сут можно извлечь 100 % урана при плотности пульпы 20 %. При такой технологии *T. ferrooxidans* используется для окисления пирита и регенерации  $\text{Fe}^{3+}$  (см. реакции 5—7, 10—12). Процесс проводят при 30 °С.

**4. Обессеривание углей.** Сера в углях присутствует как в виде пирита ( $\text{FeS}_2$ ), так и в виде органических соединений. В связи с использованием в промышленности тонкоизмельченного угля возникла возможность удалить серу из него как вредную для окружающей среды примесь путем окисления  $\text{FeS}_2$  бактериями (см. реакции 5—7). С помощью *T. ferrooxidans* из углей за 5—8 сут удастся извлечь до 97 % пиритной серы. Для извлечения серы, содержащейся в органических соединениях, предлагается использовать гетеротрофные микроорганизмы.

### 33.2. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ БАКТЕРИЙ

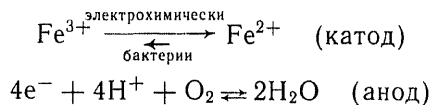
Как отмечалось выше, скорость бактериального выщелачивания металлов из руд и концентратов определяется плотностью биомассы бактерий в пульпе или в рудном теле.

При чановом процессе выщелачивания металлов в плотной пульпе, когда содержание сульфидных минералов высокое, биомассы накапливается до 5 г/л по сырой биомассе. Поэтому вносить ее извне нет необходимости.

Однако существуют технологические схемы, предусматривающие внесение бактерий. Биомасса нужна и при вводе в режим любой установки по выщелачиванию металлов, т. е. в первое время.

Для ее получения в настоящее время предложен ряд способов. Один из таких способов основан на культивировании *T. ferrooxidans* на среде с  $\text{Fe}^{2+}$  в условиях постоянного электрохимического восстановления  $\text{Fe}^{3+}$ .

Принципиальная схема реакций при культивировании *T. ferrooxidans* в электрохимической ячейке приведена на рис. 33.12. Из схемы следует, что  $\text{Fe}^{3+}$  электрохимически восстанавливается до  $\text{Fe}^{2+}$ , а бактерии вновь его окисляют:



Сконструирован специальный культиватор для осуществления этих процессов. Производительность культиватора достигает

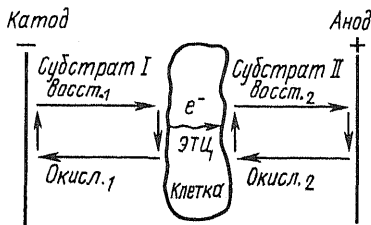


Рис. 33.12. Принципиальная схема реакций для культивирования хемолитотрофных микроорганизмов в электрохимической ячейке (по Коврову и др.)

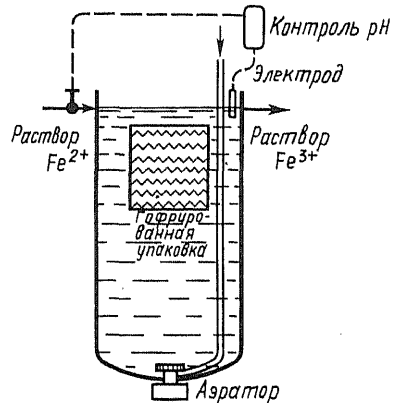


Рис. 33.13. Погруженный гофрированный блок — принудительная аэрация (по Ливерсей-Голдблатт, 1977)

100 г/м<sup>2</sup>·сут по сухой биомассе бактерий с поверхности катода.

В реакторе обеспечивается согласование скоростей электровосстановления Fe<sup>3+</sup> до Fe<sup>2+</sup> и бактериального окисления Fe<sup>2+</sup> до Fe<sup>3+</sup>. Способ согласования процессов основан на автоматической стабилизации потенциала катода.

Для кучного и подземного выщелачивания многих цветных металлов и урана одним из ведущих процессов является получение Fe<sup>3+</sup> как окислителя ряда минералов и связанного с ним увеличения числа клеток бактерий в растворах при окислении Fe<sup>2+</sup>. Для решения этой проблемы предложен оригинальный метод, получивший название Bacterial Film Oxidation (BACFOX Process). Рассмотрим суть этого метода: *T. ferrooxidans* и другие виды бактерий укрепляются в виде пленки на какой-либо поверхности, погруженной в раствор Fe<sup>2+</sup>, который насыщается воздухом. Процесс окисления Fe<sup>2+</sup> осуществляется на протоке. Схема одной из таких установок представлена на рис. 33.13. Бактерии связываются с осажденным ярозитом на гофрированной пластинке, причем пленка, состоящая из бактерий и ярозита, может быть создана на различных материалах (стекло, пластинки).

Максимум удельной скорости окисления Fe<sup>2+</sup> до Fe<sup>3+</sup> соответствовал 7,5 г/ч на 1 м<sup>2</sup> поверхности бактериальной пленки.

Поддерживать активные культуры бактерий необходимо на соответствующих концентратах в плотной пульпе при активном перемешивании и аэрации. Музейные культуры поддерживаются в холодильнике при +4—5 °С, пересевают культуры не реже одного раза в месяц.

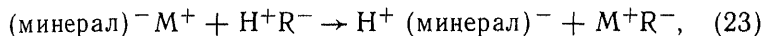
### 33.3. НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В РАЗВИТИИ БИОГЕОТЕХНОЛОГИИ МЕТАЛЛОВ

#### 33.3.1. Биодegradация силикатных и алюмосиликатных минералов. Получение ценных элементов и продуктов

Автотрофные и гетеротрофные микроорганизмы способны деструктировать силикатные и алюмосиликатные минералы и выщелачивать элементы, составляющие их кристаллические решетки, а также примесные элементы. К таким микроорганизмам относятся микроформы водорослей, нитрифицирующие и тионовые бактерии, некоторые гетеротрофные бактерии, мицелиальные грибы, дрожжи. Активность деструкции силикатных минералов зависит от их кристаллохимических особенностей и типа метаболитов, выделяемых микроорганизмами.

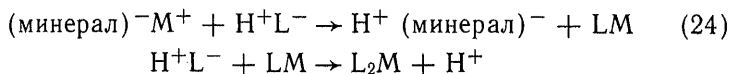
Характер взаимодействия различных метаболитов с минералами определяется реакциями ацидолиза и комплексообразования.

**1. Ацидолиз** — это процесс извлечения элементов из силикатных пород и минералов, включающий реакцию с протоном. Донорами протонов являются минеральные и органические кислоты микробного синтеза. Элементы из кристаллических решеток при ацидолизе переходят в раствор в виде ионов:



где  $M^{+}$  — положительно заряженные ионы металлов;  $R^{-} = NO_3^{-}$ ,  $R_1CCO^{-}$ ,  $HCO_3^{-}$ ,  $SO_4^{2-}$ .

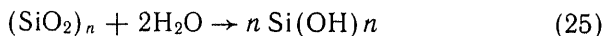
**2. Комплексообразование.** Дegradация силикатных минералов происходит благодаря образованию комплексов или хелатов при взаимодействии органических соединений микробного синтеза с катионами, входящими в состав минералов:



где L — органические лиганды.

Активными хелатообразователями являются ди- и трикарбоновые кислоты, гидрокси- и кетокислоты, ароматические кислоты, аминокислоты, многоатомные спирты и др.

Растворение кремнезема в воде, по мнению Айлера, представляет собой одновременно гидратацию и деполимеризацию: процесс можно выразить суммарной реакцией:



Механизм разрыва силоксанной связи Si—O—Si во влажной среде трактуют как нуклеофильную коррозию анионами  $OH^{-}$ . Процесс разрушения силоксанной связи бактериями, по нашим данным, косвенный и обусловлен действием таких метаболитов,

как полисахариды, липиды, фосфолипиды, органические кислоты. Он не связан с энергетическим обменом бактерий. Представления ряда исследователей о получении энергии *B. mucilaginosus* за счет процесса переноса электронов с более низкопотенциальной системы (силикаты) на более высокопотенциальную (бактерии) пока не получили экспериментального подтверждения.

Гетеротрофные бактерии и мицелиальные грибы при развитии на органических средах способствуют извлечению из горных пород и руд золота, меди, урана, титана, кремния, никеля, алюминия и других металлов. Извлечение титана может достигать 80 %, никеля — 99 %. Скорость извлечения урана из руд увеличилась в 100 раз, из гранита в 5 раз.

Ряд процессов получения ценных продуктов может быть связан с обогащением горных пород. Извлекая с помощью грибов (*A. niger*, *Scopularopsis brevicaulis* и *Penicillium expansum*) калий из лейцита ( $KAl(SiO_3)_2$ ), можно получить продукт, обогащенный алюминием.

Другой пример — обогащение низкосортных бокситов. Основная нежелательная примесь в них — это кремнезем, связанный с окисью алюминия. Отделение этих компонентов от основной массы бокситов путем обычного обогащения очень затруднено из-за исключительно тонкой вкрапленности и тесного взаимного проникновения основных минералов породы. Обработка бактериями вместе с продуктами их жизнедеятельности (полисахариды) высококремнистых бокситов обеспечивает получение высококачественных бокситовых концентратов: содержание глинозема в них повышается с 47—48 до 55—59 %, а кремневый модуль (соотношение  $Al_2O_3/SiO_2$ ) повышается с 3,8—3,9 до 10,1 при высоком извлечении алюминия (до 88,2 %).

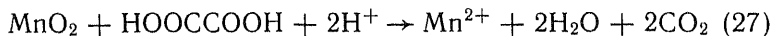
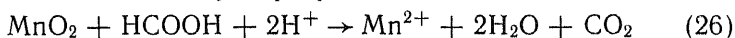
### 33.3.2. Выщелачивание марганца

Основой для получения марганца долгое время были оксидные руды ( $MnO_2$ ). Однако их запасы истощаются. На переработку уже поступают руды с пониженным содержанием Mn. Возрастает доля карбонатных и смешанных руд, а это затрудняет раздельное их обогащение на действующих фабриках. Огромные запасы бедных оксидных марганцевых руд скопились в отвалах и шламохранилищах. Для извлечения марганца из этих руд и отходов необходимо перевести его из четырехвалентной формы в двухвалентную. Микроорганизмы, как показали исследования, могут быть использованы не только для восстановления  $Mn^{4+}$ , но и для извлечения таких вредных примесей, как фосфор, кремний, железо и другие элементы.

В восстановлении  $Mn^{4+}$  принимают участие различные бактерии из родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* и некоторых других.

Можно выделить три пути восстановления  $Mn^{4+}$  гетеротрофными бактериями при выщелачивании данного элемента:

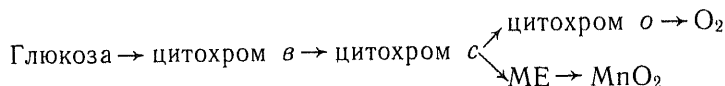
1. Восстановление  $Mn^{4+}$  органическими кислотами, которые выделяются в питательную среду:



Процесс не является специфическим и может осуществляться многими гетеротрофами. Путь эффективен при выщелачивании марганца.

2. Перекисный механизм восстановления  $Mn^{4+}$  известен для многих микроорганизмов. Такой путь восстановления  $Mn^{4+}$  зависит от активности каталазы бактерий и ряда других факторов, как, например, концентрация органического субстрата, pH среды и др. Так, в кислой и нейтральной среде в реакции  $Mn^{4+} \rightarrow Mn^{2+} + H_2O_2$  восстанавливает  $Mn^{4+}$ .

3. Ферментативный путь восстановления  $Mn^{4+}$ . Некоторые гетеротрофные бактерии, восстанавливающие  $MnO_2$ , содержат цитохромы типа *v*, *c* и *o*. Предполагается, что бактерии используют цитохромы *v* и *c*, восстанавливая  $MnO_2$  через металлофермент (МЕ):



Для ряда микроорганизмов описано восстановление  $Mg^{4+}$  с помощью нитратредуктазы (например у *Bacillus polymyxa*).

Известны и другие пути восстановления  $Mn^{4+}$  с участием тионовых и сульфатвосстанавливающих бактерий. Однако практическое значение имеет, как показали испытания, только первый путь восстановления  $Mn^{4+}$  (т. е. с помощью органических кислот бактериального синтеза).

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что в раствор переходит до 90—96%  $Mn$  из оксидных руд, 60% из карбонатных руд и до 85% из хвостов. С помощью *B. mucilaginosus* можно снизить содержание фосфора и кремния в марганцевой руде.

Марганец из карбонатных руд можно выщелачивать с помощью автотрофных нитрифицирующих бактерий I и II фаз при совместном их культивировании, однако процесс идет слабо.

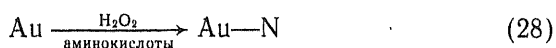
В конечном счете путем осаждения марганца получают высококачественный марганцевый концентрат.

### 33.3.3. Выщелачивание самородного золота

Растворять самородное золото ( $Au^0$ ) могут многие гетеротрофные микроорганизмы. Большую активность в этом процессе проявляют бациллы, такие, как *Bacillus* sp., *B. megaterium*, и их мутанты, выделяющие в среду значительные количества аминокислот.

Аминокислоты и белки в щелочной среде (pH 9—10) образу-

ют через аминогруппу связь Au—N с золотом в присутствии окислителей, например H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:



Перекись переводит Au<sup>0</sup> в ионное состояние. Эти реакции и лежат в основе бактериального растворения самородного золота. Так, после трех лет выщелачивания частички золота размером в 1—2 мм уменьшились на 30—50 %. Из краевых зон золотин было выщелочено серебро. Его содержание понизилось с 17,6 до 1,0 %. Из кварцевых руд, содержащих 3,2 г/т золота и песков (0,5 г/т Au), за 5—10 сут было извлечено 50—80 % золота. Скорость извлечения золота зависит от концентрации аминокислот. Так, при увеличении концентрации аминокислот с 0,5—1 до 3,5—4 г/л концентрация золота в растворе увеличивается в 3—4 раза. По комплексообразующей с Au способности аминокислоты могут быть расположены в ряд: цистеин > гистидин > > аспарагин > метионин > глицин > аланин и фенилаланин. Технологические аспекты этого процесса еще не разработаны.

### 33.3.4. Обогащение руд

В настоящее время металлы получают в основном из коллективных концентратов, и их селективное извлечение затрудняется. Использование сульфатредуцирующих бактерий в обогащении руд позволяет не только улучшить технологические показатели существующих процессов, но и проводить ряд новых. Некоторые из них перечислены ниже.

#### Обогащение руд с помощью микроорганизмов

<i>Технологические процессы</i>	<i>Результат воздействия бактерий</i>
Флотация окисленных минералов свинца и сурьмы после воздействия сульфатредуцирующими бактериями	Извлечение минералов повышается с 84 до 85—92% благодаря сульфидизации окислов
Флотация церуссита (PbCO <sub>3</sub> ) после воздействия сульфатредуцирующими бактериями	Извлечение повышается на 20—25% благодаря сульфидизации и образования PbS
Десорбция ксантогената с поверхности некоторых минералов сульфатредуцирующими бактериями после флотации	Селективное разделение CuFeS <sub>2</sub> и MoS <sub>2</sub> , PbS и ZnS при повторной флотации. CuFeS <sub>2</sub> и ZnS при этом не флотируются
Трансформация сульфатов в карбонаты (SrSO <sub>4</sub> → SrCO <sub>3</sub> )	Процесс происходит лишь при развитии сульфатредуцирующих бактерий, когда SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> в SrSO <sub>4</sub> используется как акцептор электронов в анаэробном процессе

Технологические проблемы использования бактерий в обогащении руд изучаются.

### 33.3.5. Микробиологическое извлечение металлов из растворов

Конечная стадия гидрометаллургических процессов — извлечение металлов из растворов. Однако пока удается извлекать только некоторые из них — прежде всего присутствующие в значительных концентрациях. Особые трудности возникают при извлечении металлов из разбавленных растворов. Важнейшая задача современности — очистка от металлов промышленных стоков. В последнее время наметилось новое направление в решении этих сложных задач, основанное на использовании способности многих микроорганизмов сорбировать или осаждать ионы металлов.

Известны следующие основные процессы извлечения ионов металлов из растворов с помощью микроорганизмов: биосорбция, осаждение металлов в виде сульфидов, восстановление шестивалентного хрома и некоторых других элементов.

Процесс бактериального осаждения сульфидов металлов известен давно. Сульфатредуцирующие бактерии при этом образуют сероводород, практически полностью осаждающий металлы из растворов. Имеются данные, что из растворов, содержащих 8,5 г Си/л в форме цианида, извлечение меди с помощью бактерий достигает 98,5 %.

Практическое применение нашел процесс восстановления шестивалентного хрома в растворах. Известны бактерии, которые в анаэробных условиях восстанавливают шестивалентный хром до трехвалентного, последний затем осаждается в виде  $\text{Cr}(\text{OH})_3$ . Процесс идет при pH 8—9, причем в качестве источника органических веществ для бактерий можно использовать хозяйственно-бытовые сточные воды.

Новым подходом к решению задачи извлечения металлов из разбавленных растворов является биосорбция. Исследования, проведенные как за рубежом, так и у нас в стране, показали, что с помощью бактерий, мицелиальных грибов, дрожжей и водорослей можно извлечь из разбавленных растворов до 100 % свинца, ртути, цинка, меди, никеля, кобальта, марганца, хрома, урана и некоторых других элементов, до 96—98% золота и серебра, до 84% платины, 93% селена. Показано также, что бактериальные полисахариды эффективны для извлечения из растворов радиоактивных элементов (урана и др.), меди и кадмия.

При сорбции металлов из растворов они накапливаются в биомассе до определенной концентрации. Как видно из приводимых ниже данных, содержание металлов в биомассе микроорганизмов может быть весьма значительным (табл. 33.3).

Механизм сорбции металлов из растворов микроорганизмами во многих чертах ясен. В основном он связан с клеточной стенкой. Возможности грибов в сорбции металлов определяются наличием у них хитина и получением из него хитозана. Поэтому для извлечения металлов целесообразно использовать эти веще-



Т а б л и ц а 33.3. Сорбция металлов микроорганизмами

Растворы	Микроорганизмы	Содержание металлов на 1 г массы сухих клеток
Растворы, содержащие радиоактивные элементы	Денитрифицирующие бактерии	140 мг урана и тория
	<i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	180 мг урана и тория 100—150 мг урана
Растворы, содержащие серебро	Биосорбент М ( <i>Penicillium chrysogenum</i> )	80—120 мг урана
	Сообщество бактерий ( <i>Pseudomonas maltophilia</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ) и неидентифицированные формы	До 300 мг серебра

ства и непосредственно. Источником хитина и хитозана могут быть и сами грибы.

По данным канадских исследователей, более важную роль в биосорбции металлов играют фосфатные и уроновые кислые группы. Считается перспективным использование мертвой биомассы и приготовленных на ее основе сорбентов.

Способы использования биосорбентов могут быть различными. Это прежде всего создание биофильтров с живыми микроорганизмами, где в качестве носителя может применяться, например, уголь. Другой пример — так называемый биосорбент М, разработанный в ЧССР. В его состав входит мицелий *Penicillium chrysogenum*, а также продукты реакции веществ, используемых в процессе его укрепления: мочевиноформальдегидный поликонденсат, а также продукты реакции формальдегида и мочевины с компонентами мицелия. Биосорбент М изготавливается в виде зерен размером 0,3—0,8 мм. Его можно использовать в установках, работающих на ионообменных смолах.

К достоинствам биосорбентов, включающих микроорганизмы, следует отнести прежде всего широкие возможности их использования в природных условиях. При налаженном производстве биомассы или, например, полисахаридов микробного синтеза такие сорбенты могут стать новым источником селективных обменных материалов. Так, емкость клеток гриба *Rhizopus arrhizus* при накоплении урана и тория в 2,5 раза превышает емкость обычных анионообменных смол, используемых в промышленности для селективного отделения урана от других ионов в растворе. Емкость биосорбента М составляет примерно 5 мг урана на 1 г сухого вещества клеток (максимальная емкость — 80—120 мг достигается при концентрации урана в растворе около 1 г/л). В числе других достоинств — доступность и простота использования.

\* \*  
\*

К настоящему времени решены основные научные вопросы биотехнологии получения таких металлов, как медь, никель, цинк, кобальт, уран, золото, марганец, кадмий, а также мышьяк и некоторые другие элементы. В практике добычи меди и урана уже используется бактериально-химический способ кучного и подземного выщелачивания. Чановый способ переработки ряда концентратов и получения таких элементов, как цинк, медь, уран, кадмий, золото, серебро, олово, никель, находятся на стадии полупромышленных и опытно-промышленных испытаний. Разрабатывается ряд новых микробиологических процессов, связанных с получением металлов. Бесспорно, что проблему переработки сложных комплексных руд можно решить только комбинированными методами, включающими микробиологические и химические процессы.

На современном этапе при огромных затратах на добычу руд мы извлекаем из них далеко не все ценные элементы. Использование новых микробиологических методов позволит увеличить сырьевые ресурсы, обеспечить комплексность извлечения металлов и не требует создания сложных горнодобывающих комплексов. При этом можно полностью автоматизировать соответствующие технологические процессы, повысить производительность труда и культуру производства, решить многие проблемы охраны окружающей среды.

## **Глава 34 ПОВРЕЖДЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ МАТЕРИАЛОВ И СПОСОБЫ ИХ ЗАЩИТЫ**

Биоповреждение материала — это любое нежелательное изменение его свойств, вызванное жизнедеятельностью организмов. Внимание к проблеме объясняется огромным ущербом, который причиняют биоповреждения народному хозяйству. По данным Организации экономического сотрудничества и развития, он достигает 5—7 % стоимости произведенной продукции. В США только за 1975 г. экономический ущерб от биоповреждений оценивался в 900 млн. долларов.

Повреждать материалы способны разнообразные организмы — бактерии и грибы, лишайники, водоросли и высшие растения, простейшие и кишечнополостные, черви, моллюски и членистоногие, рыбы, птицы и млекопитающие. Однако наиболее активные возбудители повреждений — мицелиальные грибы и бактерии, на долю которых приходится до 20 % от общего числа повреждений (рис. 34.1). Повсеместное распространение микро-

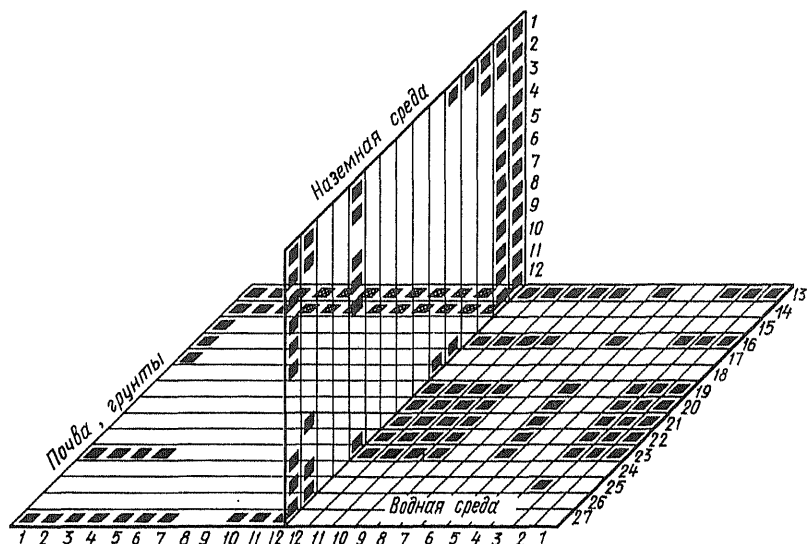


Рис. 34.1. Организмы и повреждаемые ими материалы и изделия в разных средах (по Ильичеву, 1979):

1 — кирпич, камень, здания, сооружения, 2 — древесина и изделия из нее, 3 — металл и металлоизделия, 4 — бумага, документы, фото, книги, 5 — музейные коллекции, 6 — краски, клей, 7 — кожа, шерсть, одежда, обувь, 8 — нефть, нефтепродукты, 9 — стекло, силикаты, оптика, 10 — пластмассы, полимеры, резины, 11 — радио- и электрооборудование, 12 — транспорт, дорожные покрытия, 13 — бактерии, 14 — грибы, 15 — лишайники, 16 — водоросли, 17 — высшие растения, 18 — простейшие, 19 — кишечноподобные, 20 — черви, 21 — мшанки, 22 — моллюски, 23 — членистоногие, 24 — иглокожие, 25 — рыбы, 26 — птицы, 27 — млекопитающие

организмов, разнообразие и лабильность ферментного аппарата, способность к росту в разных, нередко экстремальных условиях обеспечивают им возможность использовать широкий круг природных и синтетических материалов в почве, воде и воздухе. Кроме того, многие бактерии и мицелиальные грибы образуют в процессе метаболизма органические и неорганические кислоты, аммиак, сероводород. Все эти вещества характеризуются высокой коррозионной активностью.

Порча текстиля и древесины под воздействием микроорганизмов привлекла внимание исследователей еще в конце прошлого столетия, однако особенно остро проблема повреждения материалов встала в период второй мировой войны, когда в странах с тропическим климатом в необычайно короткие сроки выходили из строя военное снаряжение, техника и обмундирование для армий. Проблема не потеряла своего значения и в настоящее время, так как нефть и нефтепродукты, бумага, ткани и кожа, пластмассы и лакокрасочные покрытия, оптика, металлы и другие материалы подвержены микробиологической порче и нуждаются в защите. Невосполнимый ущерб наносят микроорганизмы, разрушая сокровища мировой культуры — произведения живописи, прикладного искусства, исторические и архитектурные памятники.

Кроме того, следует иметь в виду, что неконтролируемое развитие микроорганизмов на материалах представляет определенную опасность для здоровья людей, так как бактерии и грибы; повреждающие материалы, могут быть причиной кожных, аллергических и других заболеваний, а также источником сильно действующих токсинов.

Для успешного решения вопросов, связанных с защитой материалов от биоповреждений, необходимо глубокое изучение свойств микроорганизмов — возбудителей порчи, знание условий, обеспечивающих их развитие, совершенствование старых и создание новых методов испытаний биостойкости материалов и разработка эффективных способов их защиты.

#### **34.1. ПРИЗНАКИ ПОВРЕЖДЕНИЯ МАТЕРИАЛОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ**

Признаки повреждения материалов микроорганизмами достаточно разнообразны. В ряде случаев наблюдается «плесневение» материала, которое заметно невооруженным глазом и указывает на участие в его порче грибов. На бумаге, тканях, коже, пластмассах, лакокрасочных покрытиях под воздействием микроорганизмов часто появляются различные окрашенные пятна. Плесневение и пигментация материалов нередко сопровождаются изменением их физико-химических свойств. Одни материалы теряют прочность, у других снижается относительное удлинение при разрыве, показатели модуля упругости и напряжения при растяжении; у третьих ухудшаются диэлектрические свойства.

В топливах, поврежденных микроорганизмами, образуется осадок или слизь, изменяется кислотность и другие показатели. Смазочные масла, жировые эмульсии приобретают не свойственный им запах, наблюдается снижение их вязкости, повышение кислотного числа; отмечены случаи вспучивания и расслоения эмульсий.

Повреждения металлов под воздействием микроорганизмов проявляются в травлении поверхности, появлении ржавых наростов. Некоторые из указанных выше признаков повреждений могут быть результатом естественного старения материалов, протекающего под влиянием света, кислорода воздуха, влаги и других факторов внешней среды. Тем более важным представляется знание роли микроорганизмов в повреждении материалов при их эксплуатации и хранении.

#### **34.2. МИКРООРГАНИЗМЫ, ПОВРЕЖДАЮЩИЕ МАТЕРИАЛЫ, И МЕТОДЫ ИХ ОБНАРУЖЕНИЯ**

К настоящему времени благодаря многочисленным исследованиям наиболее специфические возбудители повреждения различных материалов в основном известны (табл. 34.1). Однако в каждом конкретном случае участие микроорганизмов в коррозионном процессе должно быть подтверждено экспериментально. Одним

Т а б л и ц а 34.1. Основные возбудители повреждений некоторых материалов\*

Материал	Мицелиальные грибы и дрожжи	Бактерии
Бумага	<i>Aspergillus</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Sporotrichum</i> , <i>Stachybotrys</i> , <i>Trichoderma</i>	<i>Cytophaga</i> , <i>Sporocytophaga</i> , <i>Sorangium</i> , <i>Zoogloea</i>
Ткани:		
хлопок, лен	<i>Aspergillus</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i>	<i>Cytophaga</i> , <i>Sorangium</i>
шерсть	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Stemphylium</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Pseudomonas</i>
синтетические	мицелиальные грибы различных родов	не описаны
Кожа	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladomporium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Verticillium</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Pseudomonas</i>
Каучук и резины	<i>Aspergillus</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Clodasporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>
Пластмассы	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Scopulariopsis</i> , <i>Trichoderma</i>	<i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Sterptomyces</i> , <i>Pseudomonas</i>
Лакокрасочные покрытия	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Aureobasidium</i>	<i>Flavobacterium marinum</i> , <i>Pseudomonas</i>
Нефтяные топлива	<i>Cladosporium resiniae</i> и дрожжи рода <i>Candida</i>	<i>Arthrobacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Pseudomonas</i>
Смазки, масла и другие нефтепродукты	<i>Aspergillus</i> , <i>Cephalosporium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> <i>Candida</i>	<i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i>
Смазочно-охлаждающие жидкости	<i>Aspergillus</i> , <i>Cephalosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Trichoderma</i> и дрожжи рода <i>Candida</i>	<i>Mycobacterium</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Arthrobacter</i>
Произведения изобразительного искусства: настенная живопись	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Chaetomium</i> ; <i>Cladosporium</i> , <i>Macrosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Stachybotrys</i> , <i>Stemphylium</i>	<i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Thiobacillus</i> , нитрифицирующие бактерии
станковая живопись	представители тех же родов + <i>Acremonium</i> , <i>Sporotrichum</i>	<i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i>
Бетон, камень, мрамор	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>	Нитрифицирующие, тионовые, цианобактерии <i>Pseudomonas</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Streptomyces</i>

Материал	Мицелиальные грибы и дрожжи	Бактерии
Оптическое стекло	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> var. <i>tonophilus</i>	Не описаны
Металлы и сплавы	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i>	<i>Crenothrix</i> , <i>Gallionella</i> , <i>Leptothrix</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Sphaerotilis</i> , разнообразные сульфатредуцирующие бактерии
Алюмосиликатные материалы	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i>	Не описаны

\* Приведены роды, включающие основных возбудителей повреждений.

из доказательств является обнаружение микроорганизмов на (или в) поврежденном материале и последующее их выделение.

Для выявления микроорганизмов на поверхности твердых материалов широко применяют микроскопические методы. Обычно готовят реплики (отпечатки) поврежденной поверхности на липкой целлюлозной ленте и исследуют их под микроскопом. Для получения более четких результатов рекомендуется окрашивать реплики флуорохромами и просматривать их в люминесцентном микроскопе. В последнее время для анализа реплики используют сканирующий микроскоп.

В топливах, жировых эмульсиях и других материалах жидкой консистенции микроорганизмы можно обнаружить, используя стекла обрастания. Однако ни микроскопические методы, ни стекла обрастания не позволяют выделить микроорганизмы — возбудители повреждений.

Наибольшее распространение для обнаружения и выделения микроорганизмов получили методы, основанные на внесении поврежденного материала в жидкие или на плотные питательные среды. В зависимости от физико-химических свойств материала и степени его повреждения в среды помещают поврежденные образцы, соскобы или смывы с их поверхности. Вязкие или волокнистые материалы, такие, как воск, смазочные масла, каучук, ткани, бумага и др., рекомендуется перед внесением в среду гомогенизировать. Материалы жидкой консистенции можно профильтровать через мембранный фильтр, который затем переносят в соответствующую питательную среду. Различные методы обнаружения и выделения микроорганизмов из поврежденных материалов приведены на рис. 34.2.

Поскольку наиболее специфические возбудители повреждений многих материалов известны, для их выявления и выделения используют вполне определенные питательные среды. Так, например, грибы обычно выделяют на сусло-агаре или агаризованной среде Чапека—Докса с сахарозой. Для подавления роста бактерий

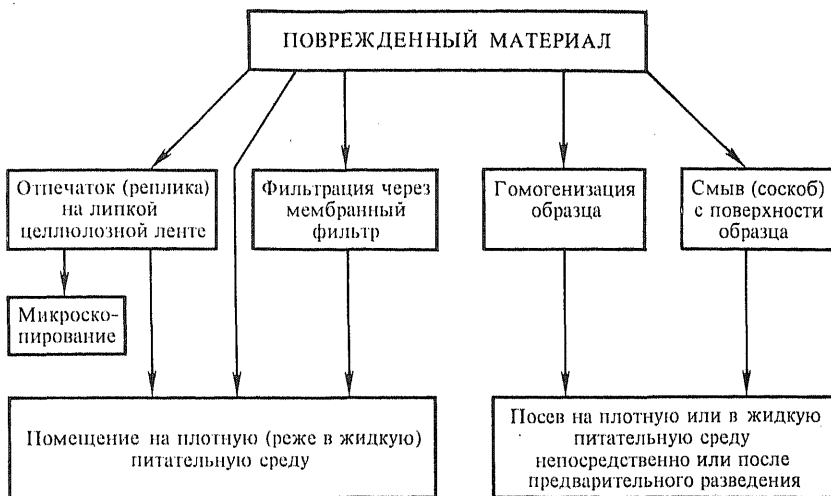


Рис. 34.2. Методы обнаружения микроорганизмов в поврежденном материале

среды подкисляют до pH 3,5—5,0 молочной или винной кислотами либо добавляют антибиотики — стрептомицин, пенициллин или полимиксин (50 мкг/мл среды). Некоторые грибы нуждаются в факторах роста и обнаружить их участие в разрушении пластификаторов удается только на средах с дрожжевым автолизатом. Для выделения грибов, повреждающих оптические приборы, используют сусло-агар с добавлением 10—20 % хлористого натрия.

Бактерии рода *Pseudomonas* выделяют обычно на мясо-пептонном агаре, бактерии родов *Arthrobacter*, *Mycobacterium* — на агаризованной среде, включающей равные объемы мясо-пептонного бульона и сусла. Для выделения нитрифицирующих бактерий используют минеральные среды с аммонием, для сульфатредуцирующих — специальные среды с сульфатами.

Если на (или в) поврежденном материале обнаружены микроорганизмы, то следует обратить внимание на их численность. При неблагоприятных условиях количество микроорганизмов невелико, напротив, когда условия для их жизнедеятельности благоприятны и процессы, ими вызываемые, идут достаточно интенсивно, численность микроорганизмов заметно возрастает. Поэтому чем больше клеток микроорганизмов в поврежденном материале, тем вероятнее ведущая роль микроорганизмов в его повреждении.

Обнаружить микроорганизмы в (или на) материалах и даже определить их численность еще недостаточно для того, чтобы утверждать, что именно микроорганизмы являются ведущей причиной повреждения. Применив знаменитую триаду Коха к повреждению материалов, Хук ван-дер Плас (1974) сформулировал следующие положения:

1) микроорганизмы, повреждающие материал, должны регулярно обнаруживаться на нем или быть от него в непосредственной близости;

2) необходимо выделить эти микроорганизмы в чистую культуру;

3) феномен повреждения материала следует получить с выделенными микроорганизмами в контролируемых условиях лаборатории и сравнить с результатами, наблюдаемыми в природе.

Лишь при выполнении отмеченных условий можно с уверенностью говорить о связи повреждения данного материала с жизнедеятельностью микроорганизмов.

Как правило, микроорганизмы, выделяемые из поврежденных материалов, достаточно разнообразны, но далеко не все могут быть причислены к активным разрушителям. Так, в пораженных дистилляционных топливах обнаружены бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, а также некоторые дрожжи и мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Cladosporium*. Однако наиболее агрессивными микроорганизмами оказались представители родов *Pseudomonas*, главным образом *P. aeruginosa*, *Mycobacterium*, дрожжи из рода *Candida* и мицелиальные грибы рода *Cladosporium*, прежде всего *C. resiniae*. Именно эти микроорганизмы вызывают первичные процессы порчи топлив.

Показано также, что шерстяное волокно особенно глубоко поражается представителями рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*). С поверхности пораженной шерсти всегда выделяются также грибы, принадлежащие к родам *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Stemphylium*.

### 34.3. ПРИЧИНЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ МАТЕРИАЛОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Можно назвать следующие основные причины повреждения материалов микроорганизмами:

1) использование материала или его отдельных компонентов в качестве субстрата для роста;

2) воздействие на материал продуктов метаболизма, обладающих коррозионной активностью;

3) участие в одной или нескольких электрохимических реакциях на поверхности металлов или сплавов.

Повреждение подавляющего большинства материалов органической природы объясняется способностью микроорганизмов использовать материал в целом или его отдельные компоненты в качестве источника углерода и энергии. Это относится к материалам как природного происхождения, так и синтезированным человеком.

В частности, повреждение хлопчатобумажных и льняных тканей, а также бумаги связано с разрушением целлюлозного волокна, которое является их основой. Поэтому наибольший вред при-



чиняют этим материалам микроорганизмы, обладающие целлюлазной активностью.

Целлюлоза, входящая в состав бумаг, химически не однородна.  $\alpha$ -Целлюлоза имеет высокую степень полимеризации, тогда как у гемицеллюлоз степень полимеризации не превышает 150. Мицелиальные грибы особенно легко используют гемицеллюлозы. В соответствии с этим чем больше в составе бумаги низкомолекулярных фракций, тем в большей степени возможно ее поражение грибами. Существенный вред бумаге причиняют грибы, разрушающие связующие, проклеивающие и другие вещества, входящие в ее состав.

Основной составной частью волокон шерстяных или шелковых тканей являются белки и другие азотсодержащие соединения. Поэтому в разрушении шерсти, ведущую роль играют бактерии из рода *Bacillus*, так как они способны к образованию внеклеточных протеолитических ферментов с последующей ассимиляцией образующихся аминокислот.

Пластмассы представляют собой многокомпонентные системы, содержащие наряду с высокомолекулярными полимерами различные наполнители — пластификаторы, стабилизаторы и красители. Устойчивость пластмасс к микробиологическому воздействию в большой степени определяется стойкостью каждого из компонентов. К числу наиболее устойчивых компонентов пластмасс относятся полимеры. Однако и они могут повреждаться микроорганизмами. В большинстве случаев чем выше степень полимеризации полимера, тем устойчивее он к микробиологической порче и наоборот. В этом отношении интересны данные, полученные при работе с полиэтиленом, который относится к числу соединений, наиболее стойких к воздействию микроорганизмов. Но это справедливо лишь для полиэтилена с молекулярной массой более  $30 \cdot 10^3$ . Полиэтилен меньшей молекулярной массы используется грибами из родов *Aspergillus* и *Penicillium*, а также бактериями из рода *Pseudomonas* в качестве источника углерода и энергии. Если полиэтилен неоднороден и включает молекулы полимеров различной молекулярной массы, то его повреждение микроорганизмами связано с потреблением низкомолекулярных фракций. Поэтому понятно, что грибостойкость полиэтилена после облучения УФ или  $\gamma$ -излучением заметно снижается. В результате облучения происходит его частичная деструкция — образуются молекулы с меньшей молекулярной массой, которые легко «выедаются» микроорганизмами.

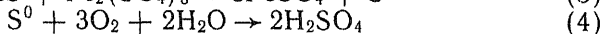
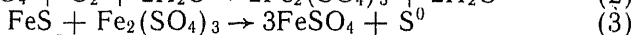
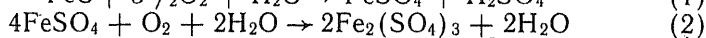
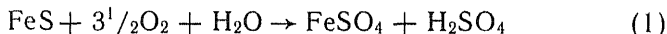
Наименее стойкими компонентами пластмасс являются пластификаторы. Они представляют собой эфиры фосфорной или органических кислот — адипиновой, аконитовой, лауриновой, олеиновой, себаценовой, фталевой и др. Разрушение пластификатора начинается с разрыва эфирной связи под воздействием внеклеточных эстераз, образование которых свойственно многим микроорганизмам. Образующиеся при этом свободные кислоты, особенно олеиновая, лауриновая и себаценовая, хорошо используют-

ся многими микроорганизмами в качестве единственного источника углерода. Пластификаторы, в состав которых входят фосфорная или фталевая кислоты, более стойки к воздействию микроорганизмов. Повреждение пластмасс связано прежде всего с использованием микроорганизмами пластификаторов. Поэтому стойкость пластмассы в целом нередко зависит от устойчивости пластификатора.

В основе повреждения нефтепродуктов лежит способность микроорганизмов использовать в процессах жизнедеятельности углеводороды.

Вторая не менее важная причина повреждений — образование микроорганизмами метаболитов с высокой коррозионной активностью и их воздействие на материал. По отношению к камню и бетону наиболее агрессивны нитрифицирующие и серные бактерии, образующие такие сильные кислоты, как азотная и серная. Повреждение бетона связано с разрушением пленки карбоната кальция под воздействием этих кислот. Такая пленка образуется на поверхности бетона при его затвердевании и препятствует вымыванию гидроксида кальция.

Примером порчи металла под воздействием серной кислоты, образованной тиобациллами, может служить коррозия стальных болтов, примененных для скрепления тьюнгов при строительстве Киевского метрополитена, на участке, где использовалась кессонная техника проходки тоннеля. Скорость коррозии была столь велика, что за четыре месяца площадь поперечного сечения болтов уменьшилась на 40 % от первоначальной. Поиски причин привели к заключению, что коррозия стальных болтов явилась результатом значительного подкисления грунтовых вод серной кислотой. В свою очередь образование серной кислоты было следствием интенсивного развития *Thiobacillus ferrooxidans* и *T. thiooxidans*, которое оказалось возможным благодаря достаточному содержанию сульфида железа в грунтах, обилию воды и постоянному притоку кислорода воздуха. Схему процесса можно представить следующим образом:



Окисление сульфида при широком доступе кислорода (реакция 1) возможно и без участия бактерий, но при включении в процесс *T. ferrooxidans* скорость реакции неизмеримо возрастает. Образование  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  (реакция 2) является результатом жизнедеятельности *T. ferrooxidans*. Будучи сильным окислителем,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  реагирует с сульфидом железа с образованием сульфата железа (II) и молекулярной серы (реакция 3). В этой реакции бактерии участия не принимают. *T. ferrooxidans* и *T. thiooxidans* окисляют молекулярную серу до серной кислоты (реакция 4). В кислых условиях сульфат железа (III) гидролизуются

с образованием трех молекул серной кислоты. Совокупность указанных процессов привела к обогащению грунтовых вод серной кислотой и высокой скорости коррозии стали.

Имеются также сведения о разрушении стальных водопроводных труб, насосов и различного оборудования в шахтах, вызванном развитием серных бактерий.

Коррозия металлов может быть значительно усилена продуктами метаболизма других групп микроорганизмов. В частности, показано, что коррозию алюминия, меди, железа ускоряли продукты обмена веществ *Aspergillus niger*. Но механизм коррозии металлов под воздействием продуктов обмена веществ микроорганизмов исследован мало и окончательно не установлен. Высказано предположение, что кислоты, образуемые микроорганизмами, способствуют растворению металла на аноде.

Ведущую роль в повреждении оптики играют продукты метаболизма мицелиальных грибов. Оптические стекла содержат окислы различных металлов и неметаллов:  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{BaO}$ ,  $\text{ZnO}$  и др. и, следовательно, не могут служить субстратом для роста микроорганизмов. Поэтому большинство исследователей считают, что абсолютно чистая поверхность оптического стекла устойчива к биоповреждениям. Рост мицелиальных грибов на поверхности оптического стекла возможен при наличии различного рода загрязнений (жира, смазки, пыли) или просветляющих и защитных покрытий. Даже слабый налет мицелия на призмах и линзах заметно ухудшает их оптические свойства, так как снижает прохождение света и контрастность изображения. Однако основной механизм повреждения заключается в том, что под влиянием продуктов метаболизма грибов из стекла вымываются отдельные компоненты и появляются участки травления поверхности, остающиеся и после удаления мицелия в виде рельефного рисунка, часто повторяющего рисунок мицелия. Устранить такое повреждение удается только шлифовкой стекла.

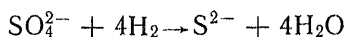
Наконец, третья причина повреждения материалов связана с участием микроорганизмов в электрохимических реакциях, протекающих на поверхности металлов и сплавов. Особенно велика роль в этих процессах сульфатредуцирующих бактерий — основных возбудителей коррозии в анаэробных условиях. С жизнедеятельностью бактерий этой группы связывают порчу подземных трубопроводов и сооружений, а также оборудования нефтяной промышленности. Масштабы этих процессов огромны. В 1957 г. ущерб от биологической коррозии подземных трубопроводов в США составил 600 млн. долларов. В Англии в 1956 г. затраты на поддержание и замену подземных трубопроводов были оценены приблизительно в 20 млн. фунтов стерлингов. В Японии потери от коррозии подземных кабелей и труб составили в 1956 г. 0,2 млн. долларов.

Основной механизм коррозии металлов под воздействием сульфатредуцирующих бактерий сводится к деполяризации катода. На участие сульфатредуцирующих бактерий в деполяризации

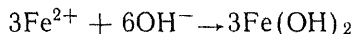
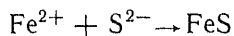
катода впервые было указано голландскими исследователями В. Кюром и Ван дер-Флюгтом еще в 1934 г. Они предложили реакции для объяснения процесса коррозии:



В результате последней реакции на катоде образуется пленка молекулярного водорода, защищающая металл от дальнейшей коррозии. Сульфатредуцирующие бактерии препятствуют образованию водородной пленки, поскольку используют молекулярный водород в процессе метаболизма и тем самым осуществляют деполяризацию катода:



В дальнейшем уже без участия бактерий образуются продукты коррозии —  $\text{FeS}$  и  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ :



Позднее было показано, что не только сульфатредуцирующие, но и многие другие бактерии, обладающие гидрогеназами, способны осуществлять катодную деполяризацию и тем самым ускорять коррозионные процессы.

Помимо катодной деполяризации бактерии усиливают коррозию стали в результате образования сульфида железа. Последний, осаждаясь на поверхности металла, образует гальваническую пару сульфид железа — железо, в которой сульфид железа играет роль катода.

Участие бактерий в коррозии других металлов и сплавов изучено недостаточно. Тем не менее показано, что сульфатредуцирующие бактерии заметно ускоряют коррозию алюминия, и механизм их воздействия также связан с деполяризацией катода. Значительно большей устойчивостью характеризуется олово, свинец и цинк, что объясняется, по-видимому, токсичностью этих металлов.

С деятельностью бактерий из родов *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Galionella* связывают коррозию прежде всего водопроводных труб. Развиваясь на внутренней поверхности трубы, эти бактерии образуют слизистые скопления, пропитанные гидроксидом железа (III) —  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . Поверхность металла под скоплением клеток плохо или совсем не омывается водой и поэтому имеет более низкий потенциал по сравнению с участком трубы, свободным от клеток бактерий. Участок трубы с более высоким потенциалом функционирует как катод; анодом служит зона под колонией бактерий. Возникающий ток способствует разрушению металла на аноде.

Причиной коррозии может быть не только развитие отдельных видов бактерий, но и целых микробиоценозов. Например, анаэробные условия под массой клеток железобактерий часто обуславливают развитие сульфатредуцирующих бактерий. В результате коррозионные процессы усиливаются.

В алюминиевых баках для топлива могут возникать обрастания, состоящие из мицелиальных грибов и бактерий рода *Pseudomonas*. Под массой этих микроорганизмов были обнаружены сульфатредуцирующие бактерии.

#### 34.4. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ СРЕДЫ И ПОВРЕЖДЕНИЕ МАТЕРИАЛОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Повреждение материалов микроорганизмами возможно только в определенных физико-химических условиях среды, обеспечивающих их рост.

Среди различных факторов важнейшими следует назвать влажность и температуру. Подтверждается это прежде всего тем, что в странах с тропическим и субтропическим климатом материалы и изделия повреждаются микроорганизмами в значительно большей степени и в более короткий срок, чем в странах с умеренным и холодным климатом.

Влажность воздуха оказывает существенное влияние на содержание в материале воды, от доступности которой зависит рост микроорганизмов. На примере бумаг показано, что грибы развиваются, используя капиллярную воду. При относительной влажности воздуха, равной 30—40 %, капиллярная вода в бумаге практически отсутствует; при 60 % вода конденсируется в капиллярах с диаметром 0,0022 мм, а при 90% она заполняет капилляры диаметром 0,01 мм. По мнению ряда исследователей, содержание воды в материале — более важный показатель, чем относительная влажность воздуха. В соответствии с этим чем больше влагоемкость материала, тем больше вероятность повреждения его микроорганизмами.

В некоторых случаях увлажнение материала является результатом образования конденсационной воды при колебаниях температуры воздуха и относительной влажности. Способствует увлажнению материала и его запыленность, так как частицы пыли достаточно гигроскопичны.

В топливах и других нефтепродуктах, а также эмульсиях различного состава микроорганизмы развиваются в водной фазе или на границе двух фаз. Абсолютно обезвоженные топлива и другие нефтепродукты не поражаются микроорганизмами. Подавляющее большинство клеток микроорганизмов, попавших в такое топливо, погибает, но основные возбудители порчи — *Pseudomonas aeruginosa* и особенно *Cladosporium resinae* — длительное время остаются жизнеспособными, хотя и не размножаются. Но достаточно наличия только одной части воды на 10000 частей топлива, чтобы развитие *G. resinae* стало возможным.

Сравнительно высокое содержание воды в смазочно-охлаждающих жидкостях (соотношение масло — вода может изменяться от 1:5 до 1:100) определяет значительную поражаемость этих материалов микроорганизмами. Степень поражения зависит как от соотношения масло — вода, так и от типа эмульсии. При прочих равных условиях эмульсии масло — вода в большей степени повреждаются микроорганизмами, чем эмульсии вода — масло. Видимо, жировая фаза эмульсии вода — масло создает естественный барьер, препятствующий распространению и дальнейшему развитию микроорганизмов в водной фазе.

Загрязнение материалов и изделий частицами пыли, соединениями органической и неорганической природы нередко приводит к повреждению материала или усиливает этот процесс. Микроорганизмы в топливах и смазочно-охлаждающих жидкостях лучше развиваются, если водная фаза содержит неорганические соли, особенно азота и фосфора. Для смазочно-охлаждающих жидкостей показано, что на их устойчивость существенное влияние оказывает жесткость воды, используемой для разведения выпускаемых промышленностью концентратов. Чем она выше, тем больше степень поражения бактериями охлаждающих жидкостей, и наоборот. Вместе с тем использование дистиллированной или деминерализованной воды, снижая опасность повреждения смазочно-охлаждающих жидкостей бактериями, увеличивает вероятность поражения мицелиальными грибами. В чем причина смены возбудителей порчи, пока остается неясным.

Биостойкость плотных материалов в значительной степени определяется способностью микроорганизмов адсорбироваться на их поверхности. Известно, что микроорганизмы, разрушающие целлюлозу, прочно прикрепляются к ее волокнам. Наибольшие изменения поливинилхлоридных пленок обнаруживаются под микроколониями почвенных микроорганизмов, селективно адсорбированных поверхностью пленки. Отмечена корреляция между свойствами стеклокристаллических материалов (ситаллов) адсорбировать конидии мицелиальных грибов и степенью их обрастания. При ослаблении адсорбционных свойств снижается развитие грибов на поверхности ситаллов. Показано также, что материалы с гидрофобной поверхностью поражаются микроорганизмами меньше, чем материалы, у которых поверхность хорошо смачивается водой. В частности, гидрофобность поверхности полиэтилена, видимо, является одной из причин его устойчивости к воздействию микроорганизмов.

Достаточно много внимания исследователями уделяется изучению условий повреждения незащищенных металлов и прогнозированию интенсивности этого процесса в различных почвах. Наряду с составом и численностью важнейших групп микроорганизмов, способных участвовать в повреждении металлических конструкций, важными показателями биокоррозионной активности почв являются значения Eh и pH, удельное электросопротивление и температура почвы, содержание в ней воды, сульфат-

ионов, соотношение  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ , интенсивность образования сероводорода.

К числу агрессивных почв, в которых следует ожидать интенсивную коррозию под воздействием сульфатредуцирующих бактерий, относятся почвы с окислительно-восстановительным потенциалом менее 0,4 В, удельным электросопротивлением ниже 2000 Ом/см и содержанием воды более 20 %.

#### 34.5. СПОСОБЫ ЗАЩИТЫ МАТЕРИАЛОВ

Самый надежный способ защиты материалов от поражения микроорганизмами — устранение возбудителей порчи. Однако практически это неосуществимо, так как производство материалов и тем более их эксплуатация в стерильных условиях невозможны. Вместе с тем соблюдение определенных санитарно-гигиенических правил при производстве, хранении и последующей эксплуатации позволяет значительно снизить возможность поражения материалов микроорганизмами. Прежде всего это относится к смазочно-охлаждающим жидкостям, различным эмульсиям и оптическому стеклу.

Надежным способом защиты многих материалов является уменьшение их влажности до 8—10 %. Этот способ широко используется для предохранения от микробиологической порчи бумаг, документов, книг, тканей, живописи. Поддержание постоянной температуры в пределах 17 °С ( $\pm 3$  °С) и относительной влажности воздуха 55 % ( $\pm 10$  %) практически исключает развитие мицелиальных грибов и тем более бактерий на различных материалах. Однако такой способ часто бывает неприемлемым для защиты подавляющего большинства материалов в условиях эксплуатации.

Наиболее надежным способом защиты промышленных материалов признано использование биоцидов. Как правило, биоциды вводят в состав материалов, реже ими обрабатывают поверхность.

В качестве биоцидов предложены сотни соединений различной химической природы: органические соединения тяжелых металлов, фенолы и их производные, четвертичные аммониевые соединения, олово- или кремнийорганические соединения, комплексообразователи. Однако на практике используется сравнительно узкий круг соединений, что объясняется высокими требованиями, которые предъявляются к биоцидам.

Соединения могут использоваться в качестве биоцидов, если они не изменяют свойства материалов, имеют широкий спектр действия и в рекомендованных концентрациях обладают бактерицидными и фунгицидными свойствами, что снижает вероятность возникновения устойчивых форм микроорганизмов. Кроме того, биоциды не должны быть токсичными для человека, быть химически стойкими и достаточно дешевыми, чтобы их применение было экономически выгодно. Биоциды, используемые для

защиты топлив или масляных эмульсий, должны отвечать еще одному требованию — хорошо растворяться как в водной, так и углеводородной или жировой фазах, так как микроорганизмы развиваются в водной фазе или на границе двух фаз. Не может быть биоцидов, удовлетворяющих всем необходимым требованиям и обеспечивающих защиту любого материала. Поэтому для каждого материала специально подбирают биоцид и необходимую концентрацию, учитывая не только особенности защищаемого материала, но и условия его эксплуатации. Почти все применяемые в настоящее время биоциды найдены путем эмпирического поиска. Объясняется это тем, что чрезвычайно разнообразны материалы, требующие защиты, достаточно разнообразны микроорганизмы, вызывающие повреждения, и не полностью или совсем не исследованы механизмы действия соединений, применяемых в качестве биоцидов.

Для защиты тканей, бумаги и пластмасс, изготовленных на основе поливинилхлорида, широко используется салициланилид, для защиты смазок рекомендуется использовать оловоорганические соединения, для произведений живописи — метиловый эфир *n*-оксibenзойной кислоты. Органические соединения ртути наиболее эффективны для лакокрасочных покрытий.

При использовании биоцидов для защиты материалов и изделий следует помнить, что микроорганизмы, вызывающие их повреждение, не представляют специфической группы, а широко распространены в природе и играют существенную роль в круговороте веществ.

Естественно, что широкое использование ядов усложняет процессы биодegradации и увеличивает загрязнение окружающей среды. В связи с этим усилилась работа по поиску иных путей защиты материалов. Большое внимание уделяется исследованиям, направленным на изменение химической структуры соединений, составляющих основу разных материалов, подвергающихся порче, для придания им большей стойкости к воздействию микроорганизмов. Например, показано, что грибостойкость целлюлозы возрастает, если в ее молекулах гидроксильные группы заменить эфирными. Так, метилцеллюлоза и циан-этилцеллюлоза значительно меньше поражаются грибами, чем нативная целлюлоза.

Наиболее распространенный и эффективный способ защиты металлов — применение защитных покрытий, которые создают непроницаемый барьер между металлом и окружающей средой. В качестве покрытий газо- и нефтепроводов используют липкие и нелипкие ленты, изготовленные на основе поливинилхлорида или полиэтилена, полиэтиленовые покрытия, полученные нанесением в электростатическом поле, а также битумно-полимерные и битумно-резиновые мастики. Сами по себе покрытия также должны быть стойкими к воздействию микроорганизмов.

Другим способом предохранения металлов от коррозии является катодная защита, способная изменять кинетику электрохимических реакций. Наиболее простой способ катодной защиты



заключается в присоединении к защищаемому металлу протектора, который функционирует, как анод. Защищаемый материал служит катодом. Другой способ катодной защиты основан на создании путем использования источника тока ЭДС между защищаемым металлом и анодом: последний, как правило, сделан из графита.

#### **34.6. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ МАТЕРИАЛОВ К ВОЗДЕЙСТВИЮ МИКРООРГАНИЗМОВ**

В решении проблемы повреждения материалов большое значение имеют методы, используемые для оценки устойчивости материала к воздействию микроорганизмов: испытания материала в лабораторных условиях и в условиях, приближающихся к эксплуатационным.

Большинство методов лабораторных испытаний связано с оценкой интенсивности роста тест-организмов на питательной среде с материалом как единственным источником углерода. Рост тест-организмов указывает на использование материала или его отдельных компонентов в качестве субстрата и, таким образом, свидетельствует о его неустойчивости. Интенсивность роста тест-организмов отражает степень устойчивости материала. Чем она выше, тем меньшей стойкостью обладает материал, и наоборот. Рост тест-организмов часто оценивают визуально по трех- или пятибалльной системе. В тех случаях, когда это сделать не удастся, определяют количество клеток методом посева на плотные или в жидкие среды.

Для определения влияния продуктов метаболизма на свойства материала образцы материалов помещают в среду, обеспечивающую интенсивный рост тест-организмов. При оценке стойкости следует обращать внимание на изменение физико-химических, механических и других свойств материала. Полученные данные позволяют достаточно полно представить меру воздействия микроорганизмов на исследуемый материал. В частности, интенсивность роста микроорганизмов на поливинилхлоридных пластиках хорошо коррелирует с уменьшением массы образца, содержанием в нем пластификатора и потерей эластичности.

Особое внимание при лабораторных испытаниях уделяется подбору соответствующих тест-организмов, так как от их активности зависит надежность полученных результатов. Для материалов, методы испытаний которых утверждены ГОСТом<sup>1</sup>, предложен набор грибов, который не одинаков для различных материалов. Кроме того, в число тестов рекомендуется обязательно включать микроорганизмы, выделенные непосредственно из поврежденного материала и вызывающие его коррозию. В ряде работ наряду с чистыми культурами предложено использовать накопительные культуры.

<sup>1</sup> ГОСТ—ЕСЗК ГОСТ 9.048—75—9.053—75 «Изделия технические. Методы испытания». М., Госстандарт, 1975.

Лабораторные методы испытаний продолжительны и требуют, как правило, не менее 10, чаще 20—30 сут. Поэтому одной из важных задач является разработка ускоренных методов испытания материалов и изделий. Один из таких методов—определение поглощения кислорода в аппарате Варбурга. Пытаются также использовать изотопные методы анализа путем введения меченого углерода в материал и определения его биостойкости по интенсивности образования  $^{14}\text{CO}_2$ .

Большой интерес представляют методы испытаний с использованием ферментных препаратов. В частности, для оценки биостойкости бумаг предложен экспресс-метод, основанный на обработке исследуемых образцов препаратами иммобилизованных целлюлаз с последующим определением механических свойств испытуемых образцов. Применение целлюлаз возможно и при испытании текстильных изделий, основу которых составляет целлюлозное волокно.

Испытания биостойкости материалов в лаборатории осуществляют в условиях, наиболее благоприятных для роста микроорганизмов и часто имитирующих тропический климат, т. е. при температуре 28—30 °С и относительной влажности 95—98 %. Но учесть всю совокупность условий, в которых будет эксплуатироваться материал или изделие из него, трудно, а иногда и невозможно. Поэтому, помимо лабораторных испытаний, рекомендуется оценивать стойкость материалов и особенно изделий из них в условиях, приближающихся к эксплуатационным. Например, биостойкость материалов, которые предполагается эксплуатировать в почве, определяют в вегетационных сосудах с почвой, в перколяторах или на особых площадках полевых станций.

Почву для испытаний готовят специально, смешивая равные объемы плодородной почвы, хорошо перепревшего навоза, речного песка, а затем увлажняют. В ряде случаев для активизации микробиологических процессов почву обогащают глюкозой и (или) пептоном. Однако эти методы разработаны мало, они нуждаются в дальнейшем совершенствовании и стандартизации.

Несмотря на определенные успехи в изучении повреждения материалов микроорганизмами и способов их защиты, эта проблема далека от окончательного решения. Одной из актуальных задач остаются разработка ускоренных методов испытания биостойкости материалов и изделий и надежное прогнозирование изменения их свойств при эксплуатации в различных условиях. Большой интерес представляет исследование биоценозов различных поврежденных материалов и определение степени участия каждого из его составляющих в повреждении. Не менее важной является задача подбора биоцидов для защиты материалов, а также создания стойких материалов путем направленного изменения их структуры.

# Литература

## К главе 1

- Аристов Н. Я.* Промышленность древней Руси. Спб., 1866.  
*Бернал Дж.* Наука в истории общества. М., 1956.  
*Буткевич В. С.* Избранные труды. В 2 т. М., 1957.  
*Ваксман З. А.* Антагонизм микробов и антибиотические вещества. М., 1947.  
*Веселов И. Я., Шатхан А. С.* Развитие пивоваренной промышленности СССР. М., 1955.  
*Войткевич А. Ф.* Микробиология молока и молочных продуктов. М., 1948.  
*Герасимов М. А.* Технология виноделия. М., 1952.  
*Гутина В. Н.* Биохимия анаэробного разложения углеводов. М., 1974.  
*Егоров Н. С.* Основы учения об антибиотиках. 4-е изд. М., 1986.  
*Илиш Ф.* Полное руководство винокуренного, пивоваренного производства, изложенное в 14 лекциях. В 2 ч. Спб., 1862.  
*История естествознания в России/Под ред. Л. Я. Бляхера и др. М., 1962. Т. 3.*  
*История биологии с древнейших времен до начала XX в./Под ред. С. Р. Микulinского. М., 1972.*  
*История биологии с начала XX в. до наших дней/Под ред. Л. Я. Бляхера. М., 1975.*  
*Костычев С. П.* Избранные труды по физиологии и биохимии микроорганизмов. В 2 т. М., 1956.  
*Красильников Н. А.* Актиномицеты — антагонисты и антибиотические вещества. М.; Л., 1950.  
*Кропоткин Н. С.* Исторический очерк производства охмеляющих напитков. Винокурение по новейшим способам. Спб., 1899.  
*Метелкин А. И. Ценковский А. С.* — основоположник отечественной школы микробиологов. 1822—1887. М., 1950.  
*Надсон Г. А.* Избранные труды. М., 1967. Т. 1, 2.  
*Омелянский В. Л.* Избранные труды. В 2 т. М., 1953.  
*Пастер Л.* Избранные труды. М., 1960. Т. 1, 2.  
*Прескот С. и Дэн С.* Техническая микробиология. М., 1952.  
*Работнова И. Л.* Некоторые итоги развития советской технической микробиологии за 50 лет//Микробиология. М., 1967. Т. 36. Вып. 5. С. 811—848.  
*Стейнгер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж.* Мир микробов. В 3 т.//Пер с англ. Под ред. Е. Н. Кондратьевой и др. М., 1979.  
*Тимирязев К. А. Л. Пастер.* Соч. М., 1938. Т. 5. С. 191—226.  
*Шапошников В. Н., Иерусалимский Н. Д., Работнова И. Л.* Техническая микробиология в СССР за сорок лет//Достижения советской микробиологии/Отв. ред. А. А. Имшенецкий. М., 1959.  
*Шапошников В. Н.* Техническая микробиология. М., 1948.  
*Collard P.* The development of Microbiology. Cambridge; London; New York; Melbourne: Cambridge University press, 1976. P. 201.

## К главе 2

- Бекер М. Е.* Биотехнология микробиологического синтеза. Рига, 1980.  
*Биотехнология.* М., 1984.  
*Готтшалк Г.* Метаболизм бактерий. М., 1982.  
*Жизнь микробов в экстремальных условиях.* Сб. М., 1981.  
*Жизнь растений.* М., 1974, 1976, 1977. Т. 1—III.  
*Заварзин Г. А.* Микробиология — двадцатому веку. М., 1981.  
*Каравайко Г. И., Кузнецов С. И., Голомзик А. И.* Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М., 1972.  
*Козлов Ю. И., Машко С. В., Дебабов В. Г.* Методы генной инженерии.//Успехи биологической химии. М., 1982. Т. 22. С. 7—25.

- Кондратьева Е. Н.* Хемолитотрофы и метилотрофы. М., 1983.
- Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н.* Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М., 1981.
- Общая вирусология/*Лурья С. и др. М., 1981.
- Мишустин Е. Н.* Биологический азот и его значение в сельском хозяйстве//Вестн. АН СССР. М., 1979. Т. 3. С. 59—67.
- Методы общей бактериологии.* М., 1983. Т. 1—3.
- Перт С. Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М., 1978.
- Овчинников Ю. А.* Биотехнология и ее место в научно-техническом прогрессе//Вестн. АН СССР. М., 1982. Т. 4. С. 4—17.
- Ротмистров М. Н., Гвоздяк П. И., Ставская С. С.* Микробиология очистки воды. Киев, 1979.
- Скрябин Г. К., Головлева Л. А.* Использование микроорганизмов в биологическом синтезе. М., 1976.
- Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж.* Мир микробов. М., 1979. Т. 1—3.
- Anthony C.* The Biochemistry of Methylotrophs. London. Academic Press, 1982.
- Da Silva E. J.* Microbial biotechnology: a global pursuit. Process Biochem. 1981. V. 16. P. 38—41.
- Industrial Microbiology.* Scientific American. 1981. V. 245. P. 43—157.
- The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria.* Berlin; Heidelberg; New York. 1981. V. I and II.
- Woese C. R.* Archaeobacteria. Scientific American. 1981. V. 244. P. 94—106.
- Zeikus J. G.* Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 1980. V. 34. P. 423.

### К главе 3

- Бергельсон Л. Д.* Мембраны; молекулы, клетки. М., 1982.
- Брода П.* Плазмиды. М., 1982.
- Гершанович В. Н.* Транспорт аминокислот, пептидов и органических кислот бактерий. М., 1977.
- Гершанович В. Н.* Биохимия и генетика транспорта ионов у бактерий. М., 1980.
- Газарян К. Г., Тарантул В. З.* Геном эукариот. М., 1983.
- Готтшалк Т.* Метаболизм бактерий. М., 1982.
- Зензбуш П.* Молекулярная и клеточная биология. М., 1982.
- Котык А., Яначек К.* Мембранный транспорт. М., 1980.
- Корнберг А.* Синтез ДНК. М., 1977.
- Мецлер Д.* Биохимия. Т. 1—3. М., 1980.
- Пикер Е. Г., Уманский С. Р.* Модель регуляции активности генома в клетках эукариот//Молек. биология. М., 1976. Т. 10. С. 635.
- Ратнер В. А.* Молекулярная генетика: принципы и механизмы. Новосибирск, 1983.
- Регуляция биохимических процессов у микроорганизмов.* Пушкино, 1980.
- Спирин А. С.* Молекулярная биология. М., 1986.
- Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж.* Мир микробов. М., 1979. Т. 2.
- Стент Г., Кэлиндар Р.* Молекулярная генетика. М., 1981.
- Bacterial Transport/Ed. by B. P. Rosen.* 1978. Marcel Dekker, N.-Y. — Basel.
- Biochemistry of Bacterial Growth/Ed. by J. Mandelstam, K. McQuillen.* Y. Dawes. 1982.
- Dills S. S., Apperson A., Schmidt M. R., Saier M. H., Jr.* Carbohydrate Transport in Bacteria//Microbiology Reviews. 1980. V. 44. N 3. P. 385—418.

### К главе 4

- Алиханян С. И.* Селекция промышленных микроорганизмов. М., 1968.
- Демейн А., Соломон Н.* Промышленная микробиология//Промышленная микробиология и успехи генетической инженерии. М., 1984.
- Ерохина Л. И.* Генетико-селекционные исследования с продуцентами ферментов//II Всесоюзное совещание по ферментам микроорганизмов. М., 1979. Ч. 1.

Жданова Н. И., Гусятинер М. М. Методы селекции и свойства штаммов микроорганизмов — продуцентов аминокислот. Обзор. М., 1985.

Методы селекции продуцентов антибиотиков и ферментов. Жукова Р. А. и др. Л., 1978.

Накаяма К. Продукция аминокислот штаммами *Corynebacterium glutamicum*, полученными селекционным путем//Молекулярные основы микробиологических процессов. М., 1981. С. 278.

Cape R. E., Gelfand D. H., Innis M. A., Neidleman S. Z. An Introduction to the Present State and Future Role of Genetic Manipulation in the Development of Over-producing Microorganisms./Over-production of microbial products./Ed. V. Krumphanze, B. Sikyta, Z. Vanek. 1982. P. 327—343.

#### К главе 5

Итоги науки и техники//Молекулярная биология. М., ВИНТИ, 1979. Т. 12. Ч. 1.

Итоги науки и техники//Молекулярная биология. ВИНТИ. М., 1980. Т. 12. Ч. 2.

Козлов Ю. И., Машко С. В., Дебабов В. Г. Методы генной инженерии//Усп. биол. химии. М., 1982. Т. XXII.

Биотехнология/Под ред. акад. А. А. Баева. М., 1984.

Дебабов В. Г./Успехи микробиологии. М., 1983. Т. 18.

#### К главе 6

Бирюков В. В., Кантере В. М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. М., 1985.

Методы общей бактериологии/Под ред. Ф. Герхардта и др. М., 1983. Т. I.

Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М., 1978.

Печуркин Н. С., Терсков И. А. Анализ кинетики роста и эволюции микробных популяций (в управляемых условиях). Новосибирск, 1975.

Работнова И. Л., Позомогова И. Н. Хемостатное культивирование и ингибирование роста микроорганизмов. М., 1979.

Теория и практика непрерывного культивирования. Сб./Под ред. И. Л. Работновой. М., 1980.

#### К главе 7

Федосеев К. Г. Физические основы и аппаратура микробного синтеза биологически активных соединений. М., 1977.

Плановский А. Н., Николаев П. И. Процессы и аппараты химической и нефтехимической технологии. М., 1987.

Айба Ш., Хемфри А., Миллс Н. Биохимическая технология и аппаратура/Пер. с англ. М., 1975.

Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток/Пер. с англ. М., 1978.

#### К главе 8

Аркадьева З. А. Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства микроорганизмов при различных методах хранения//Науч. доклады высшей шк. Сер. биол. науки. М., 1983. № 4.

Бекер М. Е., Дамбэрг Б. Э., Рапопорт. А. И. Анабиоз микроорганизмов. Рига, 1981.

Герна Р. Л. Хранение микроорганизмов//Методы общей бактериологии. М., 1983. Т. I.

Жизнь микробов в экстремальных условиях/Под ред. Д. Кашнера. М., 1981.

Куплетская М. Б., Аркадьева З. А. О хранении лиофилизированных культур сапрофитных микроорганизмов//Микробиология. М., 1980. Т. 49. № 4. С. 621—623.

Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. М., 1967.

Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. Киев, 1975.

Фатеева М. В. Коллекции микроорганизмов и методы длительного хране-

ния коллекционных культур//Успехи микробиологии. М., 1983. Т. 18. С. 193—215.  
*Catalogue of Cultures Czechoslovak Collection of Microorganisms.* Brno, 1975.  
*Survival of Vegetative microbes*/Ed. by T. R. G. Gray a. J. R. Postgate. 1976.

#### К главе 9

Адамс М. Бактериофаги. М., 1961.  
Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.  
Крылов В. Н., Жазыков И. Ж. Бактериофаг Kz — возможная модель для изучения генетического контроля морфогенеза//Генетика. М., 1978. Т. 14. С. 678—685.  
Изучение устойчивости *Pseudomonas putida* к различным бактериофагам//Генетика. М., 1981. Т. 18. С. 1737—1744.  
Тихоненко А. С. Ультраструктура вирусов бактерий. М., 1968.  
Фаг лямбда. М., 1975.  
Campbell A. Defective bacteriophages and incomplete prophages. 1977//In «Comprehensive Virology»/Ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. Wagner. 1977. V. 8. P. 259—328.  
Charbit A., Clement J. M., Hofnung M. Further sequence analysis of the phage lambda receptor site//J. Mol. Biol. 1984. V. 175. P. 395—401.  
Kato F., Yoshimi M., Araki K. et al. Screening of bacteriocins in aminoacid or Nucleic acid producing bacteria and related species. Agric. Biol. Chem. 1984. 48. P. 193—200.  
Lambda II. Cold spring Harbor Laboratory. Cold spring Harbor. New York, 1983. 694 p.  
Little J. W., Mount D. W. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. 1982. Cell. V. 29. P. 11—22.

#### К главе 10

Биокатализ/Под ред. И. В. Березина. М., 1984.  
Биосинтез физиологически активных соединений иммобилизованными клетками микроорганизмов//Прикл. биохим. микробиол. М. Т. 18. № 5. С. 681—696.  
Иммобилизованные ферменты/Под ред. И. В. Березина, В. К. Антонова, К. Мартинска. М., 1976. Т. 1.  
Кощеенко К. А. Живые иммобилизованные клетки как биокатализаторы процессов трансформации и биосинтеза органических соединений//Прикл. биохим. микробиол. М., 1981. Т. 17. № 4. С. 477—493.  
Кощеенко К. А. Иммобилизованные клетки//Сер. Микробиология. Итоги науки и техники. М., 1981. № 11.  
Скрябин Г. К., Кощеенко К. А. Иммобилизованные клетки//Сб.: Биотехнология. М., 1984.  
Яковлева В. И. Получение природных аминокислот при помощи биоорганических катализаторов //Сер. Микробиология. Итоги науки и техники. М., 1979. № 12.  
Яковлева В. И. 1980. Современные микробиологические методы получения органических кислот//Прикл. биохим. микробиол. М., 1980. Т. 16. № 4. С. 597—604.  
Berger R., 1981. Immobilisierung microbieller Zellen and deren Nutzung aur Substratwandlung: eine Literaturstudie//Acta Biotechnol. 1981. V. 1. P. 73—102.

#### К главе 11

Антибиотики и их продуценты. Сб. М., 1975.  
Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М., 1986.  
Маслин Д. М. Анзамицины (обзор)//Антибиотики. М., 1979. Т. 24. № 7. С. 535—557.  
Поваров Л. С. Успехи в области получения полусинтетических цефалоспоринов (обзор)//Антибиотики. М., 1979. Т. 24. № 5. С. 376—393.  
Производство антибиотиков/Под ред. С. М. Навашина и др. М., 1970.

Korzubski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kurylowicz W. Antibiotics (Origin, Nature, and Properties). American Society for Microbiology, Washington, 1978. V. 1—3.

#### К главе 12

Березовский В. М. Химия витаминов. М., 1973.

Букин В. Н., Быховский В. Я., Панцхава Е. С. Биохимические и микробиологические основы промышленного получения витамина В<sub>12</sub> методом термофильного метанового брожения. Сб. Витамин В<sub>12</sub> и его применение в животноводстве. М., 1971.

Букин В. Н. Микробиологический синтез витаминов. М., 1972.

Воробьева Л. И. Пропионовокислые бактерии и образование витамина В<sub>12</sub>. М., 1976.

Гальцова Г. Д. Стеринообразование у дрожжевых организмов. М., 1980.

Диканская Э. М. Биосинтез флавинов микроорганизмами//Итоги науки. Сер. Вирусология и микробиология. М., 1972. Т. 3.

Робышева Э. Н. Эргостерин дрожжей//Итоги науки. Сер. Вирусология и микробиология. М., 1972. Т. 3.

Шавловский Г. М. Механизм регуляції біосинтезу рибофлавіну у мікроорганізмів//Вісник АН УРСР. Київ, 1976. № 5. С. 34.

Detain A. Z. Riboflavin oversynthesis. Ann. Rev. Microbiol. 1972.

Economic Microbiology/Ed. A. H. Rose. London; New York; San Francisco, 1978. V. 2. P. 311.

#### К главе 13

Спиричев В. Б., Конь И. Я. Жирорастворимые витамины и мембраны//Журнал ВХО им. Д. И. Менделеева. М., 1978. Т. 23.

Феофилова Е. П. Пигменты микроорганизмов. М., 1974.

Bauernfeind J. C. Carotenoids, Vitamin A precursors and analogs in foods and feeds//Agric Food Chem. 1972. V. 20. P. 436.

Bauernfeind J. C. Carotenoids as colorants and Vitamin A precursors: technological and nutrition application//New York, 1981. P. 436.

Goodwin T. W. The biochemistry of the carotenoids. Chapman. Hall, London, New York. 1980. V. 1, P. 317.

#### К главе 14

Билай В. И. Фузарии. 2-е изд. Киев, 1977.

Муромцев Г. С., Агнестикова В. Н. Гормоны растений — гиббереллины. М., 1973.

Регуляторы роста растений/Под ред. Г. С. Муромцева. М., 1979.

Martin J. F., Detain A. L. Fungal Development and Metabolite Formation//The Filamentous Fungi. III. Developmental Mycology./Eds. J. E. Smith, D. R. Berry, London, 1978.

#### К главе 15

Безбородов А. М. Физиологически активные соединения — продукты микробиологического синтеза//Успехи микробиологии. М., 1980. Т. 15.

Оранская М. С., Гончарова Л. Ф., Безбородов А. М. Алкалоиды спорыньи. Микробиологический синтез. Сб. реферат. материалов. М., 1969. № 2.

Скрябин Г. К., Козловский А. Г. Микробиологический синтез алкалоидов//Биотехнология. М., 1984.

Rehaček H. Ergot alkaloids and their biosynthesis//Adv. Biochem. Eng. 1980. V. 14. P. 33—60.

#### К главе 16

Безбородов А. М. Микробиологический синтез аминокислот//Журнал Всесоюзного химического об-ва им. Д. И. Менделеева. М., 1972. Т. 17. № 5.

Бекер В. Ф., Бекер М. Е. Лизин микробного синтеза. Рига, 1974.

Беликов В. М. Аминокислоты, их химический анализ и применение//Вестник АН СССР. М., 1973. Т. 8.

Березин И. В., Клесов А. А. Ферментные электроды//Успехи химии. М., 1976. Т. 45. № 2.

Букин В. Н., Томмэ М. Ф. Лизин — получение и применение в животноводстве. М., 1973.

Зайцева З. М. Биосинтез лизина промышленными микроорганизмами//Успехи микробиологии. М., 1976. Т. 11.

Каган З. С., Машатина Л. И. Декарбоксилаза мезо- $\alpha$ - $\epsilon$ -диаминопимелиновой кислоты *Brevibacterium 22*//Прикл. биохим. и микробиол. М., 1969. Т. 5. № 5. С. 578—583.

Котова Г. А., Безбородов А. М. Получение аминокислот с использованием иммобилизованных ферментов//ОНТИТЭИ микробиол. промышленности. М., 1978.

Биосинтез аминокислот микроорганизмами/Рубан Е. Л. и др. М., 1968.

Садовникова М. С., Беликов В. М. Пути применения аминокислот в промышленности//Сб.: Успехи химии. М., 1978. Т. 47. № 2. С. 357—383.

Сафонова Э. Н., Беликов В. М. Успехи в области синтеза и производства аминокислот//Сб.: Успехи химии. М., 1974. Т. 43. № 9. С. 1575—1609.

Торчинский Ю. М. Химические свойства метионина и его роль в белках//Успехи современной биологии. М., 1976. Т. 82. № 3 (6).

Umbarger H. E. Regulation of amino acids biosynthesis in microorganisms//Synthesis of Amino Acid and Proteins/Biochemistry. Series one./Edit. H. R. V. Arnstein. London; Baltimore, 1975. V. 7. P. 1—56.

#### К главе 17

Безбородов А. М. Микробиологический синтез нуклеотидов и их производных//Журнал Всесоюзного химического об-ва им. Д. И. Менделеева. М., 1982. Т. 27. Вып. 6.

Samejima H., Kimura K., Ado Y. Recent development and future directions of enzyme technology in Japan//Biochimie. 1980. V. 62. P. 229—315.

#### К главе 18

Биотехнология. М., 1984.

Грачева И. М. Технология ферментных процессов. М., 1975.

Калуныц К. А., Голгер Л. И. Микробные ферментные препараты. М., 1979.

Ферменты медицинского назначения/Под ред. А. А. Терешина. Л., 1975.

#### К главе 19

Верещагин А. Б. Биохимия триглицеридов. М., 1972.

Залашко М. В. Биосинтез липидов дрожжами. Минск, 1971.

Залашко М. В., Пидопличко Г. А. Экстрацеллюлярные продукты метаболизма дрожжей. Минск, 1979.

Коронелли Т. В. Липиды микробактерий и родственных микроорганизмов//Сб.: Успехи микробиологии. М., 1977. Вып. 12. 164.

Линдджер А. Биохимия. М., 1974.

Молекулярная микробиология/Под ред. Б. Н. Ильешенко. М., 1977.

Рубан Е. Л. Микробные липиды и липазы. М., 1977.

Kieth A., Wisnieski B., Henry S., William S. Lipids and Biomembranes of Eucariotic Microorganisms. New York; London, 1973. P. 279.

#### К главе 20

Ботвинко И. В. Экзополисахариды бактерий//Успехи микробиол. 1985. № 20.

Вудсайд Е., Кваринский Е. Полисахариды микроорганизмов//Молекулярная микробиология. М., 1977.



*Елинов Н. П.* Некоторые микробные полисахариды и их практическое применение//Сб.: Успехи микробиол. 1982. № 17. С. 158.

*Ермольева З. В., Вайсберг Г. Е.* Стимуляция неспецифической резистентности организма и бактериальные полисахариды. М., 1976.

*Малер Г., Кордес Ю.* Основы биологической химии. М., 1970.

*Маслаков Д. А., Эйсмонт К. А.* Биологическая активность некоторых полисахаридов и их клиническое применение. Минск, 1977.

*Наумова И. Ю.* Тейхоевые кислоты грамположительных бактерий (структура, локализация, биосинтез)//Успехи биол. химии. 1979. Т. 20, 128.

*Степаненко Б. Н.* Химия и биохимия углеводов (полисахариды). М., 1978.

*Alsop R. M.* Industrial production of dextrans//Progr. Ind. Microbiol. 1983. 18, 1.

*Carbohydrates.* Handbook of Microbiology. Microbial composition. II//Ed. Laskin A. L. a. Lechevalier H. A., 1973. P. 87.

*Kang K. S., Veeder G. T., Gottrell J. W.* 1983. Some novel bacterial polysaccharides of recent development//Progr. Ind. Microbiol., 18, 231.

*Lindberg B., Svensson S.* Microbial polysaccharides. Carbohydrates. London, 1973. 319 p.

*Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*/Ed. Berkley R. C. W., Gooday G. W., Ellwood D. C. London, 1979.

## К главе 21

*Авакянц С. П.* Биохимические основы технологии шампанского. М., 1980.  
*Бабьева И. П., Голубев В. И.* Методы выделения и идентификации дрожжей. М., 1979.

*Берри Б.* Биология дрожжей. М., 1985.

*Брухман Э. Э.* Прикладная биохимия/Пер. с нем. М., 1981.

*Бурьян Н. И., Тюрина Л. В.* Микробиология виноделия. М., 1979.

*Главачек Ф., Лхотский А.* Пивоварение/Пер. с чешск. М., 1977.

*Жвирблянская А. Ю., Исаева В. С.* Дрожжи в пивоварении. М., 1979.

*Жизнь растений.* В 6 т. М., 1976. Т. 2.

*Квасников Е. И., Исакова Д. М.* Физиология термотолерантных микроорганизмов. М., 1978.

*Карогинсинтезирующие дрожжи.*/Квасников Е. И. и др. Киев, 1980.

*Косиков К. В.* Генетические методы селекции дрожжей (гибридизация, полиплоидия). М., 1979.

*Мальцев П. М.* Технология бродильных производств. М., 1980.

*Маринченко В. А., Метюшев Б. Д., Швец В. Н.* Технология спирта из мелассы. Киев, 1975.

*Мецлер Д.* Биохимия. В 3 т. М., 1980. Т. 2.

*Теория и практика виноделия.* В 3 т. *Рибера-Гайон Ж.* и др. М., 1980.

*Семихатова Н. М.* Хлебопекарные дрожжи. М., 1980.

*Яровенко В. Л., Ровинский Л. А.* Моделирование и оптимизация микробиологических процессов спиртового производства. М., 1978.

*Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D.* A guide to identifying and classifying yeast. Cambridge; London; New York; Melbourne. 1983. 811 p.

*The Yeasts.* A taxonomic study. 3-d rev. a. enlarged ed. Ed. by N. Y. W. Kreger-Van-Rij. Elsevier Sci. Publishers B. V. Amsterdam, 1984. P. 379—398.

## К главе 22

*Ауэрман Л. Я.* Технология хлебопекарного производства. М., 1972.

*Богданов В. М.* Микробиология молока и молочных продуктов. М., 1969.

*Бурьян Н. И., Тюрина Л. В.* Микробиология виноделия. М., 1979.

*Герасимов М. А.* Технология вина. 3-е изд., М., 1964.

*Готтшалк Г.* Метаболизм бактерий. М., 1982.

*Силос/Даниленко И. А.* и др. М., 1972.

*Квасников Е. И.* Биология молочнокислых бактерий. Ташкент, 1960.

*Квасников Е. И., Коваленко Н. К., Нестеренко О. А.* Молочнокислые бактерии в природе и народном хозяйстве//Прикладная биохимия и микробиология. М., 1982. Т. 18. Вып. 6.

*Квасников Е. И., Нестеренко О. А.* Молочнокислые бактерии и пути их использования. М., 1975.

*Королев С. А.* Основы технической микробиологии молочного дела. 3-е изд. М., 1974.

*Королева Н. С.* Техническая микробиология цельномолочных продуктов. М., 1975.

*Мюллер Г., Литц П., Мюнх Г. Д.* Микробиология пищевых продуктов растительного происхождения. М., 1977.

*Находкина В. З.* Микробиология и микробиологический контроль в свекло-сахарном производстве. М., 1975.

*Пастер Л.* Статья о так называемом молочнокислом брожении. Избранные труды. В 2 т. М., 1960. Т. 1.

*Стейнер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж.* Мир микробов. В 3 т. М., 1979.

*Феномен долгожительства.* М., 1982.

*Шандерль Г.* Микробиология соков и вин. М., 1967.

*Яровенко В. Л.* Основные закономерности непрерывного спиртового и ацетоно-бутилового брожения. М., 1975. С. 103.

*Orla-Jensen S.* The lactic acid bacteria/2nd ed.—Kobenhavn: Munksgaard. 1943, P. 197.

*Sharpe M. E.* Identification of the lactic acid bacteria//Identification methods in microbiology. London; New York et al. 1979. P. 233—259.

#### К главе 23

*Воробьева Л. И.* Пропионовокислые бактерии и образование витамина В<sub>12</sub>. М., 1976.

*Воробьева Л. И., Стоянова Л. Г., Алексеева М. А.* Пути использования пропионовокислых бактерий//Сб.: Микробные метаболиты. М., 1979. С. 88.

*Cummins S., Johnson J. L.* The Genus Propionibacterium.//The Prokaryotes. Handbook of Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Berlin; Heidelberg; New York, 1981. V. II. Ch. 145. P. 1894.

#### К главе 24

*Готтшалк Г.* Метаболизм бактерий. М., 1982.

*Лозоткин И. С.* Технология ацетонобутилового производства. М., 1958.

*Нахманович Б. М.* Исследования по непрерывному ацетонобутилового брожению//Непрерывное брожение и выращивание микроорганизмов. М., 1960.

*Прескот С. и Дэн С.* Техническая микробиология. М., 1952.

*Шапошников В. Н.* Техническая микробиология. М., 1948.

*Непрерывное брожение в ацетонобутиловом производстве/Яровенко В. Л. и др.* Нальчик, 1963.

*The Prokaryotes.* Berlin; Heidelberg; New York, 1981. V. II.

#### К главе 25

*Лойцянская М. С., Павленко Г. В., Золотарева Г. А.* 1977. Тип жгутикования Acetobacter и Gluconobacter//Вестник ЛГУ. Л., 1977. № 3. С. 99.

*Лойцянская М. С., Павленко Г. В., Ивченко А. И.* Исследование по систематике уксуснокислых бактерий//Микробиология. М., 1979. № 48. С. 545.

*Лойцянская М. С., Успенская С. Н.* Метаболизм рафинозы у Gluconobacter oхudans//Микробиология. М., 1976. № 45. С. 229.

*Лойцянская М. С., Элисашвили В. И., Шатаева Л. К.* Выделение левансахарозы Acetobacter suboxydans Л-1 и изучение ее свойств//Прикл. биохим. и микробиол. М., 1975. № 11. С. 406.

*Николаев П. И., Игнатов Ю. Л., Смирнов С. И. и др.* Способ микробиологического непрерывного глубинного получения уксусной кислоты (пищевого уксуса). Авт. свид. № 269930.

*Получение диоксиацетона путем окисления глицерина суспензией покоящихся клеток Gluconobacter oхudans//Прикл. биохим. и микробиол. М., 1974. № 10. С. 59.*

*Атеуата М., Тауата К., Miyagawa E.* A new enzymatic microdetermination procedure from ethanol with particulate alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria. Agr., briol., Chem. 1978. N 42. P. 2063.

- Asai T.* Acetic acid bacteria. Tokyo; Baltimore. 1968.  
*De Ley J., Kersters K.* Oxidation of aliphatic glycols by acetic acid bacteria.  
// Bacteriol. reviews. 1964. 28. P. 164.  
*Englard S., Avigad G.* 5-keto-D-fructose reductase from *Gluconobacter cerinus*//Methods of enzymology. 1975. N 41. P. 127.

#### К главе 26

- Андеркофлер Л. А. и Хиккей.* Бродильные производства. М., 1959. Т. 1.  
*Бекер М. Е.* 1978. Введение в биотехнологию. 1978.  
*Буткевич В. С.,* 1957. Избранные труды. М., 1957. Т. 1.  
*Горленко М. В.* Жизнь растений. М., 1976. Т. 2. Грибы.  
*Карклиньш Р. Я., Пробок А. К.* Биосинтез органических кислот. Рига, 1972.  
*Карклиньш Р. Я., Лука В. Т.* Поверхностное культивирование микроорганизмов//Биотехнология микробного синтеза/Под ред. Бекер М. Е. Рига, 1980.  
*Лозинов А. Б., Финогенова Т. В.,* Микробиологический синтез органических кислот из углеводов нефти//Журнал Всесоюзного химического общества им. Д. И. Менделеева. М., 1972. Т. 17.  
*Прескот С., Дэн С.* Техническая микробиология. М., 1952.  
*Финогенова Т. В.* Микробиологическое получение органических кислот//Биотехнология/Под ред. А. А. Баева. М., 1984.  
*Шапошников В. Н.* Техническая микробиология. М., 1948.  
*Lockwood L. B.* Organic acid production. In ed. Smith Y. E., Berry D. R. The filamentous fungi. London, 1975. V. 1. Industrial Mycology. P. 140.  
*Mrall L. M.* Organic acids. In ed. Rose A. H. Economic Microbiology. London; New York, 1978. P. 48.

#### К главе 27

- Ахрем А. А., Титов Ю. А.* Микроорганизмы и стероиды. М., 1971.  
*Скрябин Г. К., Головлева Л. А.* Использование микроорганизмов в органическом синтезе. М., 1976.  
*Уоллен Л., Стодола Ф., Джексон Р.* Типовые реакции ферментативной химии. М., 1962.  
*Фонкен Г., Джонсон Р.* Микробиологическое окисление. М., 1976.  
*Kieslich K.* Microbial Transformation of Non-Steroid Cyclic Compounds. Stuttgart: Thieme, 1976.

#### К главе 28

- Алимова Е. К., Аствакатурьян А. Г., Жаров Л. В.* Липиды и жирные кислоты в норме и при ряде патологических состояний. М., 1975.  
*Дедюхина Э. Г., Ерошин В. К.* Биосинтез углеводов микроорганизмами//Успехи современной биологии. М., 1973. № 76.  
*Ерошин В. К.* О направлениях микробиологических исследований по получению белковых веществ//Микробиологическая промышленность. М., 1973. № 4, 5.  
*Лобанок А. Г., Бабицкая В. Г.* Микробиологический синтез белка на целлюлозе. Минск, 1976.  
*Минкевич И. Г., Ерошин В. К.* Закономерности внутриклеточного материально-энергетического баланса роста микроорганизмов//Успехи современной биологии. М., 1976. № 82. 103.  
*Музафаров А. М., Таубаев Т. Т.* Хлорелла. Ташкент, 1974.  
*Покровский А. А.* Роль биохимии в развитии науки о питании. М., 1974.  
*Скрябин Г. К., Ерошин В. К.* Исследования по микробиологическому биосинтезу белка в СССР//Микробиология. М., 1977. Т. 46. С. 811.  
*Некоторые результаты и перспективы исследований биосинтеза водородокисляющих бактерий. Управление биосинтезом водородных бактерий и других хемоавтотрофов//Тезисы Всесоюзного совещания 26—28 мая 1976 г. Красноярск, 1976.*  
*Erickson L. E., Minkevich I. G., Eroshin V. K.* Application of Mass and Energy Balance Regularities in Fermentation//Biotechnology and Bioengineering, 1978. XX. 1595.  
*Lovland J., Harper J. M., Frey A. L.* Single Cell Protein for Human Food — A. Review. Lebensm//Wiss. u. Technol., 1976. 9, 131.

### К главе 29

- Блохина И. Н., Дорфейчук В. Г.* Дисбактериоз. М., 1979.  
*Химические вакцины для профилактики кишечных инфекций/Карпухин Г. И.* и др. М., 1979.  
*Методическое руководство по лабораторной оценке качества бактериальных и вирусных препаратов.* М., 1972.  
*Руководство по вакцинно-сывороточному делу/Под ред. академика АМН СССР П. Н. Бургасова.* М., 1978.

### К главе 30

- Доросинский Л. М.* Клубеньковые бактерии и нитрагин. Л., 1970.  
*Кретович В. Л.* Молекулярные механизмы усвоения азота растениями. М., 1980.  
*Минеральный и биологический азот в земледелии СССР.* М., 1955.  
*Мишустин Е. Н., Шильникова В. К.* Биологическая фиксация молекулярного азота. М., 1968.  
*Хотянович А. В., Позднякова А. И.* Производство торфяных препаратов клубеньковых бактерий//Труды ВНИИ сельскохоз. микробиолог. М., 1980. Т. 50.  
*Хотянович А. В., Чиканова В. М., Бочаров В. В.* Эффективность различных методов инокуляции бобовых растений препаратами клубеньковых бактерий//Прикл. биохимия и микробиол. М., 1982. Т. 18. Вып. 4.  
*Шильникова В. К., Серова Е. Я.* Микроорганизмы — азотонакопители на службе растений. М., 1983.

### К главе 31

- Африкян Э. К.* Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван, 1973.  
*Биологическая борьба с вредными насекомыми и сорняками./Пер. с англ./Под ред. и с предисл. Б. И. Рукавишникова.* М., 1986.  
*Вейзер Я.* Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми./Пер. с чешск. М., 1972.  
*Гулий В. В., Иванов Г. М., Штерншис М. В.* Микробиологическая борьба с вредными организмами. М., 1982.  
*Евлахова А. А.* Энтомопатогенные грибы. Л., 1974.  
*Кандыбин Н. В.* Микробиологический метод борьбы с грызунами. М., 1974.  
*Кандыбин Н. В.* Микробиологические средства защиты растений//Научные основы защиты растений. М., 1984.  
*Прохоров М. И.* Микробиологический метод борьбы с вредными грызунами. Л., 1966.  
*Штейнхауз Э.* Патология насекомых/Пер. с англ. М., 1952.

### К главе 32

- Бонч-Осмоловская Е. А.* Образование метана сообществами микроорганизмов//Успехи микробиологии. М., 1979. Т. 14.  
*Варфоломеев С. Д.* Конверсия энергии биокаталитическими системами. М., 1981.  
*Заварзин Г. А.* Водородные бактерии и карбоксидобактерии. М., 1978.  
*Заварзин Г. А.* Бактерии и состав атмосферы. М., 1984.  
*Чан Динь Тоай, Хлудова М. С., Панцхава Е. С.* Биогенез метана//Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. М., 1983.  
*Готтшалк Г.* Метаболизм бактерий. М., 1982.  
*Кондратьева Е. Н.* Хемолитотрофы и метилотрофы. М., 1983.  
*Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н.* Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М., 1981.  
*Daniels L., Sparling R., Sprott G. D.* The bioenergetics of methanogenesis. Biochem. Biophys. Acta, 1984. P. 768.

### К главе 33

*Каравайко Г. И.* Микробиологические процессы выщелачивания металлов из руд. Обзор проблемы. М., 1984.

*Каравайко Г. И., Кузнецов С. И., Голомзик А. И.* Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М., 1972.

*Полькин С. И., Адамов Э. В., Панин В. В.* Технология бактериального выщелачивания цветных и редких металлов. М., 1982.

*Труды международного симпозиума и международных учебных курсов.*/Под ред. Г. И. Каравайко и С. Грудева. М., 1985.

*Яхонтова Л. К., Грудев А. П.* Зона гипергенеза рудных месторождений. М., 1978.

### К главе 34

*Микробная коррозия и ее возбудители*/Андреюк Е. И. и др. Киев, 1980.

*Благник Р., Занова В.* Микробиологическая коррозия. М., 1965.

*Повреждение промышленных материалов и изделий под воздействием микроорганизмов.* Справочник. М., 1971.

*Каневская И. Г.* Биологическое повреждение промышленных материалов. Л., 1984.

*Методы определения биостойкости материалов.* Сб. М., 1979.

*Микроорганизмы и низшие растения — разрушители материалов и изделий.* М., 1979.

*Руководство по обеспечению сохранности документов.* М., 1978.

*Теория и практика сохранения книг в библиотеке.* Сб. научных трудов гос. публ. б-ки им. М. Е. Салтыкова-Щедрина. Л., 1980. № 9.

*Rehm H. J.* Industrielle Mikrobiologie Berlin; Heidelberg; New York. 1980.

*Seal K. J., Eggins H. O. W.* The Biodeterioration of Materials//In: Essays in Applied Microbiology./Ed. Norris J. B., Richmond M. H. New York; Toronto, 1981.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие (Н. С. Егоров) . . . . .	3
Введение (Н. С. Егоров) . . . . .	5
<b>Раздел 1. Научные основы промышленной микробиологии</b> . . . . .	
Глава 1. История промышленной микробиологии (Е. Н. Квасников, Т. Е. Попова) . . . . .	9
Глава 2. Общая характеристика микроорганизмов (Е. Н. Кондратьева) . . . . .	17
Глава 3. Основные принципы регуляции метаболизма и скорости роста микроорганизмов (В. К. Плакунов) . . . . .	29
Глава 4. Селекция микроорганизмов — продуцентов практически важных веществ (Н. И. Жданова) . . . . .	77
Глава 5. Использование генетической инженерии для получения практически полезных штаммов микроорганизмов (В. Г. Дебабов) . . . . .	96
Глава 6. Культивирование микроорганизмов (И. Л. Работнова) . . . . .	113
Глава 7. Аэрация при культивировании микроорганизмов (П. И. Николаев) . . . . .	139
Глава 8. Хранение микроорганизмов (З. А. Аркадьева) . . . . .	149
Глава 9. Бактериофаги в микробиологической промышленности (В. Н. Крылов) . . . . .	167
Глава 10. Имобилизованные клетки микроорганизмов и их применение (К. А. Кощенко) . . . . .	216
<b>Раздел 2. Получение биологически активных веществ и отдельных компонентов микробных клеток</b> . . . . .	236
Глава 11. Антибиотики (Н. С. Егоров) . . . . .	236
Глава 12. Витамины (Л. И. Воробьева) . . . . .	283
Глава 13. Каротиноиды (Е. П. Феофилова) . . . . .	310
Глава 14. Гиббереллины (А. М. Безбородов) . . . . .	325
Глава 15. Алкалоиды (А. М. Безбородов) . . . . .	332
Глава 16. Аминокислоты (А. М. Безбородов) . . . . .	338
Глава 17. Нуклеотиды (А. М. Безбородов) . . . . .	353
Глава 18. Ферменты (Е. Л. Рубан) . . . . .	359
Глава 19. Липиды (М. В. Залашко) . . . . .	378
Глава 20. Полисахариды (Н. Н. Гречушкина) . . . . .	389
<b>Раздел 3. Использование брожений и других процессов метаболизма</b> . . . . .	414
Глава 21. Спиртовое брожение (Е. Н. Квасников, Н. Ф. Щелокова) . . . . .	414
Глава 22. Молочнокислое брожение (Е. Н. Квасников, О. А. Нестеренко) . . . . .	438
Глава 23. Пропионовокислое брожение (Л. И. Воробьева) . . . . .	462
Глава 24. Ацетонно-бутиловое брожение (Б. М. Нахманович) . . . . .	469
Глава 25. Получение уксуса и другие аспекты использования уксуснокислых бактерий (М. С. Лойцянская) . . . . .	477
Глава 26. Получение органических кислот (Т. В. Финогенова) . . . . .	494
Глава 27. Трансформация органических соединений (Г. К. Скрябин, Е. Л. Головлев, Л. А. Головлева) . . . . .	523
<b>Раздел 4. Производства, основанные на получении микробной биомассы</b> . . . . .	547
Глава 28. Получение белка (Г. К. Скрябин, В. К. Ерошин) . . . . .	547
Глава 29. Производство вакцин, бактериофагов и препаратов, нормализующих микрофлору человека (И. Н. Блохина, С. А. Голубева) . . . . .	570
Глава 30. Получение азотфиксирующих бактериальных препаратов (А. В. Хотянович) . . . . .	586
Глава 31. Препараты микроорганизмов против животных — вредителей растений (Н. В. Кандыбин) . . . . .	599
Глава 32. Получение газообразного и жидкого топлива (Е. С. Панцхава) . . . . .	617
Глава 33. Биотехнология металлов (Г. И. Каравайко) . . . . .	634
Глава 34. Повреждение микроорганизмами материалов и способы их защиты (М. Н. Пименова) . . . . .	660
Литература . . . . .	677