

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ СО РАН

Т. Г. Волова

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Ответственный редактор
академик

И. И. Гительзон

*Рекомендовано Министерством общего и профессионального образования
Российской Федерации в качестве учебного пособия
для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению
«Химическая технология и биотехнология», специальностям «Микробиология», «Эко-
логия», «Биоэкология», «Биотехнология».*



Издательство СО РАН
Новосибирск
1999

УДК 579 (075.8)

ББК 30.16

В 68

Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск: Изд-во Сибирского
отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.

ISBN 5-7692-0204-1

В монографии отражен современный уровень знаний по различным направлениям биотехнологии. Изложены общие вопросы научных основ биотехнологии как науки и промышленной отрасли – история возникновения и развития, специфика и возможности различных биотехнологических процессов; охарактеризованы биологические агенты, субстраты, аппаратура и получаемые целевые продукты. Даны процессы получения белка одноклеточных, аминокислот, антибиотиков, органических кислот, биополимеров. Рассмотрены новейшие методы биотехнологии – инженерная энзимология, клеточная и генетическая инженерия. Описаны экологически чистые способы получения и применения биопрепаратов для сельского хозяйства; вклад биотехнологии в восполнение энергетических и минеральных ресурсов; приведены примеры биологических способов переработки и утилизации отходов.

Книга предназначена для студентов, аспирантов, научных работников и специалистов – микробиологов, биотехнологов, химиков-технологов, экологов.

Табл. 26. Илл. 43. Библиогр.: 133 назв.

Рецензенты:

Кафедра промышленной биотехнологии

Московского химико-технологического университета им. Д. И. Менделеева;

профессор М. Н. Манаков

доктор биологических наук А. В. Брильков

Утверждено к печати
Институтом биофизики СО РАН

© Т. Г. Волова, 1999

© Институт биофизики СО РАН, 1999

ISBN 5-7692-0204-1

Учебное издание

Волова Татьяна Григорьевна

БИОТЕХНОЛОГИЯ

ЛР № 020909 от 01.09.94.

Сдано в набор 19.08.99. Подписано в печать 26.09.99.

Формат 60x84/16. Гарнитура Таймс. Уч. изд. л. 12.5.

Усл. печ. л. 15,8. Тираж 100. Заказ № 30.

Издательство Сибирского отделения Российской Академии наук.
630090, Новосибирск, Морской пр., 2.

Отпечатано в типографии Института физики СО РАН.
660036, Красноярск, Академгородок.

Электронная версия расположена на сайте КрасГУ
<http://www.lan.krasu.ru/stadies/editions.asp>

ОТ РЕДАКТОРА

С удовольствием представляю читателю книгу профессора Т. Г. Воловой «Биотехнология».

Потребность в общем учебном руководстве по биотехнологии несомненна. Биотехнология – одна из наиболее быстро развивающихся областей промышленности и наиболее перспективная в силу ее экономичности и экологичности.

Термин «биотехнология» понимается в настоящее время не однозначно. В расширительном толковании биотехнология – это все технологические процессы, в которых используются живые организмы. Но при таком понимании все сельское хозяйство, начиная с самых первобытных его форм, нужно включить в биотехнологию. В точном понимании слова это справедливо, но вряд ли конструктивно, т.к. не содержит в себе ничего нового. Противоположная крайность – ограничить биотехнологию генно-инженерными манипуляциями. Под впечатлением недавно еще немислимых возможностей воздействовать на геном, буквально – «лепить живые формы», возникла тенденция оставить понятие биотехнология для обозначения только этой, безусловно, самой перспективной и самой быстро развивающейся области прикладной биотехнологии. Но при этом остается за бортом биотехнологии то, что составило ее действительную основу – биотехнологические, главным образом, промышленные микробиологические производства.

Если отказаться от обеих крайних позиций, то биотехнологию можно определить по ее основному признаку – управлению биотехнологическими процессами. Согласно этому представлению, биотехнология является наукой о способах получения целевых продуктов с помощью биосинтеза, управляемого параметрами среды или генно-инженерными манипуляциями, либо сочетанием этих воздействий.

Таким образом, основой биотехнологии является управляемый биосинтез. Параметрическое управление составляет ее классическое содержание, хотя и в эту область последние десятилетия внесли много нового, в частности, технику непрерывного культивирования микроорганизмов с обратной связью.

Реальная возможность конструирования генома – это достижение последних лет. Его перспективы необозримы. Сочетание генетического и параметрического управления биосинтезом способствует взаимному усилению возможностей этих методологических подходов. Вероятно, их сочетанное использование определит лицо биотехнологии ближайшего будущего.

В условиях, когда императивной задачей всей технологической цивилизации становится переход к экологически совместимым, «дружественным природе» технологиям, биотехнология привлекает внимание прежде всего. Биотехнологические процессы сродни живой природе по самой сво-

ей основе, продукты биосинтеза биологическими же процессами могут быть и разрушены. В этом видится выход из основного тупика современных технологий – производства и накопления недеградируемых продуктов и засорения ими природной среды.

Неизбежная переориентация промышленности на безотходные производства делает биотехнологию областью наиболее быстрого развития в ближайшем будущем с широким спектром производств – от замещающих генов и гормонов в медицине до биометаллургии.

В свете этой перспективы, издание руководства, подобного книге Т. Г. Воловой, представляется весьма своевременным и позитивным. Профессор Т. Г. Волова – известный специалист в области хемобиосинтеза. Ею разрабатываются пути получения ценных биологических продуктов с помощью экзотических водородных бактерий, способных черпать энергию из реакции окисления водорода кислородом, т.е. реакции «гемучего газа», но выполняемой ферментативно без взрыва и высоких температур при эффективном использовании энергии водорода в биосинтезе. Это путь естественного сопряжения двух магистральных направлений в развитии технологии XXI века – водородной энергетики и биотехнологии.

Книга Т. Г. Воловой адресована, прежде всего, студентам – биологам, технологам, экологам, но много полезного для себя в ней найдут и специалисты более старшего поколения, работающие в микробиологической, пищевой, химической промышленности и смежных отраслях, а также все, кто интересуется потенциалом этой новой области знаний.

академик И. И. Гительзон

Введение

Биологические технологии (биотехнологии) обеспечивают управляемое получение полезных продуктов для различных сфер человеческой деятельности. Эти технологии базируются на использовании каталитического потенциала различных биологических агентов и систем – микроорганизмов, вирусов, растительных и животных клеток и тканей, а также внеклеточных веществ и компонентов клеток. В настоящее время разработка и освоение биотехнологии занимают важное место в деятельности практически всех стран. Достижение превосходства в биотехнологии является одной из центральных задач в экономической политике развитых стран. Лидерами биотехнологии являются сегодня США и Япония, накопившие многолетний опыт биотехнологий для сельского хозяйства, фармацевтической, пищевой и химической промышленности. Прочное положение в производстве ферментных препаратов, аминокислот, белка, медикаментов занимают страны Западной Европы (ФРГ, Франция, Великобритания), а также Россия. Эти страны характеризуются мощным потенциалом новой техники и технологии, интенсивными фундаментальными и прикладными исследованиями в различных областях биотехнологии. Определить сегодня, что же такое биотехнология, весьма не просто. Вместе с тем, само появление этого термина в нашем словаре глубоко символично. Оно отражает мнение, что применение биотехнологических материалов и принципов в ближайшие годы радикально изменит многие отрасли промышленности и само человеческое общество. Интерес к этой науке и темпы ее развития в последние годы растут очень быстро.

Человек использовал биотехнологию многие тысячи лет: люди занимались пивоварением, пекли хлеб, получали кисломолочные продукты, применяли ферментации для получения лекарственных веществ и переработки отходов. Но только новейшие методы биотехнологии, включая методы генетической инженерии, основанные на работе с рекомбинантными ДНК, привели к «биотехнологическому буму», свидетелями которого являемся мы в настоящее время. Новейшие технологии генетической инженерии позволяют существенно усовершенствовать традиционные биотехнологические процессы, а также получать принципиально новыми, ранее недоступными способами разнообразные ценные продукты.

Развитие и преобразование биотехнологии обусловлено глубокими переменами, происшедшими в биологии в течение последних 25–30 лет. Основу этих событий составили новые представления в области наследственности и методические усовершенствования, которые приблизили человечество к познанию превращений ее материального субстрата и проложили дорогу новейшим промышленным процессам. Помимо этого, ряд

Области науки, новейшие результаты которых важны для развития биотехнологии

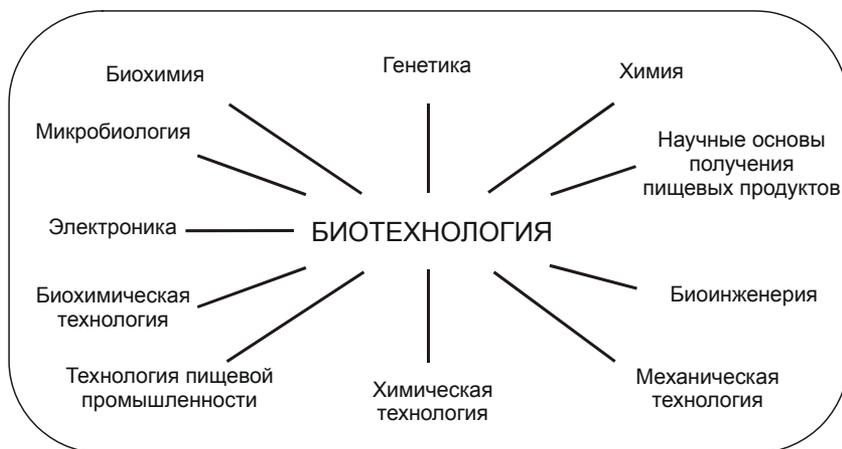
Генетическая инженерия	Технология рекомбинантных ДНК.
Биокатализ	Ферменты (выделение, иммобилизация). Целые микробные клетки (иммобилизация, стабилизация).
Иммунология	Моноклональные антитела.
Технология ферментации	Производство продуктов. Переработка отходов.

важнейших открытий в других областях также повлиял на развитие биотехнологии (см. таблицу).

Генетическая инженерия существует немногим более 20 лет. Она блестяще раскрыла свои возможности в области прокариотических организмов. Однако новые технологии, применяемые к высшим растениям и животным, пока не столь значительны. Попытки применения приемов генетической инженерии к высшим растениям и животным сталкиваются с огромными трудностями, обусловленными как несовершенством наших знаний по генетике эукариот, так и сложностью организации высших организмов.

Использование научных достижений и практические успехи биотехнологии тесно связаны с фундаментальными исследованиями и реализуется на самом высоком уровне современной науки. В этом плане нельзя не отметить удивительную научную многоликость биотехнологии: ее развитие и достижения теснейшим образом связаны и зависят от комплекса знаний не только наук биологического профиля, но также и многих других (см. рисунок).

Сегодня биотехнология стремительно выдвинулась на передние позиции научно-технического прогресса. Фундаментальные исследования жиз-



Междисциплинарная природа биотехнологии

ненных явлений на клеточном и молекулярном уровнях привели к появлению принципиально новых технологий и получению новых продуктов. Традиционные биотехнологические процессы, основанные на брожении, дополняются новыми эффективными процессами получения белков, аминокислот, антибиотиков, ферментов, витаминов, органических кислот и др. Наступила эра новейшей биотехнологии, связанная с получением вакцин, гормонов, интерферонов и др. Важнейшими задачами, стоящими перед биотехнологией сегодня, являются: повышение продуктивности сельскохозяйственных растительных культур и животных, создание новых пород культивируемых в сельском хозяйстве видов, защита окружающей среды и утилизация отходов, создание новых экологически чистых процессов преобразования энергии и получения минеральных ресурсов.

Характеризуя перспективы и роль биотехнологии в человеческом обществе, уместно прибегнуть к высказыванию на одном из Симпозиумов по биотехнологии японского профессора К. Сакагучи, который говорил следующее: «... ищите все, что пожелаете, у микроорганизмов, и они не подведут вас... Изучение и применение в промышленности культур клеток млекопитающих и растений, иммобилизация не только одноклеточных, но и клеток многоклеточных организмов, развитие энзимологии, генетической инженерии, вмешательство в сложный и недостаточно изученный наследственный аппарат растений и животных все больше расширят области применения существующих направлений биотехнологии и создадут принципиально новые направления».

Глава 1. НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

1.1. БИОТЕХНОЛОГИЯ – НОВАЯ КОМПЛЕКСНАЯ ОТРАСЛЬ

Современный этап научно-технического прогресса характеризуется революционными изменениями в биологии, которая становится лидером естествознания. Биология вышла на молекулярный и субклеточный уровень, в ней интенсивно применяются методы смежных наук (физики, химии, математики, кибернетики и др.), системные подходы. Бурное развитие комплекса наук биологического профиля с расширением практической сферы их применения обусловлено также социально-экономическими потребностями общества. Такие актуальные проблемы, стоящие перед человечеством второй половины XX века, как дефицит чистой воды и пищевых веществ (в особенности белковых), загрязнение окружающей среды, недостаток сырьевых и энергетических ресурсов, необходимость развития новых средств диагностики и лечения, не могут быть решены традиционными методами. Поэтому возникла острая необходимость в разработке и внедрение принципиально новых методов и технологий. Большая роль в решение комплекса этих проблем отводится биотехнологии, в рамках которой осуществляется целевое применение биологических систем и процессов в различных сферах человеческой деятельности. В современной биотехнологии в соответствии со спецификой сфер ее применения целесообразно выделить в качестве самостоятельных ряд разделов следующие:

- Промышленная микробиология;
- Медицинская биотехнология;
- Технологическая биоэнергетика,
- Сельскохозяйственная биотехнология;
- Биогидрометаллургия;
- Инженерная энзимология;
- Клеточная и генетическая инженерия;
- Экологическая биотехнология.

Перспективность и эффективность применения биотехнологических процессов в различных сферах человеческой деятельности, от получения пищи и напитков до воспроизводства экологически чистых энергоносителей и новых материалов обусловлена их компактностью и одновременно крупномасштабностью, высоким уровнем механизации и производительности труда. Эти процессы поддаются контролю, регулированию и автоматизации. Биотехнологические процессы, в отличие от химических, реализуются в «мягких» условиях, при нормальном давлении, активной реак-

ции и невысоких температурах среды; они в меньшей степени загрязняют окружающую среду отходами и побочными продуктами, мало зависят от климатических и погодных условий, не требуют больших земельных площадей, не нуждаются в применении пестицидов, гербицидов и других, чужеродных для окружающей среды агентов. Поэтому биотехнология в целом и ее отдельные разделы находится в ряду наиболее приоритетных направлений научно-технического прогресса и является ярким примером «высоких технологий», с которыми связывают перспективы развития многих производств. Биологические технологии находятся в настоящее время в фазе бурного развития, но уровень их развития во многом определяется научно-техническим потенциалом страны. Все высокоразвитые страны мира относят биотехнологию к одной из важнейших современных отраслей, считая ее ключевым методом реконструкции промышленности в соответствии с потребностями времени, и принимают меры по стимулированию ее развития.

Биотехнологические процессы многолики по своим историческим корням и по своей структуре, они объединяют элементы фундаментальных наук, а также ряда прикладных отраслей, таких как химическая технология, машиностроение, экономика. Научная многоликость биотехнологии в целом и ее раздела, имеющего целью решение природоохранных задач, удивительна: они используют достижения наук биологического цикла, изучающих надорганизменный уровень (экология), биологические организмы (микробиология, микология), суборганизменные структуры (молекулярная биология, генетика). Через биологию на биотехнологию влияют химия, физика, математика, кибернетика, механика. Современные биотехнологии также остро нуждаются в научно-обоснованной проработке технологии и аппаратурном оформлении. Поэтому необходима органическая связь с техническими науками – машиностроением, электроникой, автоматикой. Общественные и экономические науки также имеют большое значение в развитии экологической биотехнологии, так как решаемые ею практические задачи имеют большое социально-экономическое значение для развития любого общества. К биотехнологии, как ни к одной любой отрасли и области научных знаний, подходят знаменитые слова Луи Пастера: «Нет, и еще тысячу раз нет, я не знаю такой науки, которую можно было бы назвать прикладной. Есть наука и есть области ее применения, и они связаны друг с другом, как плод с взрастившим его деревом».

1.2. ИСТОРИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ФОРМИРОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Вопрос о формировании биотехнологии трактуется неоднозначно: по мнению одних (Овчинников, Баев, Скрябин), считается правомерным отнести к сфере биотехнологии древние процессы брожения, включая получение спирта, силосование; по мнению других (Айба, Хемфри, Миллис),

условной датой появления биотехнологии можно считать присуждение компании «Мерк Кемикал Компани» за достижения в области биохимической технологии в 1947 г. премии Мак-Гро – Хилла и, наконец, есть мнение, что начало биотехнологии следует отнести к 70-м годам XX столетия к моменту зарождения генетической инженерии. Видимо, правомерно отнести возникновение современной биотехнологии, начавшей свое формирование на базе существующих отраслей микробиологической промышленности, к началу 50-х годов нынешнего века, а весь предшествующий данному периоду этап называть предысторией формирования биотехнологии, ведущей корни из древнейших цивилизаций.

Предысторию формирования биотехнологии можно подразделить на ряд этапов:

- появление эмпирической технологии в 6-м тысячелетии до н.э.,
- зарождение естественных наук в XV–XVII веках;
- формирование микробиологических производств и начало взаимодействия науки и микробиологических производств в конце XIX – 10-х годах XX века, вызвавшее революционное преобразование микробиологических производств;
- создание научно-технических предпосылок для возникновения современной биотехнологии (10-е – конец 40-х годов XX века).

Человек с древнейших времен начал использовать в своей хозяйственной деятельности биологические организмы, в частности микроорганизмы, не зная об их существовании. Первым микробиологическим процессом, использованным на практике, было брожение – процесс обмена веществ, при котором в органическом субстрате происходят изменения под воздействием микробных ферментов. Возбудителями бродильных процессов являются грибы, бактерии, дрожжи. Данные организмы легко культивируются, быстро размножаются в сравнительно простых условиях и синтезируют ферменты, вызывающие разложение органических веществ. С древнейших времен брожение применяли при хлебопечении, пивоварении и виноделии. Так, при раскопках Вавилона обнаружены дощечки, насчитывающие 6000 лет, с описанием процесса приготовления пива, а в пирамидах Египта, построенных в этот же период, – караваи хлеба. Есть сведения об очистных сооружениях, которые функционировали в древнем Риме. С 3–4-го тысячелетий известны человеку процессы пектинового брожения, лежащие в основе мочки прядильных растений, льна, конопли и др. С древнейших времен человечество сталкивалось и с отрицательными последствиями деятельности микроорганизмов (порча продуктов, инфекционные болезни людей и домашнего скота). Следствием этого на первых этапах были неосознанные, эмпирические попытки разработки методов и средств борьбы с этими явлениями. Так стали возникать методы консервирования продуктов.

Во второй половине XV века начитается развитие современного естествознания. На становление и развитие биологии существенное влияние оказали успехи химии, которая из описательной в этот период превращается в аналитическую. Произошли сдвиги в изучении сущности процессов брожения; появился термин «ферментация», а процесс брожения стали связывать с наличием в среде дрожжей или ферментов. В XVI–XVII веках сначала во Франции, а затем повсеместно для разрыхления теста стали использовать пивные дрожжи; позднее с изменением и совершенствованием технологии пивоварения для этих целей стали применять дрожжи спиртовых производств. В Европе стали добывать медь в процессах бактериального выщелачивания.

Во второй половине XVIII века была доказана способность одного вещества разлагать другое. Это послужило началом экспериментального изучения уникальной способности ферментов к катализу специфических химических реакций. Таким образом, развитие описательной микробиологии и изучение химических превращений стали важной предпосылкой для становления микробиологии и биохимии.

В XIX веке с развитием химических наук были заложены основы органической химии. В этот период были открыты многие органические кислоты, глицерин, холестерин, глюкоза, первые аминокислоты, осуществлен синтез мочевины. Для зарождения энзимологии большое значение имело изучение процесса гидролиза полисахаридов. Огромное влияние на создание научных основ микробиологических производств имели работы Луи Пастера, который по просьбе правительства Франции исследовал причины нарушения технологических процессов в ряде производств. Работая в области прикладной микробиологии, Пастер сделал ряд крупнейших фундаментальных открытий, которые заложили основы современной технической микробиологии. Пастер неоспоримо доказал, что болезни, порча продуктов, брожение и гниение вызываются микроорганизмами, и создал теорию об экзогенности попадания этих организмов в среду. Этим была доказана несостоятельность бытующей в то время теории самозарождения микроорганизмов. Работы Пастера заложили научные основы виноделия, пивоварения, производства спирта и уксуса, борьбы с инфекционными болезнями. Современник Пастера Гексли, оценивая работы Пастера, говорил, что «... он своими открытиями возместил Франции большую часть контрибуции, уплаченной Германии». Крупным достижением данного периода была разработка метода чистых культур, а также усовершенствование сред для выделения и выращивания микроорганизмов. Чистые культуры стали применять в сложившихся микробиологических производствах. Большое значение имели работы по изучению микробного антагонизма и применению его в медицине. Мечниковым было создано учение об антагонизме микробов и научно обоснованы рекомендации для практических применений этого учения. В этот период активно изучалась

азотфиксация. Немецкие исследователи Гельригель и Вильфарт установили биологическую природу процесса фиксации азота бобовыми растениями, а Бейеринк выделил чистую культуру клубеньковых бактерий и доказал их присутствие в ризосфере растений. Тогда же блестящими работами Виноградского, Омелянского, Надсона, Исаченко были заложены основы геологической микробиологии; начато изучение роли микроорганизмов в превращениях серы, железа, кальция, грязеобразовании. Стали закладываться научные основы биологической обработки и обезвреживания стоков. Очистные сооружения, известные со времен Древней Индии и Римской империи и пришедшие в упадок в средние века, с бурным развитием промышленности на рубеже XIX–XX веков вновь стали предметом пристальных исследований. В этот период начала складываться энзимология. Для изучения и применения ферментов потребовалась разработка и подбор специальных «мягких» методов выделения и очистки. Началось практическое применение ферментных препаратов для подслащивания ряда веществ, появились препараты для дубления кож и применения в аналитике.

В 70–80-е годы XIX столетия были заложены основы культивирования растительных клеток и животных тканей. После работ Шванна и Вирхова, назвавших клетку элементарным организмом, возник интерес к изучению живых клеток, и начались эксперименты по сохранению жизнеспособности клеток и кусочков тканей в специфических условиях и средах. В 1865 г. Мендель доложил Обществу испытателей природы свои наблюдения о закономерностях передачи наследственных признаков.

В начале XX века были введены термины «мутации», «ген», возникла гипотеза Сэттона-Бовери о том, что хромосомы являются материальными носителями наследственных признаков. Русский цитолог Навашин раскрыл особенности структуры хромосом и заложил основы хромосомной теории наследственности.

Таким образом, в данный период внедрение научных знаний дало возможность приступить к разработке научно-обоснованных биотехнологий многих производственных процессов.

Последний период эры предистории современных биотехнологий (10-е – 40-е годы XX века) условно можно подразделить на два этапа. На первом этапе, в начале его, в основном, происходило усовершенствование технологии существующих производств, а затем, благодаря успехам микробиологии, биохимии и других наук того периода, в результате принципиальных усовершенствований аппаратуры и технологий возникла основа для организации новых производств. В этот период стали выпускать новые экологически чистые биоудобрения и биологические препараты для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений, возникли производства ряда целевых продуктов (органических растворителей, спиртов), начались промышленные испытания биотехнологических

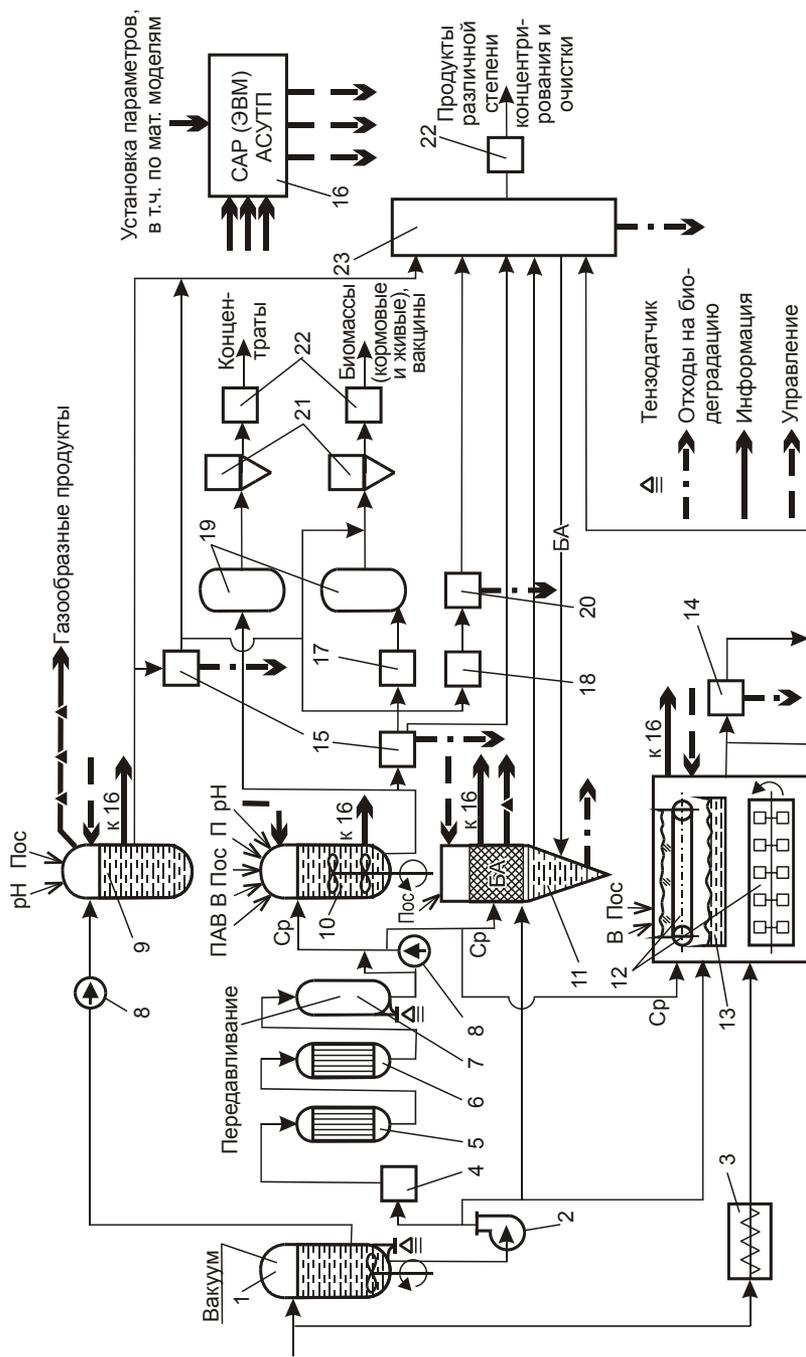
процессов переработки и использования растительных отходов. Второй этап данного периода тесно связан с биотехнологическими методами получения ряда сложных веществ – антибиотиков, ферментов, витаминов. Революционным моментом данного периода была промышленная реализация технологии производства антибиотиков. Отправной точкой при этом послужило открытие Флемингом, Флори и Чейном химиотерапевтического действия пенициллина. Практически одновременно в СССР Ермольева, изучая действие лизоцима, показала, что он является фактором естественного иммунитета, а Гаузе и Бражникова получили новый активный препарат – антибиотик грамицидин.

После второй мировой войны в ходе интенсивного развития промышленных биотехнологий были организованы производства аминокислот, белка одноклеточных, превращение стероидов, освоено культивирование клеток животных и растений. Интактные клетки микроорганизмов широко стали использовать для получения лекарственных веществ стероидной природы, были организованы крупные производства вакцин.

Эра новейших биотехнологических процессов, возникшая в течение последних 25–30 лет, связана с использованием иммобилизованных ферментов и клеточных органелл, а также основана на методах рекомбинантных ДНК. Бурно развивающиеся в настоящее время генетическая и клеточная инженерия способствуют тому, что биотехнологии постепенно завоевывают все новые и новые области производства и решительно внедряются во многие сферы деятельности человека. В 50-е годы после успешного использования для получения вакцины вируса полиомиелита, выращиваемого в культуре клеток млекопитающих, линии культур клеток человека стали незаменимыми для выделения и культивирования ряда других вирусов, производства антител, интерферона, противоопухолевых химиопрепаратов. В конце 60-х годов иммобилизованные ферменты и клетки стали успешно применяться не только для производства полусинтетических препаратов, но и для проведения несложных биохимических анализов.

Возникновение генетической инженерии условно относят к 1972 году, когда в США Бергом была создана первая рекомбинантная молекула ДНК. С середины 70-х годов данной проблемой интенсивно занимаются тысячи научных коллективов и промышленных компаний во всех странах мира. Сочетание слов «генетика» и «инженерия» свидетельствуют о том, что наступило время, когда стало возможным конструирование рекомбинантных ДНК и целенаправленно создавать искусственные генетические программы. Это дало возможность организовать получение многих важных препаратов, а также начать работу по получению новых суперштаммов-деградаторов промышленных токсикантов. Внедрение новейших методов биотехнологии в настоящее время производит переворот в различных областях биотехнологии, включая биотехнологические процессы. Эти методы позволяют интенсифицировать экологически чистые биотехнологии воспроизводства пищи и кормовых препаратов, решать методами задачи

обеспечения человечества материальными и энергетическими ресурсами и также природоохранные проблемы.



Таким образом, корни биотехнологических процессов уходят в далекое прошлое, а их будущее необычайно широко и перспективно. Современным биологическим технологиям под силу создать отрасли, основанные на функционировании биологических систем, метаболические системы которых обладают уникальными достоинствами и подчинены интересам человечества.

1.3. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Важнейшей задачей любого биотехнологического процесса является разработка и оптимизация научно-обоснованной технологии и аппаратуры для него. При организации биотехнологических производств частично был заимствован опыт развитой к тому времени химической технологии. Однако биотехнологические процессы имеют существенное отличие от химических в силу того, что в биотехнологии используют более сложную организацию материи – биологическую. Каждый биологический объект (клетка, фермент и т. д.) – это автономная саморегулирующаяся система. Природа биологических процессов сложна и далеко не выяснена окончательно. Для микробных популяций, например, характерна существенная гетерогенность по ряду признаков – возраст, физиологическая активность, устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов среды. Они также подвержены случайным мутациям, частота которых составляет от 10^{-4} до 10^{-8} . Гетерогенность также может быть обусловлена наличием поверхностей раздела фаз и неоднородностью условий среды.

В общем виде любой биотехнологический процесс включает три основные стадии: **предферментационную, ферментационную и постферментационную**. Принципиальная схема реализации биотехнологических процессов в общем виде может быть представлена блок-схемой, в которой сделана попытка охватить все варианты ферментационных процессов (рис. 1.1).

Рис. 1.1. Принципиальная схема реализации биотехнологических процессов

(по У. Э. Виестур и др., 1987):

1 – реактор для приготовления сред, 2 – вихревой насос, 3 – аппарат для приготовления твердых сред, 4 – паровая колонка для подогрева сред до температуры стерилизации, 5 – выдерживатель сред при температуре стерилизации, 6 – теплообменник для охлаждения сред, 7 – мерник – сборник питательной среды,

8 – дозатор, 9 – анаэробный ферментер, 10 – глубинный аэробный ферментер, 11 – биокаталитический реактор, 12 – ферментер для поверхностной твердофазной ферментации, 13 – то же для поверхностной жидкостной ферментации, 14 – экстрактор, 15 – сепаратор для отделения биомассы, 16 – система локальной автоматки, 17 – плазмоллизатор биомассы, 18 – дезинтегратор биомассы, 19 – выпарная установка, 20 – фракционирование дезинтеграторов, 21 – сушилка и другие аппараты для обезвоживания, 22 – аппаратура для расфасовки продукта, 23 – ионообменные колонны, аппараты для химических и мембранных методов выделения, центрифуги, фильтры, кристаллизаторы и др. устройства.

Условные обозначения: рН – раствор для коррекции рН, П – компоненты и среды для подпитки, Пос – посевной материал, В – сжатый воздух, ПАВ – пеногаситель, Ср – стерильная питательная среда, БА – биологический агент.

На предферментационной стадии осуществляют хранение и подготовку культуры продуцента (инокулята), получение и подготовку питательных субстратов и сред, ферментационной аппаратуры, технологической и рециркулируемой воды и воздуха. Поддержание и подготовка чистой культуры является очень важным моментом предферментационной стадии, так как продуцент, его физиолого-биохимические характеристики и свойства определяют эффективность всего биотехнологического процесса. В отделении чистой культуры осуществляют хранение производственных штаммов и обеспечивают их реактивацию и наработку инокулята в количествах, требуемых для начала процесса. При выращивании посевных доз инокулята применяют принцип масштабирования, то есть проводят последовательное наращивание биомассы продуцента в колбах, бутылках, далее в серии последовательных ферментеров. Каждый последующий этап данного процесса отличается по объему от предыдущего обычно на порядок. Полученный инокулят по стерильной посевной линии направляется далее в аппарат, в котором реализуется ферментационная стадия. Приготовление питательных сред осуществляется в специальных реакторах, оборудованных мешалками. В зависимости от растворимости и совместимости компонентов сред могут быть применены отдельные реакторы. Технология приготовления сред значительно усложняется, если в их состав входят нерастворимые компоненты. В различных биотехнологических процессах применяются различные по происхождению и количествам субстраты, поэтому процесс их приготовления варьирует. Поэтому дозирование питательных компонентов подбирается и осуществляется индивидуально на каждом производстве в соответствии с Технологическим регламентом конкретного процесса. В качестве дозирующего оборудования при этом применяются весовые и объемные устройства, используемые в пищевой и химической промышленности. Транспорт веществ осуществляется насосами, ленточными и шнековыми транспортерами. Сыпучие компоненты подают в ферментеры с помощью вакуумных насосов. Часто применяют принцип предварительных смесей, то есть соли предварительно растворяют и затем транспортируют по трубопроводам, дозируя их подачу по объему. В силу исключительного разнообразия биотехнологических процессов и применяемых для их реализации сред, методов и аппаратуры рассмотрение данных элементов далее будет связано с конкретными биотехнологическими производствами.

Стадия ферментации является основной стадией в биотехнологическом процессе, так как в ее ходе происходит взаимодействие продуцента с субстратом и образование целевых продуктов (биомасс, эндо- и экзопродуктов). Эта стадия осуществляется в биохимическом реакторе (ферментере) и может быть организована в зависимости от особенностей используемого продуцента и требований к типу и качеству конечного продукта различными способами. Ферментация может проходить в строго асепти-

ческих условиях и без соблюдения правил стерильности (так называемая «незащищенная» ферментация); на жидких и на твердых средах; анаэробно и аэробно. Аэробная ферментация, в свою очередь, может протекать поверхностно или глубинно (во всей толще питательной среды).

Культивирование биологических объектов может осуществляться в **периодическом и проточном режимах, полунепрерывно с подпиткой субстратом**. При периодическом способе культивирования ферментер заполняется исходной питательной средой и инокулятом микроорганизмов ($X_0 + S_0$ на рис. 1.2). В течение определенного периода времени в аппарате происходит взаимодействие микроорганизмов и субстрат сопровождающееся образованием в культуре продукта ($X + S \rightarrow P$).

Биохимические превращения в этом аппарате продолжаютсся от десятков часов до нескольких суток. Регуляция условий внутри ферментера – важнейшая задача периодического культивирования микроорганизмов. В ходе периодической ферментации выращиваемая культура проходит ряд последовательных стадий: лаг-фазу, экспоненциальную, замедления роста, стационарную и отмирания. При этом происходят существенные изменения физиологического состояния биообъекта, а также ряда параметров среды. Целевые продукты образуются в экспоненциальной (первичные метаболиты – ферменты, аминокислоты, витамины) и стационарной (вторичные метаболиты – антибиотики) фазах, поэтому в зависимости от целей биотехнологического процесса в современных промышленных процессах применяют принцип дифференцированных режимов культивирования. В результате этого создаются условия для максимальной продукции того или иного целевого продукта. Периодически ферментер опорожняют, производят выделение и очистку продукта, и начинается новый цикл.

Непрерывный процесс культивирования микроорганизмов обладает существенными преимуществами перед периодическим. Непрерывная

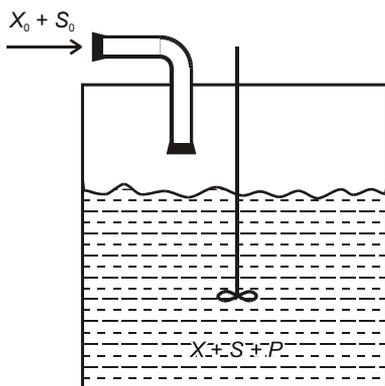


Рис. 1.2. Схема биореактора периодического действия.

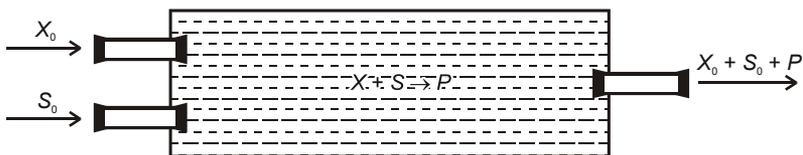


Рис. 1.3. Схема тубулярного биореактора полного вытеснения.

ферментация осуществляется в условиях установившегося режима, когда микробная популяция и ее продукты наиболее однородны. Применение непрерывных процессов ферментации создает условия для эффективного регулирования и управления процессами биосинтеза. Системы непрерывной ферментации могут быть организованы по принципу полного вытеснения или полного смешения. Первый пример – так называемая тубулярная культура (рис. 1.3).

Процесс ферментации осуществляется в длинной трубе, в которую с одного конца непрерывно поступают питательные компоненты и инокулят, а с другой с той же скоростью вытекает культуральная жидкость. Данная система проточной ферментации является гетерогенной.

При непрерывной ферментации в ферментах полного смешения (гомогенно-проточный способ) во всей массе ферментационного аппарата создаются одинаковые условия. Применение таких систем ферментации позволяет эффективно управлять отдельными стадиями, а также всем биотехнологическим процессом и стабилизировать продуцент в практически любом, требуемом экспериментатору или биотехнологу состоянии. Управление подобными установками осуществляется двумя способами (рис. 1.4).

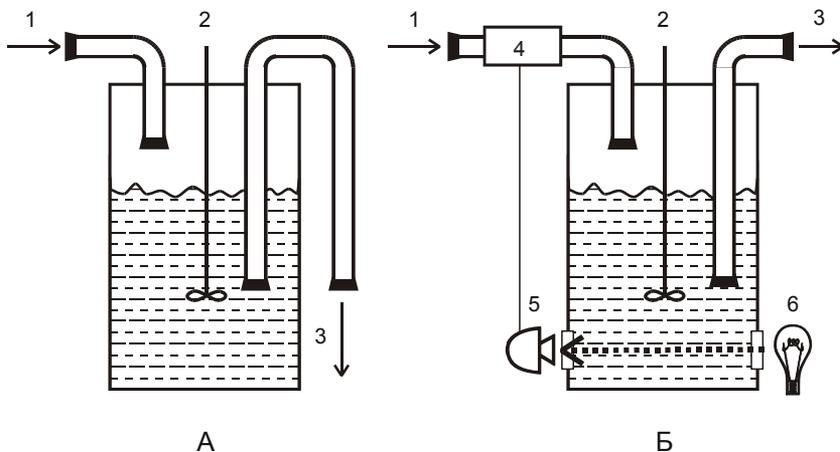


Рис. 1.4. Схемы биореакторов для проточного культивирования микроорганизмов.

А – хемостат; Б – турбидостат с автоматической регуляцией оптической плотности.

1 – поступление среды, 2 – мешалка, 3 – сток культуры, 4 – насос, 5 – фотозлемент, 6 – источник света.

Турбидостатный способ базируется на измерении мутности выходящего потока. Измерение мутности микробной суспензии, вызванное ростом клеток, является мерой скорости роста, с которой микроорганизмы выходят из биореактора. Это позволяет регулировать скорость поступления в ферментер свежей питательной среды. Второй метод контроля, – **хемостатный**, проще. Управление процессом в хемостате осуществляется измерением не выходящего, а входящего потока. При этом концентрацию одного из компонентов питательной среды (углерод, кислород, азот), поступающего в ферментер, устанавливают на таком уровне, при котором другие питательные компоненты находятся в избытке, то есть лимитирующая концентрация задающегося биогенного элемента ограничивает скорость размножения клеток в культуре.

Обеспечение процесса ферментации, с точки зрения инженерной реализации, сводится к дозированному поступлению в ферментер потоков (инокулята, воздуха (или газовых смесей), питательных биогенов, пеногасителей) и отвода из него тепла, отработанного воздуха, культуральной жидкости, а также измерению и стабилизации основных параметров процесса на уровне, требуемом для оптимального развития продуцента и образования целевого продукта. В ходе ферментации образуются сложные смеси, содержащие клетки, внеклеточные метаболиты, остаточные концентрации исходного субстрата. При этом целевые продукты, как правило, находятся в этой смеси в небольших концентрациях, а многие из них легко разрушаются. Все это накладывает существенные ограничения на методы выделения и сушки биологических препаратов.

Постферментационная стадия обеспечивает получение готовой товарной продукции и также, что не менее важно, обезвреживание отходов и побочных продуктов. В зависимости от локализации конечного продукта (клетка или культуральная жидкость) и его природы на постферментационной стадии применяют различную аппаратуру и методы выделения и очистки. Наиболее трудоемко выделение продукта, накапливающегося в клетках. Первым этапом постферментационной стадии является фракционирование культуральной жидкости и отделение взвешенной фазы – биомассы. Наиболее распространенный для этих целей метод – сепарация, осуществляемая в специальных аппаратах – сепараторах, которые работают по различным схемам в зависимости от свойств обрабатываемой культуральной жидкости. Основные проблемы, возникают при необходимости выделения мелковзвешенных частиц с размером 0.5–1.0 мкм и менее (бактериальные клетки) и необходимостью переработки больших объемов жидкости (производство кормового белка, ряда аминокислот). Для повышения эффективности процесса сепарации применяют предварительную специальную обработку культуры – изменение pH, нагревание, добавление химических агентов. Для увеличения сроков годности биотехнологических продуктов производят их обезвоживание и стабилизацию. В

зависимости от свойств продукта применяют различные методы высушивания. Сушка термостабильных препаратов осуществляется на подносах, ленточном конвейере, а также в кипящем слое. Особо чувствительные к нагреванию препараты высушивают в вакуум-сушильных шкафах при пониженном давлении и температуре и в распылительных сушилках. К стабилизации свойств биотехнологических продуктов ведет добавление в качестве наполнителей различных веществ. Для стабилизации кормового белка применяют пшеничные отруби, кукурузную муку, обладающие дополнительной питательной ценностью. Для стабилизации ферментных препаратов используют глицерин и углеводы, которые препятствуют денатурации ферментов, а также неорганические ионы кобальта, магния, натрия, антибиотики и др.

1.4. ЭЛЕМЕНТЫ, СЛАГАЮЩИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Основными элементами, слагающими биотехнологические процессы, являются: **биологический агент, субстрат, аппаратура и продукт.**

Биологический агент является активным началом в биотехнологических процессах и одним из наиболее важных ее элементов. Номенклатура биологических агентов бурно расширяется, но до настоящего времени важнейшее место занимает традиционный объект – микробная клетка (табл. 1.1, 1.2).

Микробные клетки с различными химико-технологическими свойствами могут быть выделены из природных источников и далее с помощью традиционных (селекция, отбор) и новейших методов (клеточная и генетическая инженерия) существенно модифицированы и улучшены. При выборе биологического агента и постановке его на производство прежде всего следует соблюдать принцип технологичности штаммов. Это значит, что микробная клетка, популяция или сообщество особей должны сохранять свои основные физиолого-биохимические свойства в процессе длительного ведения ферментации. Промышленные продуценты также должны обладать устойчивостью к мутационным воздействиям, фагам, заражению посторонней микрофлорой (контаминации); характеризоваться безвредностью для людей и окружающей среды, не иметь при выращивании побочных токсичных продуктов обмена и отходов, иметь высокие выходы продукта и приемлемые технико-экономические показатели.

В настоящее время многие промышленные микробные технологии базируются на использовании гетеротрофных организмов, а в будущем решающее место среди продуцентов займут автотрофные микроорганизмы, не нуждающиеся для роста в дефицитных органических средах, а также экстремофилы – организмы, развивающиеся в экстремальных условиях среды (термофильные, алкало- и ацидофильные).

**Микроорганизмы, используемые в промышленности
для получения целевых продуктов**

Организм	Тип	Продукт
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Пекарские дрожжи, вино, эль, саке
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Бактерии	Йогурт
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Бактерии	Швейцарский сыр
<i>Gluconobacterium suboxidans</i>	Бактерии	Уксус
<i>Penicillium roquefortii</i>	Плесень	Сыры типа рокфора
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Саке
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Этанол
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Бактерии	Ацетон
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерии	Полисахариды
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Бактерии	L-Лизин
<i>Candida utilis</i>	Дрожжи	Микробный белок
<i>Propionibacterium</i>	Бактерии	Витамин B ₁₂
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Амилаза
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Дрожжи	Лактаза
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Дрожжи	Липаза
<i>Bacillus</i>	Бактерии	Протеазы
<i>Endothia parasitica</i>	Плесень	Сычужный фермент
<i>Leocanostoc mesenteroides</i>	Бактерии	Декстран
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерии	Ксантан
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Плесень	Пенициллины
<i>Chehalosporium acremonium</i>	Плесень	Цефалоспорины
<i>Rhizopus nigricans</i>	Плесень	Трансформация стероидов
Гибридомы	–	Иммуноглобулины и моноклональные антитела
Клеточные линии млекопитающих	–	Интерферон
<i>E. coli</i> (рекомбинантные штаммы)	Бактерии	Инсулин, гормон роста, интерферон
<i>Blakeslea trispora</i>	Плесень	β-Каротин
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Дрожжи	Астаксантин
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Бактерии	Биоинсектициды
<i>Bacillus popilliae</i>	Бактерии	Биоинсектициды

В последние годы расширяется применение смешанных микробных культур и их природных ассоциаций. По сравнению с монокультурами, микробные ассоциации способны ассимилировать сложные, неоднородные по составу субстраты, минерализуют сложные органические соединения, имея повышенную способность к биотрансформации, имеют повышенную устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов среды и токсических веществ, а также повышенную продуктивность и возможность обмена генетической информацией между отдельными видами со-

**Важнейшие группы субстратов, биологических агентов
и образуемых в биотехнологических процессах продуктов (по Виестур и др., 1987).**

Субстраты	Биологические агенты	Продукты
Меласса, сок сахарного тростника, гидролизаты растительных полимеров.	Микроорганизмы, растительные и животные клетки, в том числе потической инженерии.	Биоудобрения и биоинсектициды, микробные биомассы, диагностикумы, вакцины.
Сахара, спирты, органические кислоты. Парафины нефти. Полупродукты, предшественники биотрансформации. Природный газ, водород. Отходы с/х и лесной промышленности. Отходы промышленности, в том числе переработки фруктов и овощей. Бытовые отходы, сточные воды. Молочная сыворотка. Картофель, зерно. Зеленая биомасса растений.	Вирусы. Компоненты клеток: мембраны, протопласты, митохондрии, ферменты. Внеклеточные продукты: ферменты, коферменты. Иммобилизованные клетки микроорганизмов, растений и животных, их компоненты и внеклеточные продукты.	Биогаз. Чистые продукты, медикаменты, диагностикумы. Гормоны и др. продукты биотрансформации Органические кислоты. Полисахариды. белок одноклеточных. Пищевые продукты. Экстракты, гидролизаты. Спирты, органические растворители. Антибиотики Аминокислоты. Ферменты, витамины. Металлы, неметаллы. Моноклональные антитела.

общества. Основные области применения смешанных культур – охрана окружающей среды, биodeградация и усвоение сложных субстратов.

Особая группа биологических агентов в биотехнологии – ферменты, так называемые катализаторы биологического происхождения. Ферменты находят все большее применение в различных биотехнологических процессах и отраслях хозяйствования, но до 60-х годов это направление сдерживалось трудностями их получения, неустойчивостью, высокой стоимостью. Как отдельную отрасль в создании и использовании новых биологических агентов следует выделить иммобилизованные ферменты, которые представляют собой гармонично функционирующую систему, действие которой определяется правильным выбором фермента, носителя и способа иммобилизации. Преимущество мобилизованных ферментов в сравнении с растворимыми заключается в следующем: стабильность и повышенная активность, удержание в объеме реактора, возможность полного и быстрого отделения целевых продуктов и организации непрерывных процессов ферментации с многократным использованием биологического агента. Иммобилизованные ферменты открывают новые возможности в создании

биологических микроустройств для использования в аналитике, преобразовании энергии и биоэлектрочкатализе.

К нетрадиционным биологическим агентам на данном этапе развития биотехнологии относят растительные и животные ткани, в том числе гибридомы, трансплантаты. Большое внимание в настоящее время уделяется получению новейших биологических агентов – трансгенных клеток микроорганизмов, растений, животных генноинженерными методами. Развита также новые методы, позволяющие получать искусственные клетки с использованием различных синтетических и биологических материалов (мембраны с заданными свойствами, изотопы, магнитные материалы, антитела). Разрабатываются подходы к конструированию ферментов с заданными свойствами, имеющими повышенную реакционную активность и стабильность. В настоящее время реализован синтез полипептидов желаемой стереоконфигурации и пр.

Таким образом, в биотехнологических процессах возможно использование различных биологических агентов с различным уровнем организации, – от клеточной до молекулярной.

Субстраты и среды, используемые в биотехнологии, весьма разнообразны, и их спектр непрерывно расширяется (табл. 1.2). С развитием промышленных процессов происходит накопление новых видов отходов, которые могут быть обезврежены и конвертированы в полезные продукты методами биотехнологии. С одной стороны, развивающиеся бурными темпами биотехнологические промышленные направления сталкиваются с проблемой исчерпания традиционных видов сырья, поэтому возникает необходимость в расширении сырьевой базы, с другой, – увеличение объемов накапливающихся отходов делает необходимым разработку нетрадиционных, в том числе биотехнологических способов их переработки.

В настоящее время наблюдается рост интереса биотехнологов к природным возобновляемым ресурсам – продуктам фотосинтеза, биоресурсам мирового океана. В состав сред для биотехнологических процессов входят источники углерода и энергии, а также минеральные элементы и ростовые факторы. В качестве источников углерода и энергии в биотехнологических процессах используют главным образом природные комплексные среды неопределенного состава (отходы различных производств, продукты переработки растительного сырья, компоненты сточных вод и пр.), в которых помимо углеродных соединений содержатся также минеральные элементы и ростовые факторы. Довольно широко включены в разряд биотехнологических субстратов целлюлоза, гидролизаты полисахаридов и древесины. Последние около 30 лет используют для получения белка одноклеточных. Кислотный гидролиз древесины при 175–190°C обеспечивает выход в среду до 45–50 % редуцирующих веществ; при более жестких режимах гидролиза эта величина возрастает до 55–68 %. С большим успехом в последние годы стали применять гидролизаты торфа, это позволяет

снизить стоимость, например, препаратов аминокислот в 4–5 раз. Минеральные элементы, необходимые для роста биологических агентов и входящие в состав питательных сред, подразделяются на макро- и микроэлементы. Среди макроэлементов на первом месте стоит азот, так как потребности в нем у биологических объектов на порядок превышают потребности в других элементах (фосфоре, сере, калии и магнии). Азот обычно используется микроорганизмами в восстановленной форме (мочевина, аммоний или их соли). Часто азот вводится в комплексе с другими макроэлементами – фосфором, серой. Для этого в качестве их источников используют соли (сульфаты или фосфаты аммония). Для ряда отдельных продуцентов, однако, лучшими являются нитраты или органические соединения азота. Существенное значение при обеспечении азотного питания продуцента имеет не только вид, но концентрация азота в среде, так как изменение соотношения C:N, воздействуя на скорость роста продуцента, метаболизм, вызывает сверхсинтез ряда целевых продуктов (аминокислот, полисахаридов и др.). Минеральные элементы необходимы для роста любого биологического агента, но их концентрация в среде в зависимости от биологии используемого биообъекта и задач биотехнологического процесса различна. Так, концентрация макроэлементов в среде (K, Mg, P, S) обычно составляет около 10^{-3} – 10^{-4} М. Потребности в микроэлементах невелики, и их концентрация в средах существенно ниже – 10^{-6} – 10^{-8} М. Поэтому микроэлементы часто специально не вносят в среду, так как их примеси в основных солях и воде обеспечивают потребности продуцентов. Отдельные продуценты в силу специфики метаболизма или питательных потребностей нуждаются для роста в наличие в среде ростовых факторов (отдельных аминокислот, витаминов и пр.). Помимо чистых индивидуальных веществ такой природы, на практике часто используют в качестве ростовых добавок кукурузный или дрожжевой экстракт, картофельный сок, экстракт проростков ячменя, зерновых отходов и отходов молочной промышленности. Стимулирующее действие данных ростовых факторов во многом зависит от индивидуальных свойств применяемого продуцента, состава основной среды, условий ферментации и др. Добавление ростовых факторов способно увеличить выход целевого продукта, например ферментов, в десятки раз.

Традиционно состав питательной среды, оптимальной для биотехнологического процесса, определяется методом длительного эмпирического подбора, в ходе которого на первых этапах определяется качественный и количественный состав среды. Было сделано много попыток обоснования состава сред с позиций физиологии и биохимии продуцента, но так как потребности в питательных веществах видо- и даже штаммоспецифичны, в каждом конкретном случае приходится подбирать оптимальный для конкретного продуцента состав среды. В последние 20–25 лет все шире используют математический метод планирования экспериментов, математи-

ческое моделирование биотехнологических процессов; это позволяет обоснованно подходить к конструированию питательных сред сделать их экономичными.

Аппаратура. Вопросами технического обеспечения биотехнологических процессов занимается биоинженерия. Для различных процессов существует огромное разнообразие аппаратуры: собственно для процесса ферментации, а также для выделения и получения готового продукта. Наиболее сложна и специфична аппаратура для ферментационной стадии. Технически наиболее сложным процессом ферментации является аэробный глубинный стерильный и непрерывный (или с подпиткой субстратом). Аппараты для поверхностной и анаэробной ферментации менее сложны и энергоемки. В современной литературе описаны сотни биореакторов, отличающихся по конструкции, принципу работы и размерам (от нескольких литров до нескольких тысяч кубометров). Многочисленность методов культивирования, чрезвычайное многообразие используемых биологических агентов привели к огромному разнообразию конструктивных решений, которые зависят от ряда факторов: типа продуцента и среды, технологии и масштабов производства, а также целевого продукта и пр. Техническое оснащение биотехнологии базируется на общих положениях технической биохимии и пищевой технологии, однако имеет свою специфику. Принципиальное отличие биотехнологических процессов от чисто химических заключается в следующем:

- чувствительность биологических агентов к физико-механическим воздействиям;
- наличие межфазового переноса веществ (по типу «жидкость – клетки», «газ – жидкость – клетки»);
- требования условий асептики;
- низкие скорости протекания многих процессов в целом;
- нестабильность целевых продуктов;
- пенообразование;
- сложность механизмов регуляции роста и биосинтеза.

Рассмотрим некоторые типы ферментационных аппаратов.

Аппараты для анаэробных процессов достаточно просты и применяются в процессах конверсии растительного сырья, в том числе растительных отходов, а также различных промышленных отходов. При метановом брожении для получения биогаза, а также в ряде других процессов (получение ацетона, шампанских вин) используют ферментационные аппараты (метанотенки). Эти аппараты имеют различную конструкцию (от простой выгребной ямы до сложных металлических конструкций или железобетонных сооружений) и объемы (от нескольких до сотен кубометров) (рис.1.5). Метановые установки оборудованы системой подачи сырья, системой теплообмена труб для стабилизации температуры, несложным перемешивающим устройством для гомогенного распределения сырья и

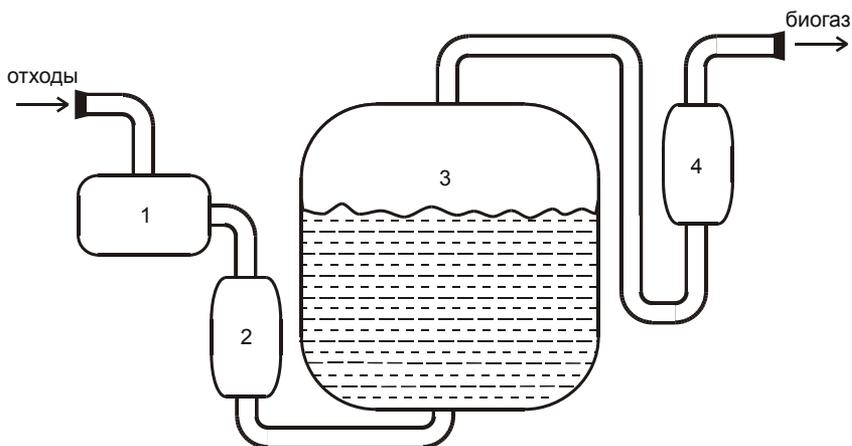


Рис. 1.5. Схема метановой установки.
1 – дозирующее устройство, 2 – теплообменник, 3 – метанотенк; 4 – газгольдер.

биомассы продуцента, газовым колпаком и устройством переменного объема (газгольдер) для сбора образуемого биогаза.

Конструкция аппаратов для аэробной ферментации определяется типом ферментации и сырья. Аппараты для аэробной поверхностной ферментации, широко применяемые для производства органических кислот и ферментов, достаточно просты по конструкции и, соответственно, подразделяются на жидкофазные и твердофазные. Поверхностная жидкофазная ферментация протекает в так называемых бродительных вентилируемых камерах, в которых на стеллажах размещены плоские металлические кюветы. В кюветы наливают жидкую питательную среду, высота слоя составляет 80–150 мм, затем с потоком подаваемого воздуха среду инокулируют спорами продуцента. В камере стабилизируется влажность, температура и скорость подачи воздуха. После завершения процесса культуральная жидкость сливается из кювет через вмонтированные в днища штуцера и поступает на обработку. При твердофазной ферментации процесс также протекает в вентилируемых камерах, но вместо кювет на стеллажах размещают лотки, в которые насыпают сыпучую твердую среду слоем 10–15 мм. Для лучшей аэрации среды подаваемый в камеру воздух проходит через перфорированное днище лотков.

Аппараты для аэробной глубинной ферментации наиболее сложны как конструкционно, так и с точки зрения их эксплуатации. Главная задача, возникающая при их конструировании, – обеспечение высокой интенсивности массо- и энергообмена клеток со средой. Массообмен определяется транспортом (переносом) кислорода и других биогенных элементов из среды в микробную клетку и отводом из нее продуктов обмена. Главным показателем массообменных характеристик ферментера служит коэффициент массопередачи кислорода, так как кислород является основным ли-

митирующим фактором аэробных ферментационных процессов. Расход кислорода на образование 1 кг биомассы в зависимости от типа углеродсодержащего сырья и степени его восстановленности может составлять от 0.75 до 5.00 кг. Клетки способны утилизировать кислород только в растворенном виде, поэтому необходимо постоянно поддерживать его концентрацию в культуре на уровне, оптимальном для конкретного продуцента. При этом скорость поступления кислорода к клеткам должна превышать скорость его включения в клетки, и в околкеклеточном пространстве не должно возникать так называемых «концентрационных ям». Кроме этого, концентрация клеток и растворенного субстрата должны быть равномерными по всему объему ферментера. Поэтому перемешивание является также одним из основных факторов, обеспечивающих требуемую гидродинамическую обстановку в аппарате. При интенсивном перемешивании пузырьки воздуха дробятся в аппарате и диспергируясь увеличивают площадь контакта фаз «среда-клетка». Однако чрезмерное перемешивание может вызвать механическое повреждение биологических объектов.

К настоящему времени разработано и применяется огромное количество разнообразнейших перемешивающих и аэрирующих устройств, и классифицировать их практически невозможно. Наиболее удачна, по нашему мнению, попытка классификации ферментационных аппаратов для аэробной глубинной ферментации по подводу энергии (Виестур и др., 1986; 1987). Согласно этой классификации, аппараты такого типа делятся на три группы по подводу энергии: 1) – к газовой фазе, 2) – к жидкой фазе, 3) – комбинированный подвод.

Ферментеры с подводом энергии к газовой фазе (группа ФГ). Их общий признак – подвод энергии в аппарат через газовую фазу, которая является ее носителем. Ферментеры характеризуются достаточно простой конструкцией (отсутствуют трущиеся, движущиеся узлы), высокой эксплуатационной надежностью, но имеют не очень высокие массообменные характеристики (коэффициент массопередачи кислорода менее 4 кг/м^3) (рис. 1.6). Данные аппараты представляют собой вертикальную емкость, снабженную газораспределительным устройством одного из известных типов. **Барботажные** газораспределительные устройства обычно устанавливаются в нижней части аппарата. Подаваемый сверху через распределительную трубу воздух, пройдя через барботер, насыщает кислородом толщу среды. Коэффициент массопереноса кислорода невысок, $1\text{--}2 \text{ кг/м}^3 \text{ ч}$; барботажно-колонный – в нижней части корпуса такого аппарата устанавливается перфорированная пластина с диаметром отверстий 0.0005 м или сопловой эжектор с диаметром сопла 0.004 м ; барботажно-эрлифтный аппарат характеризуется наличием внутри одного или нескольких диффузо

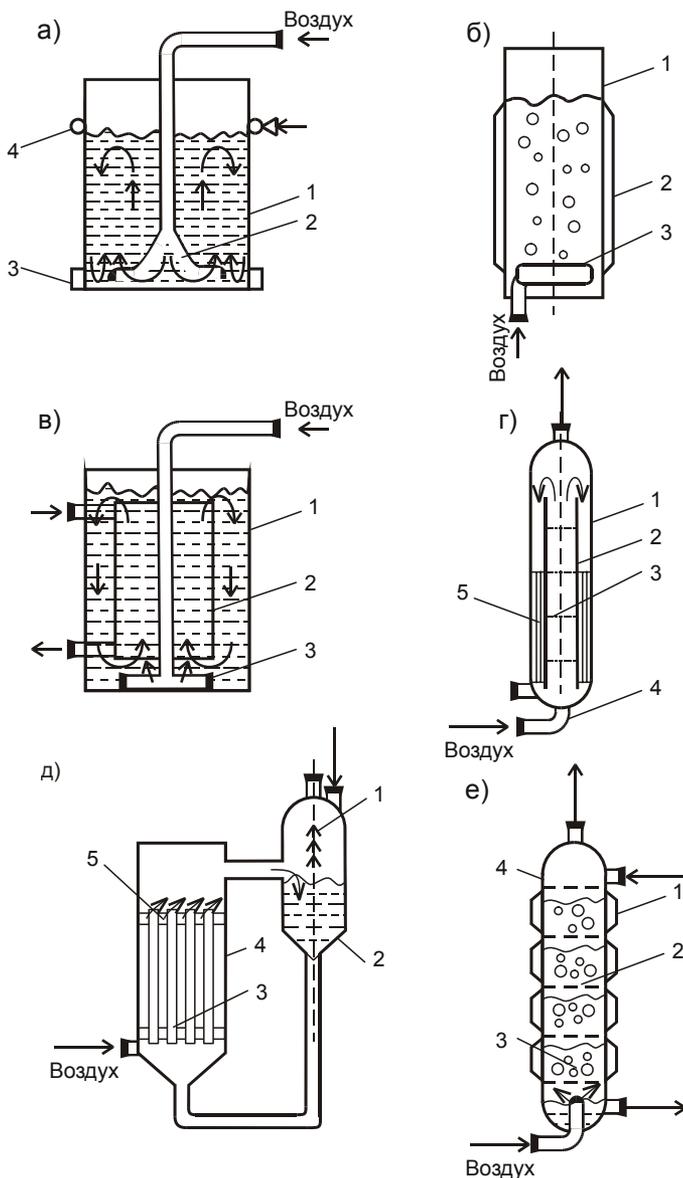


Рис. 1.6. Ферментеры с подводом энергии газовой фазой (группа ФГ) (Виестур и др., 1986).
 а) барботажный: 1 – корпус, 2 – воздухораспределитель, 3 – карман, 4 коллектор, б) барботажный колонный: 1 – корпус, 2 – рубашка, 3 – воздухораспределитель, в) барботажно-эрлифтный: 1 – корпус, 2 – диффузор-теплообменник, 3 – воздухораспределитель; г) газлифтный: 1 – корпус, 2 – диффузор, 3 – диспергатор, 4 – воздухораспределитель, 5 – теплообменник, д) трубчатый: 1 – пеногаситель, 2 – емкость, 3 – диспергатор, 4 – корпус, 5 – распределительная перегородка, е) с плавающей насадкой: 1 – рубашка, 2 – тарелка, 3 – насадка, 4 – корпус.

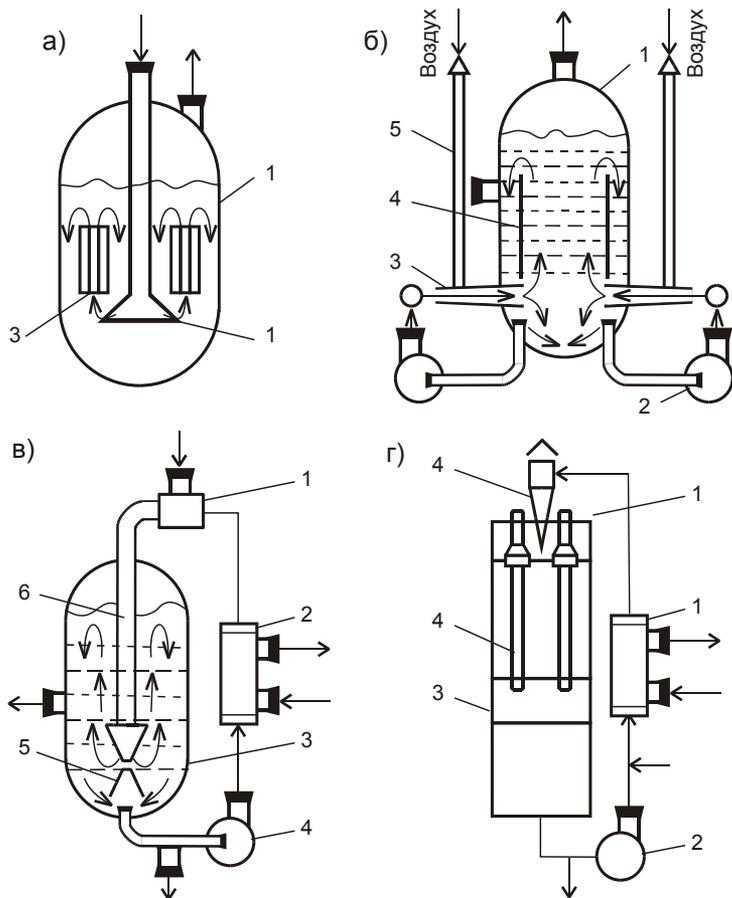


Рис. 1.7. Ферментеры с вводом энергии жидкой фазой (группа ЖФ) (Виестур и др. 1986).
 а) – с самовсасывающей мешалкой: 1 – корпус, 2 – мешалка, 3 – циркуляционный контур-теплообменник,
 б) – эжекционный: 1 – корпус, 2 – насос, 3 – эжектор, в) – струйный с затопленной струей: 1 – эжектор, 2 –
 теплообменник, 3 – корпус, 4 – насос, 5 – рассекатель, 6 – труба с насадкой, г) – струйный с плавающей
 струей: 1 – теплообменник, 2 – насос, 3 – корпус, 4 – эжектор.

ров («стаканов») или нескольких перегородок для принудительного разделения восходящих и нисходящих потоков циркулирующей жидкости; эти элементы расположены равномерно по сечению аппарата или концентрично; газлифтный колонный ферментер состоит из двух колонн разного диаметра, соединенных между собой; одна представляет собой барботажную колонну с восходящим потоком воздуха, другая – циркуляционная, с нисходящим потоком. Воздух вводится в нижнюю зону аппарата в барботажную колонну; камера, соединяющая колонны в верхней части аппарата, образует большую поверхность контакта фаз; трубчатый аппарат сконструирован по типу теплообменных труб; взаимодействие газа в трубе при

высоких скоростях продувки более интенсивное, чем в большом объеме, поэтому массообмен интенсивнее; аппарат с плавающей насадкой позволяет интенсифицировать массообмен за счет увеличения поверхности контакта фаз и турбулизации жидкости при работе с большими скоростями подачи газовой и жидкой фаз. В аппарат введены секционные элементы в виде решеток, оборудованных лопастной насадкой; в центре аппарата находится труба, через которую вводится воздух, а жидкая фаза поступает противотоком сверху. Газ, поступая на лопастную насадку, обычно из полиэтилена, вращает ее; это существенно увеличивает поверхность контакта газовой и жидкой фаз.

Ферментеры с вводом энергии жидкой фазой (группа ФЖ) наиболее сложны по конструкции и энергоемки, но обеспечивают наиболее высокие по сравнению с группой ферментеров ГФ значения коэффициента массопередачи кислорода, свыше $6 \text{ кг/м}^3 \text{ ч}$. В данных аппаратах ввод энергии осуществляется жидкой фазой, обычно самовсасывающими мешалками или насосами; в последнем варианте жидкость вводится в аппарат через специальное устройство (сопло, эжектор, диспергатор). Данные аппараты также можно подразделить на ряд типов (рис. 1.7): ферментеры с самовсасывающими мешалками не требуют специальных воздуходувных машин, так как поступление в них воздуха происходит в результате разрежения в воздушной камере мешалки, соединенной с воздухопроводом и с жидкостью, отбрасываемой лопатками мешалки; в эжекционных ферментерах возможна рециркуляция газовой фазы, что экономит субстрат, однако требуется наличие специальных насосов для перекачки газосодержащей культуральной среды. Применение эжекционного ввода газовых субстратов в ферментер может интенсифицировать массообмен на порядок; струйные ферментеры (с затопленной или падающей струей) оборудуются мощными насосами, которые забирают культуральную жидкость из нижней части аппарата и через напорный трубопровод подводят поток к аэрирующему устройству (по типу шахтного перепада или напорно-струйные). Струя жидкости под давлением свободно падает сверху и пронизывает аэрируемую жидкость до дна аппарата. Происходят интенсивные турбулизация и перемешивание жидкости. Внизу жидкость вновь засасывается насосом и снова подается вверх аппарата, то есть возникает замкнутый контур циркуляции. Недостатком данных аппаратов являются потери энергии при перекачке жидкости, трудности проектирования в связи с отсутствием надежных методик расчета конструкций и режимов работы струйных и эжекционных устройств.

Третья группа аппаратов – с **подводом энергии газовой и жидкой фазами (группа ФЖГ)**. Основными их конструкционными элементами являются перемешивающие устройства всех известных типов, а также наличие в совокупности насосов и перемешивающих устройств. Это могут быть аппараты с группой самовсасывающих мешалок и насосом для пере-

качивания культуральной жидкости и другие сочетания перемешивающих и аэрирующих устройств. Коэффициент массопереноса кислорода в таких ферментерах может в принципе иметь любые из известных значения.

Перечисленные типы аппаратов возникли в основном в течение «эры» антибиотиков и белка одноклеточных и применяются, главным образом, в технической микробиологии.

Прогресс в области получения клеточных и рекомбинантных культур выдвигает специальные требования к биореакторам. При этом на первый план выдвигаются такие показатели, как стабильность биологических агентов, повышенные требования к асептике, лимитация срезовых условий при перемешивании и др. Однако, многие из таких конструкций пока еще носят экспериментальный характер.

Продукты. Ассортимент продуктов, получаемых в биотехнологических процессах, чрезвычайно широк. По разнообразию и объемам производства на первом месте стоят продукты, получаемые в процессах, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов. Эти продукты подразделяются на три основные группы:

1 группа – биомасса, которая является целевым продуктом (белок одноклеточных) или используется в качестве биологического агента (биотаногенез, бактериальное выщелачивание металлов);

2 группа – первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микроорганизмов в качестве строительных блоков макромолекул, коферментов (аминокислоты, витамины, органические кислоты);

3 группа – вторичные метаболиты (идиолиты) – это соединения, не требующиеся для роста микроорганизмов и не связанные с их ростом (антибиотики, алкалоиды, гормоны роста и токсины).

Среди продуктов микробиологического синтеза – огромное количество различных биологически активных соединений, в том числе белковых и лекарственных веществ, ферментов, а также энергоносители (биогаз, спирты) и минеральные ресурсы (металлы), средства для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур (биоинсектициды) и биодобрения (табл. 1.1, 1.2). В связи с развитием новейших методов биотехнологии (инженерной энзимологии, клеточной и геной инженерии) спектр целевых продуктов непрерывно дополняется. Среди них все большее место занимают средства диагностики и лечения (гибридомы, моноклональные антитела, вакцины и сыворотки, гормоны, модифицированные антибиотики).

1.5. КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССОВ

В биотехнологии при выборе метода получения конкретного целевого продукта обязательно должна производиться технико-экономическая оценка альтернативов получения подобных продуктов традиционными

методами. По сравнению с известными биотехнологические процессы должны быть более технологичными, экономичными и экологичными либо вообще должны исключать альтернативы. Оценка альтернативности вариантов только через себестоимость продукта – односторонняя. Оценка эффективности биотехнологии, помимо качества получаемого продукта, может служить сопоставление экспериментального и теоретического выхода продукта, рассчитанные по материально-энергетическому балансу процесса. При этом затраты и стоимость сырья в крупномасштабных биотехнологических процессах, как правило, являются определяющими, поэтому материально-энергетическая оценка в данном случае очень существенна. И, напротив, при использовании процессов на основе высокопродуктивных рекомбинантных штаммов-продуцентов основная доля затрат относится не к сырью, а к созданию продуцента и его поддержанию, а также разработке специальных условий его культивирования, то есть в данном случае экономика сырьевых и энергоресурсов играют второстепенную роль.

В любом биотехнологическом процессе ключевую роль играет биологический агент, его природа и физиолого-технологические свойства. Для роста любого биообъекта нужен исходный жизнеспособный посевной материал, источники энергии и углерода, питательные вещества для синтеза биомассы, отсутствие действия ингибиторов роста, соответствующие физико-химические условия ферментации (рН, температура, аэрация и др.).

Одним из основных показателей, характеризующих адекватность условий ферментации, служит **скорость роста** продуцента. Скорость роста (увеличение биомассы) организмов с бинарным делением в хорошо перемешиваемой среде в периодической культуре будет пропорционально концентрации микробной биомассы:

$$dX/dt = \mu X,$$

где dX/dt – скорость роста, X – биомасса, μ – коэффициент пропорциональности, («удельная скорость роста»); параметр аналогичен сложным процентам (например, если удельная скорость роста равна 0.1 ч^{-1} , – значит увеличение биомассы равно 10 % в час). Если величина μ постоянна, как это бывает в установившемся режиме культивирования, то интегрирование представленного уравнения дает:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t,$$

где X_0 – биомасса в начальный период времени t .

График зависимости $\ln X$ от времени будет иметь вид прямой линии с наклоном μ . Удельная скорость роста является одним из основных параметров, характеризующих физиологическое состояние продуцента; ряд других параметров может быть выражен через этот показатель.

Продуктивность процесса характеризуется количеством продукта, получаемого на единицу объема биореактора в единицу времени. Продук-

тивность процесса зависит от многих факторов: активности продуцента, значений коэффициента выхода продукта из потребленного субстрата, количества активной биомассы в ферментере:

$$P = q_s Y_{p/s} X \text{ [г/л ч.]},$$

где q_s – скорость потребления субстрата (метаболический коэффициент), $Y_{p/s}$ – выход продукта (экономический коэффициент), X – концентрация биомассы, P – продукт, S – субстрат.

Влиять на величину продуктивности можно путем изменения различных ее составляющих, но в каждом конкретном случае это приходится рассматривать отдельно. Так, при повышении величины X могут возникнуть ограничения по массообменным характеристикам аппарата и лимитирующие состояния; влиять на величину метаболического коэффициента культуры возможно только при условии глубокого знания взаимосвязей между физиолого-биохимическими характеристиками продуцента и условиями среды.

Выход продукта (Y) (экономический коэффициент) определяется как количество продукта, получаемого из данного количества субстрата:

$$Y = X/S_0 - S,$$

где S и S_0 – конечная и исходная концентрация субстрата.

Данный коэффициент выражает эффективность использования субстрата для получения целевого продукта и является очень важной характеристикой, так как непосредственно связан с продуктивностью и позволяет непосредственно влиять на себестоимость конечного продукта. Экономический коэффициент имеет четкий физический смысл, характеризующий степень перехода энергии, заключенной в субстрате, в продукт. Данная величина необходима для расчетов и прогнозирования процесса в целом и используется в качестве параметра для контроля и управления ходом различных процессов и сопоставления их эффективности.

Конечная концентрация продукта должна планироваться с учетом продолжительности процесса и величины выхода продукта. Достижение конечной высокой концентрации продукта оправдано, когда выделение, концентрирование его трудоемки и дорогостоящи.

Удельные энергозатраты существенно варьируют в зависимости от направленности и схемы процесса ферментации, а также условий подготовки сырья на предферментационной стадии и постферментационных процедур. Удельные энергозатраты также очень существенно зависят от типа ферментационного оборудования.

Непродуктивные затраты субстрата (h) – это затраты энергии субстрата, которые не проявляются в приросте продукта. В общем виде они выражаются через экономический коэффициент:

$$h = Y_{\text{экспериментальный}}/Y_{\text{теоретический}} < 1.$$

Непродуктивные затраты существенно влияют на эффективность и экономику биотехнологического процесса, поэтому выявление причин и мест этих дополнительных трат энергического субстрата очень важно. Непродуктивные затраты субстрата могут быть связаны с ошибками при считывании генетической информации в ходе быстрого роста продуцента и затратами на поддержание при разобщенном росте в результате снижения эффективности образования энергии в цепи переноса электронов из-за разобщения окисления и фосфорилирования, инактивации мест сопряжения, возникновения альтернативных, менее эффективных ветвей, с диссипацией энергии, а также из-за возрастания трат энергии на поддержание жизни без размножения (транспорт субстратов и мономеров в клетке, синтез молекул, защитные реакции, процессы репарации).

Первичная оценка эффективности биотехнологических процессов по перечисленным параметрам проводится на стадии лабораторных разработок и испытаний процесса и далее уточняется при масштабировании на опытных и опытно-промышленных стадиях.

1.6. КОНТРОЛЬ И УПРАВЛЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ; МОДЕЛИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ

Эффективное проведение биотехнологических процессов тесно связано с совершенствованием способов контроля и управления. В период предистории биотехнологии делались отдельные попытки регулировать развитие продуцента с помощью изменений параметров внешней среды. До середины XX века регулирование в основном сводилось к эмпирике, так как без знания сущности происходящего невозможно эффективно контролировать и управлять процессом. В основном, объектом управления того периода была экстенсивная периодическая культура микроорганизмов со всеми ее недостатками: динамикой состояния продуцента и среды, отсутствием средств контроля. В последние 25 лет с внедрением управляемых культур биотехнологи переходят от простой задачи поддержания определенных параметров среды к управлению процессом в целом. Для реализации управляемого культивирования необходимо построение алгоритмов управления, основанных на моделях биотехнологического процесса. В современных биотехнологических процессах необходимо регистрировать и анализировать множество быстроизменяющихся факторов (концентрацию субстрата, биомассы и продукта в культуре, pH, температуру, парциальное давление кислорода и др.) (табл. 1.3). Это вызывает необходимость в применении электронной техники. Первые разработки по применению ЭВМ в биотехнологии относятся к концу 60-х гг. XX века. На первых этапах ЭВМ привлекали в качестве советчика оператора, управляющего исполнительными механизмами для поддержания оптимального течения биотехнологического процесса. Прежде всего, для сбора и обработки ин-

Величины и расчетные параметры, применяемые для управления биотехнологическими процессами

Измеряемые параметры	Расчеты на базе измерений
Концентрация основных субстратов и продуктов в культуральной среде (сахара, спирты, органические кислоты и пр.).	Продуктивность ($\text{кг}/\text{м}^3 \text{ ч}$).
	Удельная скорость роста, μ (ч^{-1}).
	Удельная скорость потребления субстрата, q_s ($\text{кг}/\text{кг X ч}$).
Концентрации важнейших внутриклеточных компонентов (ферменты метаболизма углерода, ключевые метаболиты, АТФ, НАДФ и др.).	Удельная скорость образования продукта, q_p ($\text{кг}/\text{кг X ч}$).
Концентрация биомасс.	Экономический коэффициент, Y_p, Y_x ($\text{кг}/\text{кг}$).
Состав микрофлоры в культуре.	Объемный коэффициент массопередачи по кислороду, $K_{\text{вр}}$ (ч^{-1}).
Концентрация растворенных O_2 и CO_2 в культуральной среде.	Энергетический выход биосинтеза, η .
Уровень и состояние пены.	Теплопродукция.
Концентрация целевого продукта.	Суммарный удельный расход сырья.

формации по показаниям датчиков и для представления этой информации в легковоспринимаемой форме. Разрабатывали также системы автоматического регулирования отдельных параметров (дозировка среды или отдельных компонентов, стабилизация температуры и рН среды, скорости потока) по принципу контроля с обратной связью. Позднее ЭВМ стали использовать для управления технологическим процессом в целом в составе автоматизированных систем АСУ. Задача создания АСУ стала особенно актуальной при реализации крупнотоннажных биотехнологических процессов. В настоящее время АСУ осуществляется на основе системного подхода, и управление имеет многоуровневую иерархическую систему.

Внедрение АСУ позволяет осуществить рациональное управление процессом биосинтеза. В результате этого экономятся исходное сырье, электроэнергия, вода, повышается продуктивность процесса и производительность труда обслуживающего персонала. Затраты на создание и внедрение АСУ в биотехнологии окупаются сравнительно быстро, в течение 3–4 лет.

Обычная схема контроля и управления ферментацией включает ферментер, датчики, регулируемую систему, которая реализует расчетные зависимости на основе измерения параметров процесса. Исходные данные от датчиков поступают на ЭВМ, в которой они оперативно анализируются, и в результате выдаются данные для исполнительных устройств и механизмов. В настоящее время разработка и внедрение АСУ для биотехнологических процессов, прежде всего, определяется уровнем технической

оснащенности данных процессов и зависит от уровня электронного оборудования, средств контроля и автоматизации. Возникают также проблемы вследствие большой информационной емкости биотехнологических процессов. Эффективность АСУ зависит от быстродействия и объема памяти ЭВМ. Поэтому прогресс в области биотехнологии зависит от прогресса в области электроники. Большое будущее имеет, в частности, микропроцессорная техника. Внедрение АСУ сдерживается отставанием в создании надежной и быстродействующей контрольно-измерительной аппаратуры, выдерживающей стерилизацию и удовлетворяющей современные требования к чувствительности и точности измерения, быстродействию, надежности, миниатюризации.

Моделирование является одним из наиболее значимых направлений при разработке биотехнологических процессов, так как с помощью моделирования, экспериментального и математического, исследуются и разрабатываются новые процессы, совершенствуются аппараты и технологические схемы производств. При экспериментальном моделировании в лабораторных и промышленных условиях применяются, как правило, модели объектов и процессов, отличающиеся масштабами. Экспериментальное моделирование позволяет исследовать и оптимизировать процессы, сущность которых мало изучена. Данный подход часто служит единственным средством для исследования биотехнологического процесса. Первым этапом экспериментального моделирования служит лабораторный уровень, в ходе которого при сравнительно небольших затратах проводится изучение новых продуцентов и разработка новых процессов. Далее полученные результаты переносят в опытные, полупромышленные и промышленные масштабы. На опытных установках отрабатываются все технологические детали будущего процесса, обучается персонал, создается оборудование, уточняются технико-экономические показатели. Затем проводятся крупномасштабные дорогостоящие промышленные эксперименты и испытания. Экспериментальное моделирование имеет ряд особенностей: трудоемкость, сложность реализации новой модели процесса. Наиболее трудны при этом вопросы масштабирования технологии и оборудования. Развитие биологических агентов связано не только с поведением жидкости и реагентов в ферментере, но и с их собственным метаболизмом. Поэтому масштабирование в биологии требует специальных решений, при этом до настоящего времени нет единого подхода к решению данной задачи. Для оптимизации и управления биотехнологическими процессами, помимо экспериментального, необходимо также привлечение математического моделирования. Эти два подхода, дополняя друг друга, позволяют более эффективно решать поставленные задачи. Экспериментальное моделирование часто предшествует математическому, являясь для него источником информации. Математические модели – удобное средство обобщения экспериментальных данных. Наличие математических моделей позволяет

более обоснованно подходить к планированию экспериментов и обрабатывать данные, существенно сокращать объем экспериментальных работ. Для моделирования и расчета биотехнологических процессов в силу их сложности применяют системный подход. Математическая модель сложной биосистемы должна включать описание различных по своей природе объектов и явлений. Поэтому, анализируя биологическую системы в целом, применяют метод декомпозиции, расчлняя исходную систему на ряд подсистем: строятся модели массообмена, кинетики роста биообъекта и биохимических процессов. К настоящему времени разработано много моделей массообмена, кинетики потребления субстрата и образования различных продуктов. Наиболее сложная задача – моделирование собственно биологических объектов, так как они значительно сложнее химических, физических и технических. Объекты биотехнологии способны к саморегулированию, их сложность усугубляется неоднородностью. Процессы, протекающие в биореакторе, зависят не только от сложных внутриклеточных факторов, но и от условий внешней среды; в свою очередь, внешние процессы в биологии связаны с внутренними, поэтому их разделить нельзя. Кроме этого, на данном этапе уровня развития математической биологии отсутствует теория, адекватная сущности биологических процессов. Пока не создан математический аппарат, способный описать природу биологических превращений во всем многообразии, то есть необходимо развитие и совершенствование самого математического аппарата. Математическое описание биологических объектов дополнительно осложняется их недостаточной изученностью. Поэтому на данном этапе возможно достаточно упрощенное и приближенное математическое описание биологических объектов, это направление нуждается в существенном совершенствовании.

Оптимизация биотехнологических процессов осуществляется на основе сочетания экспериментального и математического моделирования и применения современных методов оптимизации (динамического и нелинейного программирования, вариационного исчисления). Однако в настоящее время для оценки оптимальности биотехнологических процессов трудно даже подобрать критерии. При оптимизации в биотехнологии необходимо учитывать ограничения, связанные с экономическими и конструктивными условиями, возможностями контрольно-измерительной аппаратуры и средств управления, экологическими требованиями и др. Моделирование и оптимизация биотехнологических процессов – задача сложная и во многом еще не решенная. Однако именно разработка адекватных моделей различных биотехнологических процессов и на их основе создание совершенных методов оптимизации и управления – важнейшее направление биотехнологии, без которого невозможен прогресс.

Глава 2. ПРОМЫШЛЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: ПРОЦЕССЫ ПРОИЗВОДСТВА ПОЛЕЗНЫХ ВЕЩЕСТВ

Промышленная микробиология – это наука о получении различных целевых продуктов на основе жизнедеятельности микроорганизмов. Промышленная микробиология (или техническая микробиология) в настоящее время представляет собой также самостоятельную и наиболее крупнотоннажную отрасль современной промышленной биотехнологии. Огромное разнообразие микроорганизмов, утилизирующих в качестве ростовых субстратов различные соединения, в том числе отходы, позволяет получать широкий спектр биологически активных соединений, а также осуществлять полезные для человека реакции, включая обезвреживание отходов, трансформацию и получение энергии, и многое другое.

В настоящее время в различных процессах промышленной микробиологии получают около 200 соединений, обладающих коммерческой ценностью. Важнейшими среди них являются: алкалоиды, аминокислоты, антибиотики, антимаболиты, антиоксиданты, белки, витамины, гербициды, инсектициды, коферменты, липиды, нуклеиновые кислоты, органические кислоты, пигменты, ПАВ, полисахариды, полиоксисилканоаты, противоопухолевые агенты, растворители, сахара, стерины, ферменты, нуклеотиды, нуклеозиды, эмульгаторы.

2.1. БЕЛОК ОДНОКЛЕТОЧНЫХ

Наиболее дефицитным компонентом пищи является белок, в особенности, – высокой биологической ценности, то есть животного происхождения. Мировая потребность в белка в настоящее время удовлетворяется примерно на 40 %. Предполагается, что к 2000 году с ростом населения потребность в белке увеличится, при этом дефицит кормового белка возрастет до 147 %. Поэтому изыскание эффективных способов увеличения ресурсов белка для прямого или непрямого (через организм сельскохозяйственных животных) увеличения пищевых ресурсов является одной из основных задач научно-технического прогресса.

Нетрадиционным и принципиально новым способом получения белковых веществ является микробиологический синтез. По скорости роста микроорганизмы превосходят сельскохозяйственные культуры в сотни, а животных – в тысячи раз. Поэтому микробиологический синтез с большей эффективностью использует материальные и энергетические ресурсы, не требует больших земельных площадей и не зависит от погодных и климатических условий и не загрязняет окружающую среду ядохимикатами, так как не использует пестициды. Качество микробных белков близко белкам

животного происхождения. Применение микробных белков в кормопроизводстве улучшает качество и усвояемость традиционных растительных кормов. Например, 1 т кормовых дрожжей обеспечивает экономию 5 т зерна и увеличивает продуктивность в животноводстве на 15–30 %. Современный средний завод по производству микробного белка мощностью 50 т/год и занимающий 0.2 га может обеспечить потребность в белке до 10 млн. человек. Сельскохозяйственные технологии для таких масштабов производства требуют до 16 тыс. га, засеянных пшеницей, либо содержание фермы с производительностью 400 поросят/день. В 60-е годы появился новый термин – «белок одноклеточных» (single cell protein, «SCP»), означающий целые неживые высушенные микробные клетки (водорослей, дрожжей, бактерий, грибов), предназначенные в качестве белкового продукта для кормовых и пищевых целей. Термин несколько условен, так как в микробных биомассах помимо белков существенную долю занимают другие компоненты – сахара, липиды, нуклеиновые кислоты. Белок одноклеточных должен удовлетворять ряду специальных требований. Главными являются: питательность, переваримость, экономическая эффективность. Питательность микробного белка, определяемая по химическому составу, близка традиционным белковым продуктам (табл. 2.1).

Микробная биомасса питательна, если ее компоненты перевариваются ферментами пищеварительного тракта высших животных или человека. Препятствием этому могут быть клеточные стенки отдельных продуцентов, которые предварительно приходится разрушать, а также высокий уровень нуклеиновых кислот. Последние метаболизируются в организме животных и выводятся из организма с урины, следовательно, не представляют для высших животных опасности. Для человека такой уровень нуклеиновых кислот неприемлем, так как в ходе их усвоения возможно нарушение обмена веществ и возникновение патологических состояний. Поэтому для пищевых целей микробную биомассу предварительно обрабатывают, используя различные методы разрушения и денуклеотизации.

Таблица 2.1

**Химический состав микробных биомасс и традиционных белковых продуктов
(по Waterworth, 1982)**

Состав, %	Водоросли	Нитчатые грибы	Дрожжи	Бактерии	Соя	Рыбная мука
Белок	47–63	31–50	47–56	72–83	45	64
Жиры	7–20	2–8	2–6	1–3	1	9
Зола	7	2	6	8	6	18
Лизин	2.4	1.5	4.2	4.1	2.8	4.0
Метионин-Цистеин	1.7	0.8	1.7	2.3	1.3	2.8
Нуклеиновые кислоты	3–8	9	6–12	8–16	нет	нет

В технико-экономических показателях микробиологического синтеза белка определяющее значение имеют удельные затраты и стоимость сырья (до 50 % в структуре всех затрат) и энергозатраты (до 15–30 %). Поэтому важнейшим вопросом при разработке новых технологий получения белка одноклеточных вопрос доступности сырьевой базы. Доступность сырья подразумевает наличие различных резервных вариантов, позволяющих оперативно заменять и использовать различные источники сырья без существенного изменения качества получаемого продукта. В современных промышленных процессах используют как «чистое» сырье постоянного химического состава, так и комплексные соединения, включая отходы различных производств. Последнее наиболее выгодно экономически и имеет огромное значение для охраны окружающей среды.

Микроорганизмы способны усваивать различные углеродсодержащие субстраты, которые принято подразделять на несколько поколений:

1-е поколение – углеводы;

2-е поколение – жидкие углеводороды;

3-е поколение – оксиды углеводородов, газообразные углеводороды, углекислый газ, включая смеси с водородом.

Независимо от вида используемого сырья, типовая схема микробиологического производства белка включает получение и подготовку сырья, получение посевного материала, ферментацию, выделение, инактивацию, сгущение микробной биомассы, последующее высушивание и стандартизацию готового продукта. Большое значение имеет качество исходного посевного материала (инокулята). Инокулят получают из музейной культуры в несколько стадий с применением принципа масштабирования. Подготовленные инокулят, основной ростовой субстрат и все необходимые питательные компоненты вместе с воздухом подают в ферментер, в котором происходит основная стадия биотехнологического процесса – ферментационная. Стадия ферментации проводится в соответствии с Технологическим регламентом, разработанным для конкретного процесса, включая субстрат и тип продуцента, и сводится к дозированному поступлению в ферментер потоков питательных веществ и воздуха (или газовой смеси), стабилизации основных параметров процесса на заданных уровнях и своевременному отводу из аппарата обработанного воздуха, образующихся продуктов, а также тепла. Максимальные скорости синтеза белковых веществ микробными клетками реализуются при оптимальных условиях среды, когда удельная скорость роста близка к максимальной. Поэтому для получения белка одноклеточных биотехнологические процессы реализуют в проточном режиме, который позволяет стабилизировать практически все параметры стадии ферментации на уровнях, оптимальных для размножения клеток со скоростями роста, близкими к μ_{max} , то есть в режиме белковой направленности биосинтеза. При производстве биомассы в качестве кормового

белкового продукта, как правило, осуществляется режим незащищенной ферментации, то есть без соблюдения правил стерильности. Последнее оправдано как условиями ферментации (проточное культивирование), так и спецификой применяемых субстратов и штаммов-продуцентов, а также сферой применения конечного продукта. Получаемая на стадии ферментации суспензия с 1–2.5 % содержанием микробной биомассы по сухому веществу (АСВ), то есть 10–25 кг/м³, на постферментационной стадии подвергается сгущению в несколько этапов до 12–16 % АСВ и термообработке, в ходе которой в течение 10–40 минут при 75–90°C практически все клетки штамма-продуцента и сопутствующая микрофлора погибают. После стадии термообработки суспензию в вакуум-выпарных установках сгущают до концентрации 20–25 % АСВ и далее высушивают до остаточной влажности конечного продукта около 10 %. Далее мелкодисперсный порошок высушенных клеток гранулируют. Порошок или гранулят фасуют по 25–30 кг и затаривают в многослойные бумажные мешки.

Обязательным условием технологического процесса получения микробной биомассы является очистка газо-воздушных выбросов, которые образуются на стадии ферментации и постферментационной стадии и представляют собой большие объемы воздуха, загрязненного живыми микробными клетками, белковой пылью и другими продуктами микробного синтеза. Очистке подвергаются также большие объемы культуральной жидкости, образуемой после отделения клеточной биомассы. Очищенная жидкость используется в цикле оборотного водоснабжения технологической схемы производства.

Технология получения микробного белка является в настоящее время самой крупнотоннажной отраслью биотехнологии, производящей важнейшие кормовые препараты и белковые добавки для животноводства, звероводства, птицеводства, рыбоводства, а также белок пищевого назначения с использованием разнообразного сырья и субстратов.

Субстраты I-го поколения – углеводы

Идею использования биомассы микроорганизмов в качестве белковых компонентов питания с 1890 г. начал пропагандировать Дельбрюк, который вместе с коллегами разработал первый технологический процесс выращивания пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на мелассе. Полученную дрожжевую биомассу рекомендовали использовать в качестве белковой добавки в пищевые продукты. Во время первой мировой войны мощность действующих в Германии установок по производству дрожжевого белка достигала 10 тыс. тонн/г. Получаемый продукт использовали главным образом, добавляя в мясные фарши. К середине 30-х годов производства дрожжей на гидролизатах отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности, сульфитном щелоке, барде гидролизных заводов стали появляться в разных странах. В России первый за-

вод по производству кормовых дрожжей из отходов сельского хозяйства был пущен в 1935 г. Во время второй мировой войны биомасса пищевых дрожжей (*Candida arborea* и *C. utilis*) также была важным белковым компонентом питания в Германии. После второй мировой войны серия заводов по производству пищевых дрожжей на углеводном сырье производительностью 10–12 тонн в сутки была построена в разных странах.

В настоящее время в микробиологических производствах белка применяется различное сахаросодержащее сырье. Это отходы пищевой, молочной, спиртовой, сахарной и целлюлозной промышленности и продукты переработки растительного сырья (древесины, соломы, торфа, несъедобных частей растений – стебли, лузга, кочерыжки). Питательные среды, приготовленные на основе перечисленных субстратов, содержат наборы моно- и дисахаров, органические кислоты, спирты и другие органические соединения, а также минеральные элементы, то есть являются сложными многокомпонентными субстратами. Поэтому при их применении используют штаммы-продуценты, способные, во-первых, усваивать как пентозы, так и гексозы, и, во-вторых, – устойчивые к присутствию спиртов, фурфурола и других продуктов гидролиза растительных биомасс. Наибольшее распространение получили виды дрожжей рода *Candida*: *C. utilis*, *C. scottii*, *C. tropicalis*, способные утилизировать наряду с гексозами пентозы и толерантные к наличию фурфурола в среде. Дрожжи утилизируют углеродсодержащие компоненты гидролизатов, сульфитного щелока, последовательно: глюкоза, уксусная кислота, манноза, ксилоза, галактоза, арабиноза. В зависимости от выбранной схемы культивирования дрожжей полнота использования перечисленных углеродсодержащих компонентов различна; максимальная – при использовании смешанных культур. Применяются две, наиболее эффективные, схемы соединения ферментационных аппаратов при совместном выращивании *C. scottii* и *C. tropicalis*: двухступенчатая последовательная и параллельно-последовательная. В первом варианте в качестве исходной питательной среды используют неразбавленный гидролизат (сусло) с концентрацией редуцирующих веществ (РВ) 30–35 г/л (по массе). В первом ферментере утилизируется около 70 % РВ, главным образом за счет легкоусвояемых гексоз, до остаточной концентрации РВ около 10–15 г/л, в основном, пентоз. Полученные в первом аппарате дрожжи выделяются из дрожжевой суспензии и подвергаются обработке до получения готового продукта; а отделенная культуральная жидкость поступает во второй аппарат, в котором оставшиеся пентозы утилизируются более приспособленными к ним другими штаммами дрожжей. По второму варианту используют два последовательно соединенных фермента: в первый поступает разбавленное сусло с концентрацией РВ около 15–18 г/л; в нем в ходе ферментации дрожжей утилизируются в основном гексозы. Далее дрожжевая суспензия поступает во второй аппарат, в котором без добавления субстрата происходит доутилизация ос-

тавшихся сахаров. Общий выход дрожжей достигает при этом 70–80 % по отношению к РВ.

Выращивание дрожжей на данных субстратах осуществляют в аппаратах эрлифтного типа объемом от 300 до 600 м³ с вводом воздуха в нижнюю зону аппарата при избыточном давлении 40–60 КПа. В процессе насыщения питательной среды воздухом образуется газо-жидкостная эмульсия, циркулирующая по всему объему аппарата, обеспечивающая эффективное перемешивание среды. Для борьбы с образующейся при аэрации пеной используют механическое пеногашение. Рабочий объем аппарата составляет около 70 % от общего объема. На отдельных предприятиях применяют также барботажно-эрлифтные ферментеры большого объема, до 1300 м³ с воздухораспределением по нескольким, обычно 4–5 зонам.

Процесс выращивания дрожжей осуществляется в непрерывном режиме при скорости протока среды, равной 0.20–0.25 ч⁻¹, рН 4.2–4.6; температура среды составляет в зависимости от используемых штаммов от 30–35 до 38–40°С. Сдвиг рН в кислую сторону в ходе ферментации дрожжей автоматически корректируется подтитровкой среды аммиачной водой. Для отвода образующегося в ходе ферментации тепла в составе аппаратов применяют теплообменные устройства в виде змеевиков, через которые циркулирует охлажденная вода. Суспензия, сливаемая из аппарата, с содержанием дрожжей от 20 до 40 г/л и влажностью 75 %, поступает на стадию обработки и концентрирования, в ходе которой подвергается флотации, трехступенчатой сепарации, термообработке и высушиванию. Для обогащения дрожжевой биомассы витамином D₂ дрожжи облучают ультрафиолетом, под воздействием которого содержащийся в липидной фракции клеток эргостерин превращается в витамин. Для этого сгущенную суспензию дрожжей прокачивают по кварцевым трубкам. Содержание витамина D₂ достигает 5000 МЕ/1 г АСВ. В составе биомассы дрожжей (%): белок – 43–58, липиды – 2–3, углеводы – 11–23, зола – 11, остаточная влажность – не более 10. Выход товарных дрожжей на продуктах переработки отходов древесины составляет 46–48 %. Это соответствует выходу 240 кг АСВ дрожжей с 1 т отходов, при том экономический коэффициент использования субстрата составляет 0.4–0.6, затраты углеводов на получение биомассы – около 2 т, кислорода – 0.7–1.0 т/т. Удельная производительность аппаратов – 15–20 кг/м³ в сутки при расходе электроэнергии 600–800 кВт ч.

Наращивание объемов производства кормовых дрожжей на гидролизатах древесины сдерживается существующим уровнем технологий химического гидролиза растительного сырья. Некоторые преимущества имеют процессы получения кормовых дрожжей на предприятиях целлюлозно-бумажной промышленности, так как отходы данного производства (сульфитный щелок, предгидролизат) имеют сравнительно низкую себестоимость. Выход дрожжей из 1 т целлюлозы достигает 37 кг при комплекс-

ном получении дрожжей и спирта и 96 кг – при получении только дрожжей. Производительность процесса составляет 2.4 кг/м³ ч, содержание сырого протеина в биомассе – 48 %.

Представляется перспективным привлечение в качестве субстрата для получения кормовых дрожжей продуктов совместного гидролиза растительного сырья и ила очистных сооружений. При этом питательная среда дополнительно обогащается аминокислотами растительного и животного происхождения. Это увеличивает выход дрожжей и содержание в них белка. Сырьевая база производства микробного кормового белка расширяется также за счет использования гидролизатов торфа, которые содержат в больших количествах легкоусвояемые моносахара, а также органические кислоты. Выход дрожжей достигает 65–68 % от РВ гидролизатов, при этом качество дрожжевой биомассы превосходит дрожжи, выращенные на гидролизатах отходов растительного сырья.

Среди новых источников сырья большой интерес представляют так называемые возобновляемые ресурсы углеводов, получаемые из лигнин-целлюлозных материалов. Данные материалы с целью осахаривания подвергаются обработке с использованием традиционных физических и химических, а также биотехнологических методов, например, на основе целлюлолитических ферментов или микробных клеток. Микробные клетки (дрожжи, бактерии, грибы белой гнили) в процессе роста разлагают целлюлозу и обогащают получаемый белковый продукт аминокислотами. Круг таких продуцентов расширяется за счет быстрорастущих представителей не только дрожжей, но и грибов и бактерий, например родов *Trichoderma*, *Cellulomonas*, *Aspergillus* и *Alcaligenes*, обладающих по сравнению с дрожжами более высокими скоростями роста и лучшим набором аминокислот.

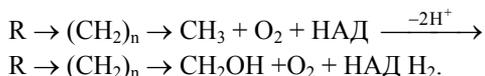
Субстраты II-го поколения – жидкие углеводороды

Способность микроорганизмов использовать в качестве основного ростового субстрата углеводороды была доказана Таусоном в 1935 г. Интенсивные научные исследования углеводородов в качестве потенциального субстрата для получения белка одноклеточных были развернуты в 50–60-е годы XX столетия. Было установлено, что микроорганизмами могут усваиваться практически все классы углеводородов, включая прямогонные дизельные фракции, очищенные жидкие парафины, масляные дистилляты и другие нефтепродукты, содержащие *n*-парафины, но с наибольшими скоростями утилизируются углеводороды нормального строения с длиной углеродной цепи C₁₁–C₁₈, вскипающие при 200–320°.

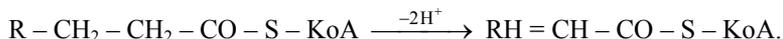
В качестве штаммов-продуцентов белка одноклеточных на углеводородах наибольшее распространение получили дрожжи рода *Candida*: *C. guilliermondii*, *C. maltosa*, *C. scottii*. Полученные в результате селекционно-генетической работы быстрорастущие штаммы устойчивы к вытеснению

другими микробными видами в условиях нестерильной промышленной культуры.

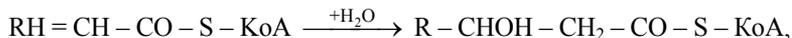
Углеводороды проникают в микробные клетки через липидную фракцию клеточной стенки, имеющей гидрофобную структуру, до цитоплазматической мембраны по градиенту концентрации. Микробиологическое окисление *n*-парафинов включает несколько этапов. В результате первичного окисления углеводов образуются спирты:



Спирты далее с участием алкогольдегидрогеназы окисляются до альдегидов, которые альдегиддегидрогеназой окисляются до кислот. Далее в реакциях β -окисления при участии ацетил-КоА образуются соответствующие производные кислот, которые при участии ацетилгидрогеназы окисляются с образованием соединений с двойной углеродной связью:



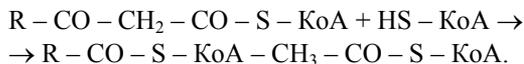
Далее ненасыщенное соединение гидратируется, превращаясь в β -кислоту:



которая восстанавливается до кетокислоты:



Реакции β -окисления завершаются при участии α -кетואцетилтиолазы с образованием ацетил-КоА и жирной кислоты с укороченной на 2 атома углерода цепью по сравнению с исходной кислотой:



Ацетил-КоА-эфир жирной кислоты снова вступает в реакции β -окисления.

При получении белковой биомассы на углеводородах имеются существенные ограничения, так как в исходных парафинах могут присутствовать циклические углеводороды. Поэтому в качестве сырья могут быть использованы только высокоочищенные парафины с содержанием ароматических углеводородов не более 0.01 %. Парафины не растворяются в воде, поэтому культивирование на данном субстрате осуществляется в эмульсии, представляющей собой мелко диспергированные в среде капли углеводородов диаметром не более 5 мкм. В данном случае культура является четырехфазной системой («газ – жидкость – жидкие углеводороды – микробные клетки»). Кроме перемешивания на эффективность диспергирования углеводородов оказывает влияние также поверхностное натяжение, поэтому очень важен состав и реологические свойства питательной

среды. Парафины служат только источником энергии и углерода для микроорганизмов, поэтому все необходимые для роста дрожжей макро- и микроэлементы дозируют в питательную среду в соответствии с потребностями в них культуры. В питательную среду вводятся сульфат аммония, суперфосфат, хлорид калия и раствор микроэлементов, а также ПАВ для снижения поверхностного натяжения и повышения скорости роста дрожжей. Используемая для коррекции р-н среды аммиачная вода является также дополнительным источником азота. Содержание парафинов в исходной питательной среде на стадии ферментации составляет 3–5 %. С увеличением концентрации углерода потребности культуры в кислороде возрастают, так как утилизация углеводов клетками осуществляется в режиме интенсивной аэрации. Потребности углеводород-ассимилирующих дрожжей в кислороде в 2.6–2.8 раза выше по сравнению с процессом на углеводах. Расход воздуха составляет от 20 до 50 м³ на 1 кг АСВ дрожжей.

Эффективный процесс получения белка одноклеточных на жидких углеводородах реализуется в ферментах типа Б-50, представляющих собой 12-секционный аппарат в виде тора общим объемом 800 м³ при рабочем объеме 320 м³. Каждая секция аппарата снабжена перемешивающим устройством в виде самовсасывающей мешалки турбинного типа и эжекционным устройством. Суспензия в ходе ферментации последовательно проходит все секции. При этом в 1–9 секциях реализуется активный рост клеток при непрерывном поступлении углеродного субстрата; в последних трех – так называемая стадия «дозревания», в ходе которой подача субстрата прекращается и происходит окисление и доутилизация дрожжами остаточных углеводов. Такой режим позволяет практически полно утилизировать субстрат и получить продукт с допустимым уровнем остаточных углеводов (не более 0.01 %). Окисление углеводов с большими затратами кислорода сопровождается большим тепловыделением (2.5–3.5 ккал/кг). Поэтому система отвода тепла представляет собой встроенные теплообменники с поверхностью до 3000 м² на каждую секцию. Время пребывания культуры в аппарате составляет около 8 ч, скорость протока среды – до 0.22 ч⁻¹ при стабилизации рН на уровне 4.0–4.5, температуры – 32–34°C. Производительность процесса достигает 27 т в сутки, экономический коэффициент по углеводородам – 1.0–1.2, затраты углеводов – 0.9–1.0 т, кислорода – 2.4–2.8 т/т АСВ. Готовый продукт, БВК, полученный на углеводородах, содержит (%): сырой протеин – до 60, жиры – 5, углеводы – 10–20, зола, влага – до 10; витамин D₂ – до 4000 м.е. и витамины группы В.

К середине 70-х гг. технологии получения белка одноклеточных на углеводородах были разработаны всеми развитыми странами. Крупнотоннажные производства БВК были созданы в СССР, Италии, Румынии, Франции. В 1980 г. объемы производства составили: СССР около 1.0 млн.

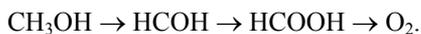
т/г; 20 000 т/г во Франции; 300 000 т/г в Италии; 1500 т/г в Румынии, 5000 т/г в Великобритании. Однако это направление производства белка одноклеточных не получило развития, за исключением России, так как стоимость БВК из углеводов пока не удалось снизить до уровня традиционных кормовых продуктов (соевой и рыбной муки).

Субстраты III-го поколения – оксидады углеводов, газообразные углеводороды, углекислота, водород

Перспективными видами сырья для крупнотоннажного получения микробного белка принято считать спирты, природный газ, водород.

Масштабы производства, технологичность низших спиртов и качество получаемого микробного белка выдвинули метанол и этанол в разряд наиболее перспективных субстратов. Исследование процессов микробного синтеза на спиртах с середины 70-х годов были развернуты всеми развитыми странами. Было показано, что способность усваивать метанол присуща как дрожжам (рода *Hansenula*, *Candida*), так и бактериям (*Pseudomonas*, *Methylomonas*).

Усвоение метанола микроорганизмами происходит в результате 3-х последовательных стадий через формальдегид и формиат до углекислоты:



Преимущества метанола по сравнению с жидкими углеводородами состоят в прекрасной растворимости в воде, высокой чистоте и отсутствии канцерогенных примесей, высокой летучести. Это позволяет легко удалить его остатки из готового продукта на стадии термообработки и высушивания. Тепловыделение в ходе ферментации на метаноле также существенно ниже вследствие химического строения спиртов и наличия в их составе кислорода. Биологическая активность спиртов, проявляющаяся по отношению к посторонней микрофлоре, является дополнительным фактором, обеспечивающим доминирование в культуре производственных штаммов-продуцентов. Однако горючесть спиртов и возможность образования с воздухом взрывоопасных смесей (диапазон концентраций 6–35 % объемных), а также токсичность требуют специальных мер, обеспечивающих безопасный режим работы.

Питательная среда, помимо спирта (8–10 г/л), содержит все необходимые для нелимитированного роста клеток, элементы питания. Помимо традиционных макро- и микроэлементов в среду в качестве дополнительного источника азотного питания и витаминов вводят дрожжевой экстракт (50 мг/л).

Типы используемых режимов ферментации и аппаратуры определяют физиологической спецификой штамма-продуцента. При выращивании дрожжей (*S. boidinii*, *H. polymorpha*) в условиях асептической или частично неасептической ферментации применяются аппараты с вводом энергии жидкой фазой с эжекционными устройствами. Температура культивирования составляет 34–37°C, pH – 4.2–4.6, скорость протока среды – 0.12–

0.16 ч⁻¹, экономический коэффициент по метанолу – 0.4. Производительность аппаратов достигает 75 т АСВ в сутки при концентрации клеток в суспензии до 30 г/л. Затраты метанола на синтез биомассы составляют около 2.5 т/т. Получаемые на метаноле дрожжи имеют следующий состав (%): сырой протеин – 56–62, липиды – 5–6, нуклеиновые кислоты – 5–6, зола – 7–11, влажность – не выше 10.

При использовании в качестве продуцента белка одноклеточных бактериальных форм (*Methylomonas clara*, *Ps. rosea*) для ферментации используют струйные аппараты производительностью 100–300 т АСВ в сутки. Процесс проводят при 32–34°C, pH 6.0–6.4, скорости протока среды 0.5 ч⁻¹. Экономический коэффициент по метанолу достигает 0.45, то есть его затраты на получения конечного продукта снижаются до 2.2 т/т. Бактериальная биомасса по сравнению с дрожжевой содержит больше азотсодержащих компонентов (%): сырого протеина – до 74, нуклеиновых кислот – 10–13.

Высокоочищенным субстратом для получения микробного белка пищевого назначения является этанол. Наиболее продуктивные производственные штаммы дрожжей (*C. utilis*, *Hansenula anomala*) обеспечивают получение белкового продукта пищевого назначения с содержанием белка до 60 % при скорости протока среды 0.14 ч⁻¹ и экономическим коэффициентом по этанолу 0.40–0.45. До недавнего времени вопрос о реализации процесса получения микробного белка на спиртах в промышленных масштабах не казался злободневным из-за достаточно высокой отпускной цены на данный субстрат. Однако в связи с разработкой в последние годы более эффективных технологий получения спиртов и повышением спроса на белковые продукты данная технология становится перспективной.

В 70-е годы с поиском новых доступных источников сырья стали рассматривать возможности привлечения для получения микробного белка **газообразных углеводов**, главным образом, – **метана**, источником которого служит широко распространенный природный газ. Природный газ, помимо сравнительно низкой стоимости и доступности, характеризуется отсутствием ингибирующих рост микроорганизмов примесей, позволяет получать сравнительно большие выходы биомассы и не требует специальной очистки ни исходного сырья, ни получаемой биомассы. Продуцентами микробного белка на метане являются бактерии родов *Methylococcus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Methanomonas*, которые утилизируют метан в качестве источника углерода и энергии, окисляя его через ряд последовательных стадий через спирт и альдегид до углекислоты:



При использовании метана возникает ряд существенных технологических проблем в связи с особенностями метана как субстрата роста. Метан поступает из газовой фазы и имеет низкую растворимость (до 0.02 г/л при нормальном давлении), поэтому скорость его растворения в культуре яв-

ляется лимитирующим фактором, определяющим скорость роста продуцента. Синтез биомассы сопровождается выделением в околочлеточную среду промежуточных продуктов окисления метана (до 0,2–0,6 г углерода на 1 г синтезированной биомассы), ингибирующих развитие основного производственного штамма. Поэтому используют микробную ассоциацию, в составе которой, помимо метанотрофов, развиваются 5–6 гетеротрофных видов, утилизирующих продукты неполного окисления метана. В связи с высокой восстановленностью метана для его микробного окисления требуется большое количество кислорода (в 5 раз больше, чем на углеводах и в 2–3 раза больше, чем при окислении жидких углеводов). Поэтому процесс требует сложного аппаратного оформления стадии ферментации. Выращивание метанотрофных бактерий осуществляется в проточной культуре при 34–38°C и нейтральных значениях pH среды. Питательная среда содержит обычный набор минеральных элементов; источником азота служит как восстановленная, так и окисленные формы. При использовании олигонитрофильных микроорганизмов концентрация азота в среде низка (20–30 мг/л). Потребности в кислороде у микробных клеток в 2–3 раза превышает их потребности в метане. Однако из-за взрывоопасности субстрата стехиометрическое соотношение данных газов принимается не оптимальным для развития бактерий, и процесс реализуется при лимите по кислороду и избытке метана.

Для выращивания метанотрофных бактерий используют аппараты со струйным диспергированием газовой среды, имеющие высокие массообменные характеристики. Для более полного усвоения метана применяют рециркуляцию газовой смеси, повышение рабочего давления в аппарате, а также использование вместо воздуха кислорода. Это позволяет повысить степень утилизации газового субстрата до 95 %. Скорость протока среды в ходе ферментации составляет $0.25\text{--}0.30\text{ ч}^{-1}$; концентрация клеток в культуре на выходе из ферментера не превышает 10 г/л. Затраты субстрата на 1 т биомассы составляют для метана и кислорода 1,8–2,2 и 4,5–5,0 т соответственно. Биомасса содержит (%): сырой протеин – до 75, нуклеиновые кислоты – 10, липиды – 5, зола – до 10, влажность – не выше 10. Получаемый белок по содержанию и соотношению аминокислот близок к рыбной муке и соевым шротам.

Крупнотоннажное производство белка одноклеточных на природном газе реализовано в России. Технологию и данный субстрат прогнозно считают перспективными. Однако рентабельность и развитие этого направления во многом будут зависеть от возможности совершенствования аппаратного оформления и интенсификации процесса.

Принципиально новым направлением в изыскании перспективных продуцентов белка является привлечение **фотоавтотрофных организмов**, использующих в качестве углеродного источника **углекислоту**, а энергии – **свет**. Исследования водорослей в качестве возможных продуцентов бел-

ка проводят несколько десятилетий. Внимание к водорослям определяется способом их питания, химическим составом биомассы, технологичностью. Процесс прироста биомассы водорослей происходит за счет фотосинтеза, поэтому главным фактором, определяющим эффективность, является освещенность. С середины 60-х в качестве перспективных биосинтетиков белка активно рассматривали водоросли (*Chlorella*, *Scenedesmus*). Однако эти надежды не оправдались из-за малой доступности данных биомасс (неперевариваемые клеточные стенки, необходимость дезинтеграции клеток и очистки белков от токсичного хлорофилла и др.), а также низкой энергетической эффективности фотосинтеза.

Эффективным белковым продуктом оказались цианобактерии рода *Spirulina*, растущие в природных условиях и способные фиксировать атмосферный азот. Биомасса *Spirulina* содержит (%): до 70 белков, полноценного аминокислотного состава, 19 углеводов, 4 нуклеиновых кислот и 4 липидов, 6 пигментов и по 3 золы и волокон. Клеточная стенка имеет отличный от микроводорослей состав и легко переваривается. Низкий уровень нуклеиновых кислот в биомассе, нетоксичность пигментов фикоцианинов, высокий уровень переваримого белка, – все это сделали данную биомассу полноценным белковым продуктом пищевого назначения. При метаболизме белков спирулины в организме человека не образуется холестерина, поэтому данный белок стали рассматривать в качестве компонента диетического питания.

Первые упоминания о спирулине относятся к началу XVI, когда на базарах в окрестностях Мехико продавали в виде галет высушенную *Spirulina maxima*, растущую в естественных условиях в щелочном озере Текскоко. В середине XIX века бельгийская экспедиция через Сахару на деревенских базарах в районе озера Чад также обнаружила сине-зеленые галеты, представляющие собой высушенную биомассу другой популяции – *Spirulina platensis*, растущей в щелочных прудах, окружающих озеро. Спирулина растет практически как монокультура, так как pH озерной воды в местах ее естественного обитания достигает 10.5–11.0. Благодаря наличию в клетках наполненных газом вакуолей и спиральной форме филламентов, клубки водорослей всплывают на поверхность, и ветер выносит их на берег. Время удвоения биомассы спирулины составляет около 3–4 дней, и собирать урожай можно круглосуточно. В оптимальных условиях выход биомассы составляет до 20 г АСВ/м² в сутки. Это на порядок превышает урожай пшеницы, при этом качество получаемого белка существенно выше растительного (табл. 2.2).

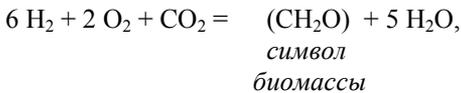
Эксперименты по исследованию биологической ценности спирулины, выполненные Французским институтом нефти совместно с компанией «Соса Текскоко», завершились в 1973 г. созданием первой опытной фабрики. К 1982 г. производство достигло 1000 т/г. Главными импортерами продукта (мука, таблетки) являются Япония, США, европейские страны.

Сопоставление продуктивности высших растений и Spirulina (по А. Сассону, 1987)

Продукцент	Выход, т/га/год	
	Вес (АСБ)	Неочищенный белок
Пшеница	4	0.5
Кукуруза	7	1.0
Соевые бобы	6	2.4
Spirulina	50	35.0

Аналогичные производства по выращиванию спирулины в искусственных условиях планируют Франция, Италия. В Израиле близ г. Хайфа на болотах площадью 12 000 м² выращивают водоросль *Spirulina platensis* для кормовых и пищевых целей. Генетическое усовершенствование имеющихся штаммов *Spirulina* может существенно повысить их урожайность. Получены мутанты, у которых при сохранении скорости роста пул аминокислот может быть существенно выше, чем у исходного. Показана возможность выращивания спирулины в искусственных щелочных прудах, а также в отходящих теплых водах теплостанций.

В середине 70-х годов активизировались исследования, направленные на разработку технологий получения микробного белка с использованием **хемолитоавтотрофных микроорганизмов**. Хемолитоавтотрофные водородоокисляющие бактерии, использующие в качестве источника углерода углекислоту, а энергии – реакцию окисления водорода, в середине 70-х годов привлекли внимание биотехнологов. Окисление водорода с образованием биомассы (СН₂О) реализуется по схеме:



Перспективность водородоокисляющих бактерий определяется их автотрофией и независимостью от дефицитных источников органического сырья, быстрым ростом, высоким содержанием полноценного по аминокислотному составу белка, отсутствием внеклеточных промежуточных продуктов обмена органической природы (единственным побочным продуктом процесса окисления водорода является вода), высокой экологической чистотой процесса производства и получаемого продукта. В качестве источника водорода, помимо электролизного, могут быть использованы различные водородсодержащие газы, включая синтез-газ и отходы ряда химических и нефтехимических производств, а углекислоты – топочные газы и экспанзерная углекислота биохимических производств. Таким образом, производство белка одноклеточных на основе водородоокисляющих бактерий может выполнять функции очистного сооружения. Вместе с тем данная технология по ряду показателей (труднорастворимый и взрыво-

опасный газовый субстрат) имеет ограничения аналогично способу получения белка одноклеточных на метане. Технология получения микробного белка на основе водородных бактерий, реализованная на уровне опытного производства и имеет следующие характеристики при незащищенной проточной ферментации в аппаратах с вводом энергии жидкой фазой, оснащенных эжекторами или самовсасывающими турбинными мешалками (1500 об./мин.): скорость протока среды 0.4 ч^{-1} , концентрация клеток в культуре – 10–20 г/л; затраты водорода – 0.7, углекислоты – 2.0, кислорода – 3.0 т на 1 т АСВ биомассы.

В настоящее время по сравнению с легкодоступным и сравнительно дешевым природным газом биотехнология на основе водорода считается менее доступной для организации крупнотоннажного производства белка одноклеточных. Однако в связи с прогнозами развития водородной энергетики и высокой экологической чистотой данный процесс, несомненно, представляется перспективным.

Таким образом, для эффективного восполнения имеющегося дефицита белка могут быть реализованы различные нетрадиционные биотехнологии с привлечением разнообразных субстратов и штаммов-продуцентов. История микробного белка только начинается, и если сегодня белки одноклеточных принципиально не могут решить проблему существующего белкового дефицита, в последующие годы они будут играть все большую роль в жизни человека.

2.2. АМИНОКИСЛОТЫ

Аминокислоты с каждым годом находят все большее применение в качестве кормовых и пищевых добавок и приправ, сырья фармацевтической и парфюмерной промышленности. Все аминокислоты, из которых состоят белки, являются L-формами. Из 20 аминокислот – 8 (изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, валин, фенилаланин) незаменимы для человека. Для сельскохозяйственных животных этот список дополняют гистидин и аргинин, а для молодняка птицы – еще и пролин. Поэтому в больших количествах аминокислоты употребляют для балансировки кормов. Введение в состав комбикормов аминокислот сокращает расход дефицитных белков животного происхождения. За последние 10 лет количество аминокислот, используемых в кормопроизводстве, возросло в 15 раз. Это составляет около 70 % от объема их производства. Около 30 % производимых аминокислот используется в пищевой промышленности. Так, цистеин предотвращает пригорание пищи в процессе приготовления, улучшает качество хлеба при выпечке, усиливает запах пищи. Глицин, обладающий освежающим, сладковатым вкусом, используется при производстве напитков. Глутаминовая кислота – для усиления вкуса и консервирования пищи. Ряд аминокислот (аргинин, аспартат, цистеин, фенилаланин и др.) используют в медицине. Аминокислоты широко используют

ся в химической и фармацевтической промышленности в качестве предшественников для производства детергентов, полиаминокислот, полиуретана и препаратов для сельского хозяйства.

Получение аминокислот возможно несколькими путями: химическим синтезом, гидролизом природного белкового сырья и в биотехнологических процессах. Химический синтез дает рацемат – продукт, содержащий как L-, так и D-формы аминокислот. За исключением глицина, который не имеет оптически активных изомеров, и метионина, усваиваемого организмами в обеих формах, D-изомеры обладают токсичностью. Получение оптически активных L-изомеров аминокислот из гидролизатов природных материалов растительного и животного происхождения связано с многоступенчатой и дорогостоящей очисткой. Биотехнологическое получение аминокислот включает в себя прямую микробную ферментацию, а также микробиологический или ферментативный синтез из предшественников.

Микробиологический метод получения аминокислот, наиболее распространенный в настоящее время, основан на способности микроорганизмов синтезировать все L-аминокислоты, а в определенных условиях – обеспечивать их сверхсинтез. Биосинтез аминокислот в микробных клетках протекает в виде так называемых свободных аминокислот или «пула аминокислот», из которого в процессах конструктивного метаболизма синтезируются клеточные макромолекулы. Для синтеза всех белков требуется 20 аминокислот. Пути синтеза большинства аминокислот взаимосвязаны. При этом одни аминокислоты являются предшественниками для биосинтеза других. Пируват является предшественником аланина, валина, лейцина; 3-фосфоглицерат – серина, глицина, цистеина; щавелево-уксусная кислота – аспартата, аспарагина, метионина, лизина, треонина, изолейцина; α -кетоглутаровая кислота – глутамата, глутамина, аргинина, пролина; фосфоэнолпируват+эритрозо-4-фосфат – фенилаланина, тирозина, триптофана; 5-фосфорибозил-1-пирофосфат + АТФ – гистидина. Синтез каждой аминокислоты в микробных клетках реализуется в строго определенных количествах, обеспечивающих образование последующих аминокислот, и находится под строгим генетическим контролем. Контроль осуществляется по принципу обратной связи на уровне генов, ответственных за синтез соответствующих ферментов (репрессия), и на уровне самих ферментов, которые в результате избытка образующихся аминокислот могут изменять свою активность (ретроингибирование). Данный механизм контроля исключает перепроизводство аминокислот и также препятствует их выделению из клеток в окружающую среду. Чтобы добиться сверхсинтеза отдельных аминокислот, нужно обойти или изменить данный контрольный механизм их синтеза. Для первого пути возможно использование природных «диких» штаммов; очень существенны при этом условия ферментации, так как добиться дисбаланса в системе синтеза аминокислот можно путем изменения ряда основных факторов среды (концентрация основного субстрата, pH, соотношение макро- и микроэле-

ментов в среде и др.). Изменение контрольного механизма синтеза аминокислот осуществляется генетическими методами. При этом получают мутантные организмы: ауксотрофные и регуляторные мутанты. Ауксотрофные мутанты – это организмы, утратившие способность к синтезу одной или нескольких аминокислот.

Среди продуцентов аминокислот – различные микроорганизмы, представители родов *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Microbacterium*, *Escherichia*. Используемые в промышленности микроорганизмы можно подразделить на несколько классов: дикие штаммы, ауксотрофные мутанты, регуляторные мутанты и ауксотрофные регуляторные мутанты. Промышленные штаммы, как правило, несут несколько мутаций, затрагивающих механизмы регуляции целевой аминокислоты и ее предшественников.

Для получения таких аминокислот, как L-глутамата, L-валина, L-аланина, L-глутамин и L-пролина возможно применение природных штаммов и усиление у них продукции аминокислот условиями ферментации. Например, высокий, до 30 г/л, выход глутамата возможен при полном или частичном подавлении активности а-кетоглутаратдегидрогеназы, добавках в среду ПАВ и антибиотиков (пенициллина, цефалоспорины) для увеличения проницаемости клеточных мембран для глутамата. Синтез L-глутамата можно переключить на образование L-глутамин или L-пролин, изменяя условия ферментации. При повышении концентрации ионов аммония и биотина в среде стимулируется образование L-пролин; слабо кислая среда и ионы цинка при избытке аммония усиливают синтез L-глутамин.

Ауксотрофные мутанты используют в тех случаях, когда необходимо синтезировать аминокислоты, являющиеся конечными продуктами разветвленных цепей метаболических реакций аминокислот. Например, для получения L-лизина, L-треонин, L-метионин или L-изолейцин, для которых общим предшественником является L-аспартат, применяют мутанты, ауксотрофные по гомосерину или треонину и гомосерину. Ауксотрофные мутанты не способны образовывать ингибиторы соответствующего метаболического пути, работающие по принципу отрицательной обратной связи из-за отсутствия определенной ключевой ферментативной реакции. Поэтому при выращивании такого штамма в среде с минимальной концентрацией необходимого ингредиента (аминокислоты) они способны на суперпродукцию аминокислоты-предшественника. Ауксотрофные мутанты, способные накапливать конечные продукты неразветвленных цепей биосинтеза, например L-аргинин, невозможны. В данной ситуации приходится получать мутанты с частично нарушенной регуляцией биосинтеза, так как это позволяет повысить выход целевого продукта. Такие организмы являются регуляторными мутантами.

Регуляторные мутанты отбирают по устойчивости к аналогам аминокислот либо среди ревертантов ауксотрофов. Аналоги аминокислот выступают в роли искусственных ингибиторов ферментов, работающих по принципу обратной связи, одновременно обеспечивая биосинтез требуемых аминокислот и подавляя процесс их включения в белки. Так, серусодержащий аналог лизина S-(2-аминоэтил)-L-цистеин является у *Brevibacterium flavum* ложным и действует ингибитором аспараткиназы по принципу обратной связи. Поэтому устойчивые к его действию мутанты, у которых выход лизина достигает 33 г/л, синтезируют фермент, в 100 раз менее чувствительный к ингибированию по механизму обратной связи, по сравнению с исходным штаммом. Регуляторные мутанты получают путем трансдукции, проводя при этом отбор сначала отдельных мутаций, вызывающих полное рассогласование механизмов регуляции, а затем объединяя данные признаки путем ко-трансдукции. В результате этого, у одного штамма можно последовательно закрепить устойчивость к нескольким аналогам.

В последние годы для получения новых эффективных штаммов-продуцентов аминокислот стали применять новейшие методы биотехнологии. Методы генетической инженерии позволяют повышать количество генов биосинтеза путем их клонирования на плаزمиды. Это приводит к увеличению количества ферментов, ответственных за синтез аминокислот, следовательно, повышает выход целевого продукта. Клонирование генов системы синтеза аминокислот в клетки микроорганизмов с иным, по сравнению с донорским организмом, типом питания позволяет расширять сырьевую базу и заменять дорогостоящие сахаросодержащие субстраты более дешевыми.

Производственные биотехнологические процессы получения аминокислот реализуются в условиях глубокой аэробной периодической ферментации. Скорость синтеза аминокислот не совпадает во времени со скоростью роста производственной культуры (рис. 2.1).

Максимальная продукция аминокислоты наступает, как правило, когда прирост биомассы практически прекращается. Поэтому питательная среда на первом этапе ферментации должна обеспечивать сбалансированный рост клеток; а на втором – условия для сверхсинтеза целевой аминокислоты. В качестве источника углерода и энергии используют богатые сахаросодержащие субстраты, главным образом, мелассу. Возможно также привлечение более доступных субстратов (ацетат, сульфитный щелок, углеводороды). В зависимости от таксономического положения и физиологических потребностей микроорганизмов в качестве источника азота используют соли аммония, нитраты, а также аминокислоты и молекулярный азот. В состав среды вносят необходимые количества углерода и азота, фосфатов и других солей, а также стимуляторы роста (витамины, дрожжевой экстракт), ПАВ, антибиотики. Периодический режим ферментации и

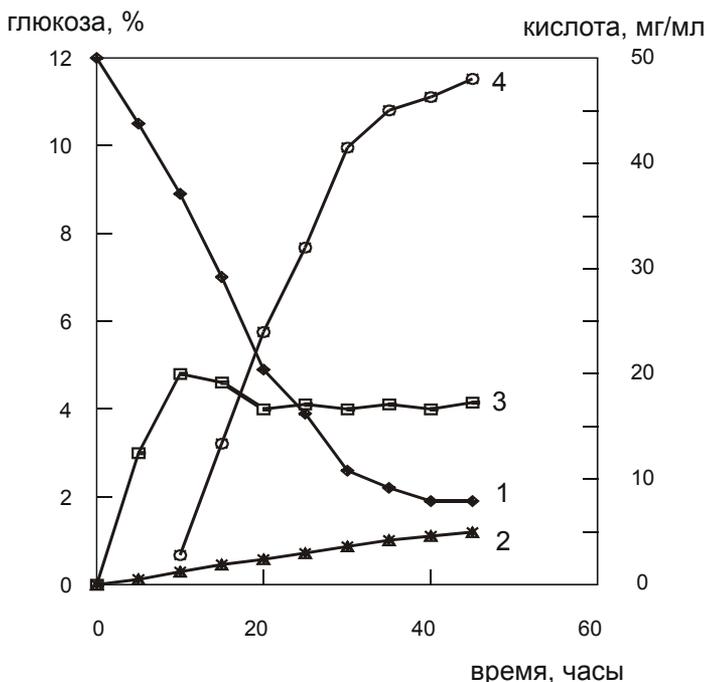
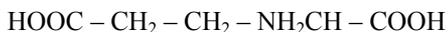


Рис. 2.1. Основные показатели культуры *Corynebacterium glutamaticum* при синтезе глутаминовой кислоты (по А. М. Безбородову, 1989).
1 – глюкоза, 2 – кетоглутаровая кислота, 3 – биомасса, 4 – глутаминовая кислота.

богатая по составу среда требуют соблюдения строгой стерильности в ходе получения инокулята и на ферментационной стадии. Стерилизации подвергаются питательная среда, воздух и все технологическое оборудование. После стадии ферментации в процессе обработки культуральной жидкости клетки отделяют от раствора, который далее подвергают очистке от окрашенных примесей и взвешенных частиц с помощью сорбционных методов. Далее процесс проводится с использованием различных методов выделения и очистки в зависимости от сферы применения конечного продукта. Для фармакологии и пищевой промышленности аминокислоты выпускают в виде высушенных чистых кристаллических препаратов; для кормовых и технических целей – используют стабилизированную и сконцентрированную культуральную жидкость.

Технология получения глутаминовой кислоты

L-глутаминовая кислота (α -аминоглутаровая) – первая аминокислота, полученная на основе промышленного микробиологического синтеза:



Глутаминовая кислота является важнейшей аминокислотой растительных и животных белков, не будучи незаменимой. Синтез глутаминовой

кислоты происходит в цикле трикарбоновых кислот (рис. 2.2) в результате ферментативного восстановительного аминирования 2-кетоглутаровой кислоты НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназой:



2-кетоглутаровая кислота образуется в свою очередь из изолимонной кислоты под воздействием изоцитратдегидрогеназы. Необходимый для синтеза глутаминовой кислоты НАД(Ф)Н постоянно регенерируется в процессе окисления изолимонной кислоты в 2-кетоглутаровую.

Возможность получения глутаминовой кислоты из углеводов на основе микроорганизмов впервые была продемонстрирована в 1957 г. японскими исследователями Киносита, Асаи и др. Продуцировать глутаминовую кислоту способны дрожжи, микроскопические грибы, бактерии. Бактерии обеспечивают наибольший выход по отношению к использованному углеродному субстрату (не менее 40–50 %). Промышленное значение имеют



Рис. 2.2. Схема синтеза глутаминовой кислоты *C. glutamicum*.

бактериальные культуры (*Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*). Сверхсинтез кислоты у диких штаммов возможен в специальных физиологических условиях при торможении скорости роста и увеличении проницаемости клеточной мембраны для глутаминовой кислоты. Такие условия обеспечивает определенная концентрация биотина в среде (1–5 мкг/л), а также присутствие некоторых антибиотиков. Внутриклеточная концентрация глутаминовой кислоты снижается в результате экскреции продукта в околоклеточную среду, поэтому регуляция синтеза конечным продуктом ослабевает. Сверхпродукция глутаминовой кислоты связана также с высокой концентрацией аммония в среде, высокой активностью НАД(Ф)Н-зависимой глутаматдегидрогеназы и отсутствием или дефектом α -кетоглутаратдегидрогеназы, катализирующей превращение 2-кетоглутарата в янтарную кислоту.

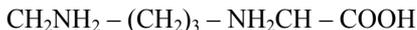
Глутаминовая кислота в основном используется в фармакологии и пищевой промышленности, поэтому задача постферментационной стадии – получение высокоочищенных препаратов. Для этого на первом этапе обработки культуральной жидкости в нее добавляют негашеную известь или известковое молоко. После этого избыток ионов осаждают кислотой, осадок удаляют центрифугированием. Фильтрат после осветления активированным углем и сорбции на ионообменных смолах концентрируют вакуум-выпариванием при 40–60°C. Осаждение кристаллов глутаминовой кислоты проводят в изоэлектрической точке (рН 3.2 при 4–15°C). В результате перекристаллизации чистота продукта достигает 99.6 %. Кристаллы кислоты отделяют от маточника центрифугированием, промывают и высушивают. Если нужно получить глутамат натрия, кристаллы глутаминовой кислоты обрабатывают гидроокисью натрия. Для этого влажные кристаллы растворяют в воде, нейтрализуют 50 % раствором едкого натра. Полученный раствор фильтруют, упаривают под вакуумом до содержания сухих веществ 60 % и направляют на перекристаллизацию. Полученные кристаллы глутамата натрия выделяют из маточного раствора центрифугированием и высушивают током горячего воздуха.

Глутамат натрия усиливает вкус многих пищевых продуктов, способствует длительному сохранению вкусовых качеств консервированных продуктов (овощей, рыбы, мясных продуктов). За рубежом глутамат натрия добавляют во все продукты не только при консервировании, но и при замораживании и просто хранении. В Японии, США и других странах глутамат натрия является обязательной принадлежностью стола аналогично соли, перцу, горчице. Глутаминовая кислота не только повышает вкусовую ценность пищи, но также стимулирует пищеварение. Важное свойство глутаминовой кислоты – служить защитным фактором при отравлениях внутренних органов (печени, почек), ослаблять действие токсинов и усиливать ряд фармакологических препаратов. В настоящее время производство глутаминовой кислоты является крупнотоннажным биотехнологиче-

ским производством (около 400 000 т/г), объемы ее производства возрастают с каждым годом. Ведущими странами – производителями глутаминовой кислоты и глутамата натрия являются Япония и США.

Технология получения лизина

L-Лизин (α , ϵ -аминокапроновая кислота):



в организме высших животных и человека определяет биологическую ценность переваримого белка. Данная аминокислота выполняет также много других важнейших биохимических функций – способствует секреции пищеварительных ферментов и транспорту кальция в клетки, улучшает общий азотный баланс в организме. Добавление лизина в состав комбикормов увеличивает усвояемость белка животными и снижает расход кормов на производство животноводческой продукции.

Синтез L-лизина у микроорганизмов осуществляется различными путями. Дрожжи, грибы и микроводоросли синтезируют лизин из α -кетоглутаровой кислоты через α -аминоадипиновую кислоту. Вследствие малой изученности этого биосинтетического пути получение мутантов – суперпродуцентов лизина через аминокадипиновый путь представляется проблематичным. Высшие растения и бактерии синтезируют лизин по другой схеме – через α -диаминопемелиновую кислоту. По этой разветвленной схеме биосинтеза L-лизина (диаминопемелиновый путь) синтез начинается с аспарагиновой кислоты и проходит через диаминопемелиновую кислоту. Помимо L- лизина, аспарагиновая кислота является также предшественником для L-метионина, L-треонина и L-изолейцина (рис. 2.3). Ключевым местом в синтезе лизина является аспартаткиназа; она ингибируется треонином. Присутствие лизина этот эффект усиливает. Треонин ингибирует дегидрогеназу полуальдегида аспарагиновой кислоты, а также гомосериндегидрогеназу. Метионин является репрессором по отношению к гомосериндегидрогеназе, а изолейцин ингибирует треониндегидрогеназу. Продукты обмена, угнетающие различные ферменты и участвующие в синтезе лизина, следует вывести из реакции. Именно поэтому для производства L-лизина используют различные ауксотрофные мутанты.

Производственные штаммы-продуценты лизина – это ауксотрофные штаммы глутаматпродуцирующих коринебактерий (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*). Применяют три типа ауксотрофных мутантов: ауксотрофы по гомосерину или треонину с подавленной гомосеринкиназой; метионин- и треонинчувствительные штаммы с существенно сниженной активностью гомосериндегидрогеназы; аналогорезистентные прототрофные продуценты лизина, устойчивые к треонину и аминоктилцистеину, с аспартаткиназой, нечувствительной к согласованному ингибированию лизином и треонином. Получены штаммы, обеспечивающие

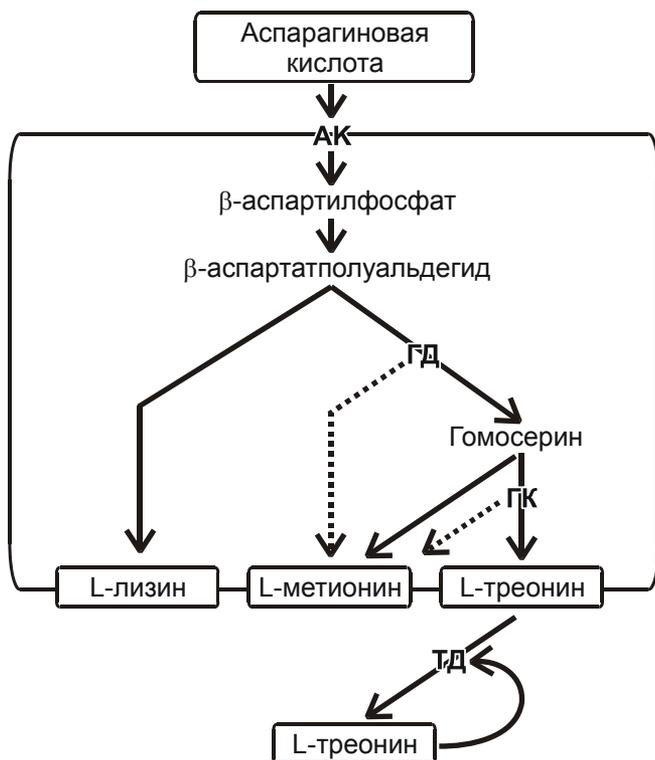


Рис. 2.3. Диаминопимелиновый путь синтеза лизина

40 % конверсию углеродного субстрата в аминокислоту и выходы лизина на сахарах до 40, уксусной кислоте – до 70 г/л.

Микробиологический процесс производства лизина аналогичен схеме получения глутаминовой кислоты, однако использование ауксотрофных микроорганизмов требует специального состава питательных сред, которые подбираются индивидуально для каждого штамма. Очень важно также осуществлять на стадии ферментации стабилизацию основных параметров культуры в строгом соответствии с технологическим регламентом данного производства, так как выход лизина зависит от температуры среды, концентрации кислорода, длительности ферментации, дозы и возраста посевного материала. Помимо сахаров (7–12 % по объему), сульфата аммония и фосфатов калия, в среду вносят кукурузный экстракт в качестве источника биологически активных веществ (1.2–1.5 % по содержанию сухих веществ), а также мел и синтетический пеногаситель. Среда должна содержать (в л): 200 мг метионина, 800 мг треонина, 15–20 мкг биотина (при меньших концентрациях биотина синтезируется глутаминовая кислота, при 2.5 мг – молочная кислота, как механизм обратного действия). Со-

отношение углерода и азота в среде оптимально как 11:1 (при его увеличении выход лизина падает, при уменьшении – накапливается аланин).

Культивирование осуществляется в строго стерильной глубокой аэробной периодической культуре в аппаратах объемом 50 и 100 м³ при коэффициенте заполнения 0.75. Процесс длится 48–72 ч при 29–30°C, контролируемом рН 7.0–7.5, непрерывном перемешивании и избыточном давлении 20–30 кПа. Уровень аэрации составляет 1 м³ воздуха/м³ среды в минуту. При ухудшении условий аэрации происходит образование молочной кислоты. Для пеногашения используют кашалотовый жир или синтетические масла (0.5 % от объема среды). В первые сутки потребляется около 25 % сахаров и почти все аминокислоты, при этом образуется практически вся биомасса. Далее на фоне резкого снижения скорости роста клеток наблюдается самая высокая скорость синтеза лизина (до 1.0 г/л ч). Для стабилизации рН периодически проводят подтитровку культуры 25 % раствором аммиака. При дополнительном дробном введении в аппарат углеводов и азота выход лизина можно повысить. Конечная концентрация кислоты достигает 40 г/л при остаточной концентрации сахаров около 0.5–1.0 г/л.

Эффективный процесс получения лизина реализован на более доступном субстрате – уксусной кислоте. Токсичность данного субстрата делает необходимой дробную подачу ацетата; его концентрация в среде не должна превышать 2 %. Небольшие добавки сахара в среду (около 1 %) повышают выход лизина на 30–50 %. Экономический коэффициент по потребляемому ацетату при этом составляет 27 %. Конечная концентрация лизина в среде достигает 40–50 г/л. В последние годы получены мутантные штаммы *V. flavum*, обеспечивающие на ацетатной среде выход лизина до 73 г/л.

Практически весь производимый микробиологическим способом L-лизин используется в кормопроизводстве для повышения усвояемости и питательности кормов. Поэтому выпускается лизин, главным образом, в виде кормовых препаратов – жидкого концентрата лизина (ЖКЛ) и кормового концентрата лизина (ККЛ).

При производстве ЖКЛ культуральную жидкость, предварительно стабилизированную 25 % раствором гидросульфита натрия, подкисляют соляной кислотой до рН 4.5–5.0. Образующийся при этом термостабильный монохлорид лизина упаривают в вакуумно-выпарных аппаратах до 40 % содержания сухих веществ. Готовый препарат ЖКЛ не замерзает при температуре до –18°C и сохраняет свои свойства в течение 3 месяцев.

ККЛ получают на основе ЖКЛ, высушивая жидкий концентрат в распылительных сушилках при температуре не более 90°C до остаточной влажности 4–8 %. Сухой препарат лизина гигроскопичен и в процессе хранения подвержен порче. Для устранения данного нежелательного явления в концентрат перед высушиванием вводят наполнители в виде костной муки, бентонита, негашеной извести, пшеничных отрубей. Высушивание полученной пасты проводят конвективным способом на вальцево-

ленточных сушилках. Препарат по составу близок к жидкому концентрату лизина и содержит (в %): 7–10 лизина, 15–17 белка, до 14 других аминокислот, 10–13 бетаина и 20–25 зольных веществ. Препарат сыпуч и негигроскопичен. Срок его хранения возрастает до 1 года.

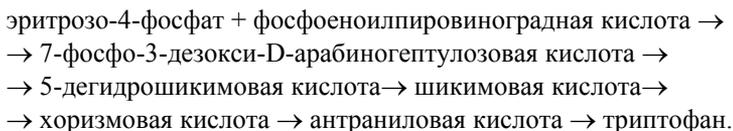
Технология получения триптофана

L-Триптофан (α -амино- β -индолилпропионовая кислота) относится к незаменимым аминокислотам:



Триптофан, наряду с другими ароматическими аминокислотами, фенилаланином и тирозином, в последние годы находит все большее применение. Отсутствие или дефицит триптофана в организме приводит к ряду тяжелых заболеваний (диабет, туберкулез, пеллагра). Используется триптофан в биохимических исследованиях, в небольших количествах – в животноводстве.

В общем виде последовательность биосинтетических реакций образования триптофана следующая:



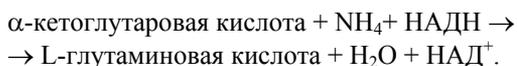
Шикимовая кислота является основным промежуточным продуктом, из которого через 5-фосфо-3-енолпирувилшикимовую кислоту образуется хоризмовая кислота. Данная стадия является ключевой для синтеза ароматических аминокислот.

Микробиологический синтез L-триптофана осуществляют на основе мутантных штаммов дрожжей (*Candida*) и бактерий (*E. coli*, *Bacillus subtilis*), дефицитных по тирозину и фенилаланину. Промышленный синтез L-триптофана осуществляется на основе сахаров. Исходная питательная среда для стерильного периодического выращивания дрожжей содержит (в %): сахароза 10, мочевины 0.5, кукурузный экстракт 2.0, а также хлорид кальция, калий фосфорнокислый и сульфат магния. Продолжительность периодической ферментации при 37°C не превышает 48 ч. В ходе постферментационной стадии триптофан выделяют из культуры по обычным схемам. Для получения очищенного кристаллического препарата работают с культуральной жидкостью. Для получения кормового концентрата используют и биомассу клеток.

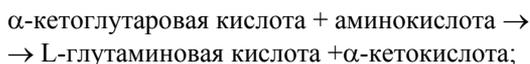
Двухступенчатое получение аминокислот из биосинтетических предшественников выбирают в тех случаях, когда предшественник недорог, а прямая микробная ферментация недостаточно экономична или разработана. При микробиологическом синтезе аминокислот из предшественников удается значительно понизить репрессию или ретроингибировать

ние, так как в результате внесения в среду готового интермедиата снимаются проблемы, связанные с наличием генетического контроля в системе синтеза аминокислот.

При двухступенчатом способе получения глутаминовой кислоты из α -кетоглутаровой, играющей роль предшественника, необходим источник данного предшественника и ферментная система, катализирующая превращение кетоглутарата в целевую аминокислоту. Кетоглутарат получают микробиологическим синтезом на основе бактерий (*Pseudomonas*, *Escherichia*) или дрожжей (*Candida*) – I ступень. На II ступени можно получить L-глутаминовую кислоту в реакции восстановительного аминирования с помощью культуры *Pseudomonas*, имеющей сильную глутаматдегидрогеназу:



L-глутаминговая кислота также может быть получена из кетоглутарата через переаминирование последней с участием трансамидазы:



II ступень по данной схеме может быть реализована культурой *E. coli*, в качестве донора аминогрупп могут выступать аланин или аспарагиновая кислота.

Комбинированный, принципиально новый способ получения L-лизина в 1973 г. был предложен японской фирмой «Тойо Рейон» («Торей»). Конечный продукт, получаемый по данной технологии, отличается высокой концентрацией и чистотой. На первой стадии циклогексан в результате химических реакций превращается в циклический ангидрид лизина (D, L- α -амино- ϵ -капролактам). На второй стадии осуществляют разделение оптических изомеров с помощью ферментов; происходящий при этом асимметрический гидролиз с участием гидролазы аминокaproлактама приводит к образованию L-лизина. Гидролазу L- α -амино- ϵ -капролактама синтезируют дрожжи (*Candida*, *Trichospora*, *Cryptococcus*), фермент стимулируется ионами марганца, магния и цинка. Источником рацемазы аминокaproлактама могут служить бактерии (*Flavobacterium*, *Achromobacter*). Оба эти фермента, обладающие рацемазной и гидролазной активностями, в виде определенного количества биомассы вводят на II ступени в водный раствор предшественника – DL-аминокaproлактама. В ходе ферментативных реакций из предшественника образуется L-лизин, чистота препарата – выше 99 %. Помимо микробной биомассы, источником превращений DL-аминокaproлактама в лизин могут служить изолированные иммобилизованные ферменты. Раствор предшественника пропускают через колонку, содержащую оба иммобилизованных фермента: один из них (гидролаза) гидролизует амидную связь в L-аминокaproлактаме, не затрагивая D-

формы предшественника; второй (рацемаза) – превращает D-изомер в рацемат с высокой скоростью. Выход L-лизина может составлять до 95 %.

L-триптафан также можно получать из предшественника – антраниловой кислоты. На первом этапе по традиционной микробиологической схеме с использованием дрожжей *Candida utilis* в течение 20–24 ч проводят процесс ферментации в условиях интенсивной (около 7 г O₂/л.ч) аэрации. Среда содержит мелассу (10.4 %), мочевины, сульфат магния, фосфаты калия. Для пеногашения используют кашалотовый жир и синтетические кремнеорганические соединения. Далее интенсивность аэрации снижают вдвое, в культуру периодически вносят растворы мочевины, мелассы и антраниловой кислоты. В течение 22–24 ч наращивают биомассу – источник ферментов; затем, в течение последующих 120 ч происходит собственно трансформация антраниловой кислоты в аминокислоту. Общее время процесса составляет около 140 ч, выход триптофана – 60 г/л.

Большие успехи в биотехнологии аминокислот были достигнуты с формированием методов инженерной энзимологии, в частности, с развитием техники иммобилизации ферментов.

Первым процессом промышленного использования иммобилизованых ферментов был процесс для разделения химически синтезированных рацемических смесей D- и L-форм аминокислот, разработанный в Японии в 1969 г. (предыдущие 15 лет процесс проводился компанией «Танабе Сейяку» с применением растворимых ферментов – аминокислаз). В качестве исходного материала используют раствор ацилпроизводных синтезированных химическим путем LD-форм аминокислот, который пропускают через колонку с иммобилизованной L-аминокислазой. Последняя гидролизует только ацил-L-изомеры, отщепляя от них объемную ацильную группу и тем самым резко увеличивает растворимость образующейся L-аминокислоты по сравнению с присутствующими в реакционной смеси ацил-D-изомерами. Далее смесь легко разделяется обычными физико-химическими методами. Компанией на промышленном уровне по данной технологии реализован синтез нескольких L-аминокислот, в том числе метионина, валина, фенилаланина, триптофана. Представляет интерес процесс получения аспарагиновой кислоты из химических предшественников (фумаровой кислоты и аммиака) на основе фермента аспартазы, разработанный японской фирмой «Танабе Сейяку». Фермент в одну стадию присоединяет молекулу аммиака к двойной связи фумаровой кислоты с образованием оптически активной L-аспарагиновой кислоты. Выход продукта составляет 99 %, процесс реализуется непрерывно в колонке объемом 1 м³. Производительность достигает 1700 кг чистой L-аспарагиновой кислоты в день на один реактор.

Дегидрогеназы аминокислот (лейцин- и аланиндегидрогеназы), катализирующие обратимые реакции дезаминирования, применяют в непрерывных процессах синтеза аминокислот из соответствующих кето-аналогов.

Глутаматсинтетаза, катализирующая АТФ-зависимую реакцию аминирования глутамата, используется для получения глутамина с 92 % выходом. L-тирозин-фенол-лиаза, катализирующая реакцию элиминации, в которой тирозин распадается с образованием фенола, аммиака и пирувата, используется для энзиматического получения последнего. L-триптофан-индол-лиаза может быть использована для получения L-триптофана из индола, пирувата и аммиака.

Высокая потребность в аминокислотах непрерывно стимулирует разработку принципиально новых и более эффективных биотехнологических способов их получения при наращивании темпов и объемов промышленного производства.

2.3. ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

Органические кислоты широко используют в пищевой и фармацевтической промышленности, в технике и в качестве химического сырья. Отдельные органические кислоты (лимонную, яблочную) можно получать экстракцией из природного растительного сырья; другие (уксусную, молочную) – в процессах органического синтеза. Более 50 органических кислот могут быть получены на основе микробиологического синтеза. Биотехнологические методы их получения к настоящему времени детально разработаны. Более того, принято считать, что органические кислоты, полученные в результате микробиологического синтеза, для использования человеком предпочтительнее в сравнении с синтетическими кислотами. Для технических нужд органические кислоты получают химическим путем; применяемые в пищевой и фармацевтической промышленности – в различных биотехнологических процессах. Это производства лимонной, молочной, уксусной, итаконовой, пропионовой и глюконовой органических кислот; (молочная и уксусные кислоты производятся также и химическим путем).

Органические кислоты в системе микробного метаболизма являются продуктами деградации источника энергии и углерода. Так, лимонная, изолимонная, кетоглутаровая, янтарная, фумаровая и яблочная кислоты – интермедиаты цикла трикарбоновых кислот у большинства аэробных микроорганизмов. Глюконовая, кетоглюконовая и винная кислоты – промежуточные продукты прямого окисления глюкозы (без фосфорилирования) некоторых аэробных бактерий и грибов. Молочная, масляная и пропионовая кислоты являются конечными продуктами метаболизма углеводов у анаэробных бактерий. Уксусная кислота – продукт окисления этанола; а алифатические моно- и дикарбоновые кислоты – промежуточные продукты окисления нормальных алканов. Таким образом, возможности микроорганизмов для получения на основе их метаболизма органических кислот велики.

Для сверхсинтеза отдельных кислот нужны селективные, строго определенные условия. При сбалансированном росте микроорганизмов на пол-

нощенной среде накопления органических кислот не происходит, так как являясь промежуточными продуктами в системе микробного метаболизма, органические кислоты – исходный материал для синтеза других макромолекул. Время максимальной скорости образования в клетке органических кислот, как и многих других метаболитов, не совпадает во времени со скоростью размножения клеток и накоплением биомассы. Сверхсинтез органических кислот наблюдается при торможении скорости роста продуцента и блокировании процессов биосинтеза, требующих участия кислот в качестве субстрата, то есть при нарушении процессов диссимиляции имеющегося эндогенного субстрата и процессов синтеза основных (азотсодержащих) компонентов клетки. Такими условиями, как правило, является полное или избыточное содержание в среде источника углерода и энергии и дефицит биогенных элементов, ограничивающих рост клеток. Большинство органических кислот получают, лимитируя рост клеток-продуцентов дефицитом азота или фосфора при избытке углеродсодержащего субстрата. Поэтому микробиологические процессы получения органических кислот – двухфазные (рис. 2.4): на первом этапе происходит так называемый сбалансированный рост при максимальном накоплении биомассы и потреблении углеродного и энергетического субстрата, а также лимитирующего биогена; на втором – происходит замедление скорости роста клеток. В результате этого прирост биомассы прекращается и начинается интенсивное кислотообразование. Длительность фазы интенсивного кислотообразования определяется наличием углеродсодержащего субстрата в среде. Важным условием кислотообразования большинства органических кислот (за исключением молочной) является хороший режим аэрации, а также величина pH среды.

Способность продуцировать ту или иную кислоту – широко распространенное среди микроорганизмов свойство. В качестве производственных культур используют специально подобранные штаммы, продуцирующие целевую кислоту в виде монопродукта с высокими выходами и эффективным усвоением углеродного субстрата. При многих производствах органических кислот экономический коэффициент по углероду достигает 90 % и выше. В качестве продуцентов используют бактериальные, дрожжевые и грибные культуры (*Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*). Способы ферментации в микробиологических процессах производства органических кислот – разнообразны. Среди них – поверхностные жидко- и твердофазные процессы, а также глубинные, включая проточные культуры. В последние годы разработаны принципиально новые и эффективные биотехнологии с использованием иммобилизованных целых клеток и ферментов. Также разнообразны и субстраты, используемые в производстве органических кислот. Применяемые в начале века глюкоза и сахароза со временем стали заменять более доступными комплексными средами (мелассой, гидролизным

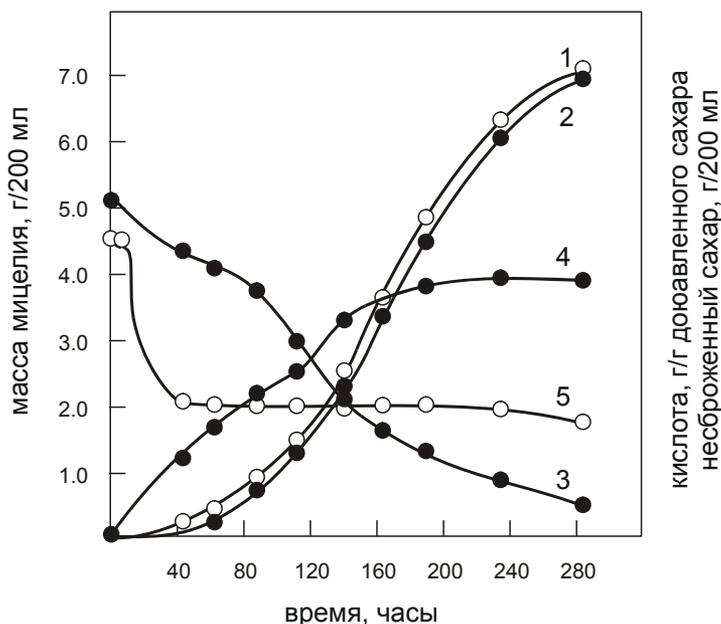


Рис. 2.4. Рост *Aspergillus niger* и образование лимонной кислоты (по Прескотт и Дэн, 1952).

1 – титруемая кислотность среды (в пересчете на лимонную кислоту), 2 – лимонная кислота, 3 – сахар в среде, 4 – масса мицелия, 5 – pH среды.

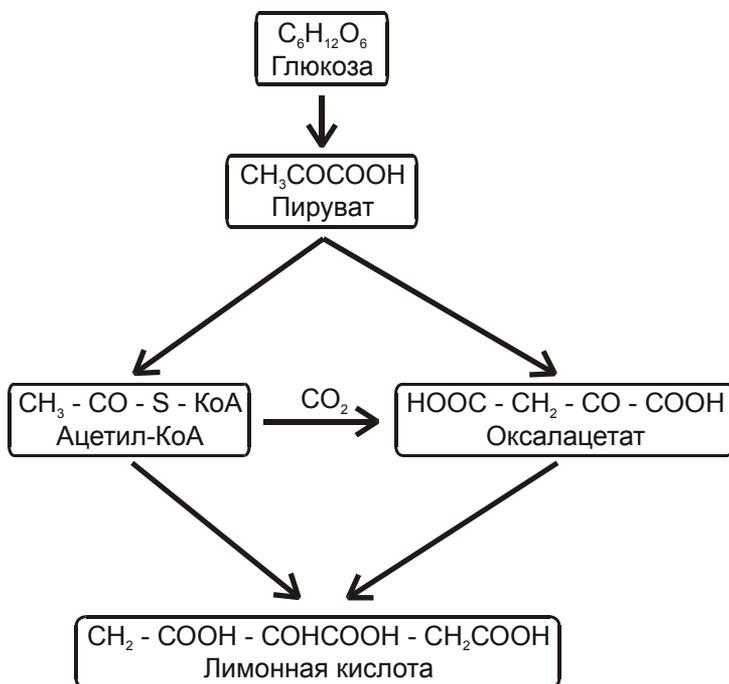
крахмалом); в 60-е годы были разработаны новые процессы получения органических кислот на жидких парафинах нефти.

Получение лимонной кислоты

Лимонная кислота ($\text{CH}_2 - \text{COOH} - \text{CONCOOH} - \text{CH}_2\text{COOH}$) – трех-основная оксикислота, широко распространенная в плодах и ягодах. Она широко применяется в пищевой промышленности при производстве кондитерских изделий и напитков, в фармацевтической, химической и текстильной промышленности. Лимонная кислота была идентифицирована в качестве продукта метаболизма плесневых грибов в 1893 г. Вемером. В настоящее время это кислота по объемам производства (свыше 350 тыс. т/г) занимает первое место среди всех органических кислот.

У микроорганизмов синтез лимонной кислоты реализуется в цикле дикарбоновых кислот и осуществляется в результате конденсации кислоты с четырьмя атомами углерода и двумя карбоксильными группами и кислоты с одной карбоксильной группой. Образующаяся в результате гликолиза пировиноградная кислота связывается с углекислотой; синтезируемая при этом щавелевоуксусная кислота реагирует с уксусной кислотой с образованием лимонной кислоты, то есть образование лимонной кислоты включает реакции гликолиза и ряд реакций цикла Кребса. При каждом обороте

цикла молекула щавелевоуксусной кислоты взаимодействует с уксусной, образуя лимонную кислоту:



Производство лимонной кислоты методом ферментации плесневых грибов принадлежит к числу давних биотехнологических процессов. Первое производство было реализовано в конце XIX века. Совершенствование процесса получения лимонной кислоты тесно связано с разработкой многих фундаментальных аспектов микробиологии (борьбой с микробным загрязнением производственной культуры, оптимизацией состава питательных сред, селекцией высокопродуктивных штаммов и др.).

В промышленном производстве лимонной кислоты в качестве продуцента в основном используют *Aspergillus niger*, но также применяют и *A. wentii*. Процесс ферментации достаточно сложен, так как лимонная кислота, является продуктом первичного метаболизма грибов, и даже незначительное выделение данного продукта в окружающую среду свидетельствует о выраженном дисбалансе клеточного метаболизма. Рост продуцента и синтез кислоты обычно регулируют составом среды (сахара, P, Mn, Fe, Zn). Сверхсинтез лимонной кислоты реализуется при больших концентрациях сахаров в среде (14–24 %) и является ответной реакцией продуцента на дефицит фосфора, а также других металлов, хотя их роль до конца не ясна. Это, видимо, и подавление анаболизма, и влияние на свойства по-

верхности и морфологию гиф. Оптимум pH на стадии кислотообразования составляет 1.7–2.0. В более щелочной среде процесс сдвигается в сторону накопления щавелевой и глюконовой кислот. В качестве основы среды обычно используют глюкозный сироп, гидролизаты крахмала или мелас-су. Последнюю предварительно разбавляют до требуемого уровня сахаров и обрабатывают с целью снижения содержания металлов. Источником азота служат соли аммония (0.2 %); концентрация фосфатов (0.01–0.2 %). В качестве пеногасителей используют природные масла с высоким содержанием жирных кислот. Очень существенное значение имеет уровень аэрации культуры.

В производстве лимонной кислоты применяют несколько вариантов процесса. Поверхностный способ реализуется на твердой сыпучей среде и в жидкой фазе. При жидкофазной поверхностной ферментации питательную среду разливают в кюветы слоем от 8 до 18 см. Кюветы размещают на стеллажах в предварительно простерилизованной парами формалина бродильной камере. Через специальные воздухопроводы с током стерильного воздуха поверхность среды засевают исходной музейной культурой. В качестве основного материала используют предварительно полученные также в условиях поверхностной культуры и высушенные споры (конидии) из расчета 50–75 мг конидий на 1 м² площади кювет. Известно несколько вариантов процесса: бессменный, бессменный с доливками и метод пленок. При бессменном режиме процесс осуществляется на одной среде от момента засева спор до завершения стадии кислотообразования. При использовании метода пленок через 7 суток после завершения кислотообразования сброженный раствор мелассы сливают из кювет, мицелий промывают стерильной водой, и в кюветы заливают новую среду. Бессменный способ с доливом характеризуется дробными добавками мелассы под пленку гриба на стадии кислотообразования (30–35 % от исходного объема), так называемый режим с подпиткой субстратом. Это позволяет повысить выход лимонной кислоты на 15–20 % с единицы поверхности при сокращении затрат сахаров на 10–15 % по сравнению с другими методами. В ходе стадии ферментации на первом этапе (первые 24–36 ч) происходит интенсивный рост мицелия. Температура среды в этот период стабилизируется на уровне 32–34°C, интенсивность аэрации составляет 3–4 м³ воздуха в ч/м мицелия. В период активного кислотообразования подачу воздуха увеличивают в 5–6 раз. В результате более интенсивного термогенеза температуру снижают до 30–32°. По мере снижения процесса кислотообразования режим аэрации становится менее интенсивным. Контроль процесса ведут по показателям титруемой кислотности среды. Процесс считают законченным при остаточной концентрации сахаров около 1–2 % и уровне титруемой кислотности 12–20 %. Содержание лимонной кислоты от уровня всех кислот достигает 94–98 %. Сброженный раствор сли-

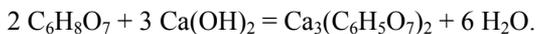
вают в сборник и направляют на обработку; промытый мицелий используют в кормопроизводстве.

Твердофазная ферментация имеет много общего с поверхностно-жидкофазным процессом. Разработанный в Японии процесс Коджи предусматривает использование в качестве среды пористого материала (багасса, картофель, пульпа сахарной свеклы, пшеничные отруби). Материал предварительно стерилизуют, после охлаждения инокулируют суспензией спор. Ферментация происходит в лотках при 25–30°C в течение 6–7 дней. Образованную лимонную кислоту экстрагируют водой. В Японии 20 % общего объема производства лимонной кислоты получают методом Коджи.

Начиная с 1950 г., промышленные процессы получения лимонной кислоты стали переводить в условия глубоководной культуры. Стабильный процесс возможен при его организации в две стадии: рост мицелия на полной среде в ходе первой стадии и на второй (при отсутствии фосфора в среде) – образование лимонной кислоты. Глубоководная ферментация проводится в аппаратах емкостью 50 м³ с заполнением на 70–75 %. В качестве посевного материала используют мицелий, подрощенный также в условиях глубоководной культуры. В производственном аппарате, куда подрощенный мицелий передается по стерильной посевной линии, питательная среда содержит 12–15 % сахаров. Ферментацию проводят при 31–32° при непрерывном перемешивании. В ходе процесса кислотообразования (5–7 суток) реализуют интенсивный режим аэрации (до 800–1000 м³/ч) с дробным добавлением сахаров, 2–3 подкормки. Выход лимонной кислоты составляет от 5 до 12 %, остаточная концентрация сахаров – 0.2–1.5 %, доля цитрата – 80–98 % от суммы всех органических кислот.

В 60-е годы начали разрабатывать процессы получения лимонной кислоты на основе жидких углеводов (C₉–C₃₀) с использованием в качестве продуцентов дрожжей (*Candida*) и бактерий (*Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*), а также с применением метода проточных культур. Эти технологии, пока не реализованные в промышленных масштабах, обещают в будущем определенные технологические перспективы.

Готовый продукт – высокоочищенную кристаллическую лимонную кислоту получают в ходе постферментационной стадии. В сброженных растворах содержатся, помимо целевой кислоты, также глюконовая и щавелевая кислоты, остатки несброженных сахаров и минеральные соли. Для выделения лимонной кислоты из данного раствора ее связывают гидроксидом кальция с образованием труднорастворимого цитрата кальция:

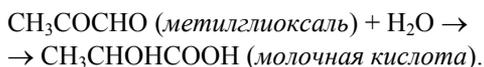


Одновременно образуются кальциевые соли глюконовой и щавелевой кислот, глюконат кальция Ca(C₆H₁₁O₇)₂ и оксалат кальция CaC₂O₄. Кальциевые соли лимонной и щавелевой кислот выпадают в осадок, а глюко-

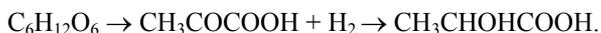
нат кальция и основная часть органических и минеральных компонентов мелассы остаются в растворе. Осадок отделяется на вакуум-филтре, промывается и высушивается. Далее для перевода лимонной кислоты в свободное состояние и освобождения от оксалата кальция осадок обрабатывают серной кислотой с последующей фильтрацией. Раствор лимонной кислоты фильтруют, концентрируют вакуум-выпаркой и затем подвергают кристаллизации при медленном охлаждении до 8–10°. Полученные кристаллы отделяют в центрифуге от маточника и высушивают в пневматических сушилках при 30–35°. Готовый продукт содержит не менее 99.5 % лимонной кислоты (в пересчете на моногидрат), зольность – не выше 0.1–0.35 %.

Получение молочной кислоты

Молочная кислота (CH₃СНОНСООН) – органическая одноосновная кислота, образуемая в результате анаэробного превращения углеводов молочнокислыми бактериями. В 1847 г. С. Блодно доказал, что данная кислота является продуктом брожения, а Л. Пастер установил, что этот процесс вызывают бактерии. Образование молочной кислоты из глюкозы возможно несколькими путями. При сбраживании гомоферментными молочнокислыми бактериями:



Второй путь, гетероферментный, включает распад глюкозы до пирувиноградной кислоты и восстановление последней до молочной кислоты:



Для промышленного получения молочной кислоты используют гомоферментные молочнокислые бактерии. У гомоферментных молочнокислых бактерий только 3 % субстрата превращается в клеточный материал: а остальной – трансформируется в молочную кислоту, выход которой достигает до 1.5 %. Теоретически из 1 моля глюкозы должно образоваться 2 моля лактата. На практике эта величина несколько ниже, 1.8 моля, то есть выход продукта от субстрата достигает 90 %.

Применяют молочную кислоту в пищевой промышленности для получения напитков, мармеладов, в процессах консервирования, а также в кормопроизводстве. Соли молочной кислоты используют в фармацевтике.

Промышленное производство молочной кислоты начато в конце XIX века с участием молочнокислых бактерий *Lactobacillus delbrueckii*, *L. leichmannii*, *L. bulgaricus*. Молочнокислое брожение протекает в анаэробных условиях, однако лактобациллы относятся к факультативным анаэробам, поэтому при ферментации воздух полностью не удаляют из фермен-

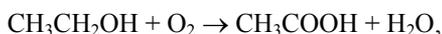
теров. В качестве сырья используют сахарную и тростниковую мелассу и гидролизаты крахмала, при этом концентрация сахаров в исходной среде в зависимости от характера брожения составляет примерно от 5 до 20 %. Используют восстановленные формы азота, сульфаты или фосфаты аммония, а также солод и кукурузный экстракт в качестве источника факторов роста. Возможно использование сульфитного щелока с участием бактерий *L. delbrueckii*. Ферментацию проводят в глубинной культуре при pH 6.3–6.5 и строго постоянной температуре 50°C. Длительность процесса составляет до 7–11 суток. В ходе процесса брожения для коррекции изменяющегося pH в культуру вносят мел, 3–4 раза в течение суток. Конечная концентрация образующегося лактата кальция составляет 10–15 %, остаточная концентрация сахаров – 0.5–0.7 %.

На стадии получения готового продукта культуральную среду нагревают до 80–90°, затем нейтрализуют гашеной известью до слабощелочной реакции. После отстаивания в течение 3–5 ч взвешенные частицы декантируют. После этого раствор лактата кальция подают на фильтр-пресс. Фильтрат упаривают до концентрации 27–30 %, охлаждают до 25–30° и подвергают кристаллизации. Промытый лактат кальция отделяют центрифугированием и подвергают расщеплению серной кислотой при 60–70°. Сырую молочную кислоту 18–20 % концентрации упаривают в несколько этапов в вакуум-выпарных аппаратах до 70 % концентрации. Отфильтрованную кислоту после фильтр-пресса подают на розлив с внесением небольших количеств мела, при этом около 10 % кислоты превращается в кристаллический лактат, который связывает молочную кислоту.

Получение уксусной кислоты

Уксусная кислота (CH₃COOH) – широко используется в пищевой, химической, микробиологической промышленности, в медицине. Получение уксусной кислоты из спиртосодержащих жидкостей было известно более 10 тыс. лет назад. В те времена древние греки и римляне использовали уксус в качестве освежающего напитка и получали, главным образом, оставляя вино открытым. В больших масштабах уксус долго получали в плоских открытых бочках, в которых пленка бактерий плавала на поверхности. В XIX веке поверхностные процессы стали заменять более эффективными. Так, был разработан процесс в струйном генераторе. В середине XX века появились глубинные процессы ферментации. Усовершенствованный генератор Фрингса используется в настоящее время.

Уксуснокислое брожение основано на способности уксуснокислых бактерий окислять спирт кислородом воздуха с участием алкогольдегидрогеназы в уксусную кислоту:



при этом из 1 моля этанола образуется моль уксусной кислоты, а из 1 л 12 об. % спирта получается 12.4 весовых % уксусной кислоты.

Данный процесс могут реализовать многие бактерии, но в промышленных технологиях для получения уксуса используют уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter*, интерес представляют также бактерии *Glucanobacter*. Большую часть уксуса получают, используя разведенный спирт. В настоящее время процесс реализуют как поверхностным, так и глубинным способом. Поверхностный режим протекает в струйных генераторах, наполненных древесной стружкой, объемом до 60 м³. Исходный питательный раствор с бактериями распыляют по поверхности стружек, и он стекает, собираясь в нижней части аппарата. После этого жидкость собирают и вновь закачивают в верхнюю часть аппарата. Процедуру повторяют 3–4 раза, в результате в течение 3-х дней до 90 % спирта трансформируется в ацетат. Этот старый способ протекает более эффективно и равномерно в генераторах Фрингса с автоматическим поддержанием температуры и принудительной подачей воздуха. По такой технологии производят до 400 млн л уксусной кислоты в год.

Современные промышленные процессы получения уксуса реализуют в глубинной культуре в специальных аэрационных аппаратах с термостабилизацией и механической системой пеногашения. Скорость аэрации составляет 3.4 м³/м³·ч., вращение ротора – 1500 об./мин., температура 30°C. Исходная инокулируемая смесь содержит этанол и уксусную кислоту, соответственно, около 5 и 7 %; конечная концентрация уксуса через 1.5 суток составляет 12–13 %. Процесс – полупроточный, отливоно-доливный. Каждые 30–35 часов до 60 % культуры заменяют на свежее суло. При глубинной ферментации выход продукта на 1 м³ в 10 раз выше по сравнению с поверхностной ферментацией. К началу 90-х гг. таким способом производили до 715 млн. литров 10 % уксусной кислоты в год.

Разработан и реализован эффективный непрерывный способ получения уксусной кислоты в батарее последовательно работающих ферментеров (обычно 5 аппаратов). Температура культивирования составляет 28° для *Acetobacter* и 35° при использовании в качестве продуцента культуры *Bact. schutzenbachii*. Наилучшим сырьем для процесса является этиловый спирт, полученный из зерно-картофельного сырья, при его концентрации около 10 %. Оптимум рН для развития бактерий – около 3. При увеличении содержания уксусной кислоты в культуре свыше 8 % рост бактерий замедляется, при 12–14 % прекращается. Поэтому процесс проводят в батарее последовательно соединенных аппаратов. Первый выполняет роль инокулятора, поэтому в него непрерывно подают свежую среду и поддерживают условия, оптимальные для быстрого образования биомассы бактерий. Культура из первого аппарата поступает во второй аппарат и далее – в последующие, при этом транспортировка культуральной жидкости осуществляется воздухом. В каждом аппарате условия ферментации стабилизируются в соответствии с требованиями течения хода ферментации, при постепенном понижении температура среды от 28° в первом аппарате

до 25° – в последнем. Режим аэрации также изменяется, от 0.4 до 0.15 м³/м³ мин. Концентрация спирта со второго по четвертый аппарат стабилизируется на требуемом уровне подачей в них среды с 40 % этанолом. Из последнего аппарата выводится культуральная жидкость с содержанием ацетата не ниже 9.0 и не выше 9.3 %. Выход кислоты составляет до 90 кг из 100 л безводного спирта.

На постферментационной стадии после отделения бактериальной биомассы раствор уксуса фильтруют, освобождая от окрашенных и взвешенных частиц, и далее подвергают пастеризации. Для повышения концентрации исходные растворы вымораживают до 20–30 %. Дальнейшее концентрирование до получения ледяной уксусной кислоты (98.0–99.8 %), проводят методом перегонки.

Получение пропионовой кислоты

Пропионовая кислота (СН₃СН₂СООН) синтезируется грамположительными пропионовокислыми бактериями (*Propionibacterium*), используется в химико-фармацевтической промышленности, при получении косметических средств, в качестве фунгицида для сохранения зерна.

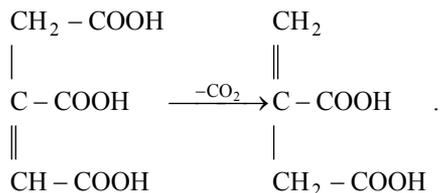
Химизм образования пропионовой кислоты заключается в следующем: пировиноградная кислота при участии биотина и углекислоты карбоксилируется в шавелевоуксусную, которая через яблочную и фумаровую кислоты восстанавливается до янтарной кислоты. Янтарная кислота при участии АТФ и КоА превращается в сукцинил-КоА, последний под воздействием метилмалонил-КоА-изомеразы и при участии кофермента В12 превращается в метилмалонил-КоА. В результате карбоксилирования метилмалонил-КоА расщепляется с образованием свободного КоА и пропионовой кислоты.

Среди промышленных штаммов-продуцентов – бактерии *Pg. Arabinosum*, *Pg. shermanii*, *Pg. rubrum* и др. В качестве субстрата брожения бактерии используют различные сахара (лактозу, глюкозу, мальтозу, сахарозу, органические кислоты – яблочную и молочную). Получают пропионовую кислоту в глубинной аэробной культуре на средах, содержащих (%): сахара 2, органический азот 0.4 (источник – дрожжевой экстракт), соли молочной кислоты. Процесс реализуется за 12 суток при 30° и рН 6.8–7.2; при этом свыше 70 % сахаров трансформируется в органические кислоты, на образование углекислоты расходуется менее 20 % углеродного субстрата.

Получение итаконовой кислоты

Итаконовая кислота (С₅Н₆О₄) – ненасыщенная двухосновная кислота; ее образование плесневыми грибами открыл в 1931 г. Киношита. Данная кислота – важный промежуточный продукт для получения полимеров. Итаконовая кислота образует сополимеры с эфирами и другими мономерами, поэтому используется при производстве синтетических волокон и смол, ряда адгезивных средств, ПАВ, красителей и других сложных органических соединений.

Синтез итаконовой кислоты связан с реакциями цикла Кребса; ее исходным продуктом является цис-аконитовая кислота, которая при декарбоксилировании в результате перемещения электронов и перехода двойной связи из положения 2.3 в положение 3.4 превращается в итаконовую кислоту:



Получение итаконовой кислоты осуществляют поверхностным и глубинным методами ферментации. В качестве продуцентов используют отселектированные грибные штаммы (*Aspergillus itaconicus*, *Asp. terreus*). Процесс аналогичен процессам получения лимонной кислоты. Среды содержат высокие концентрации сахаров, обычно используют мелассу, при дефиците фосфора и железа. Особенностью процесса получения данной кислоты является высокая потребность продуцента в солях цинка, магния и меди. При поверхностной ферментации в течение 10–12 суток образуется около 60 % продукта в пересчете на сахар, доля целевой кислоты в смеси (синтезируются также янтарная, щавелевая и фумаровая кислоты) – свыше 90 %. Содержание итаконовой кислоты достигает 15–20 %, остаточная концентрация сахаров не превышает 0.6 %. В отличие от лимонной, итаконовая кислота – токсичный продукт, при ее концентрации около 7 % рост продуцента угнетается, и скорость продукции кислоты снижается. Токсичность итаконовой кислоты нейтрализуют дробными добавками гидроксиаммония, pH среды при этом стабилизируется на уровне 3.5–3.8. При глубинной ферментации конечная концентрация итаконовой кислоты ниже, 4–6 %. Товарный продукт – кристаллическая итаконовая кислота 92 % содержания, остальное – влага (3–6 %) и другие кислоты (1–3 %).

Получение глюконовой кислоты

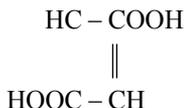
Глюконовая кислота – одноосновная пентокислота, получаемая при ферментативном окислении глюкозы с участием глюкозооксидазы. Глюконовая кислота имеет много областей применения. Комплексообразователь с металлами – глюконат натрия, применяют при производстве моющих средств; кальций-, железо- и калийные соли глюконовой кислоты широко используют в медицине и пищевой промышленности.

Продуценты глюконовой кислоты – грибы (*Penicillium*, *Aspergillus*). Ферментацию в промышленных масштабах осуществляют поверхностным и глубинным способами; используют среды с высоким (до 30–35 %) содержанием глюкозы, в составе сред – сульфат магния, фосфат калия, источник азота, а также углекислый кальций. Процесс завершается при оста-

точной концентрации сахара около 1 %. Готовый продукт – кристаллические соли – глюконаты.

Получение фумаровой кислоты

Фумаровая кислота – транс-изомер этилен-дикарбоновой кислоты:



используется при производстве синтетических смол, красок, лаков. Смолы фумаровой кислоты применяют для производства печатных красок. Магниево- и натриевые соли фумаровой кислоты используют в медицине.

Фумаровая кислота – метаболит цикла трикарбоновых кислот и присутствует во всех живых клетках, однако редко экскретируется в среду. Продуцентами данной кислоты являются различные грибы (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*), последние наиболее активны. Среды для получения фумаровой кислоты содержат глюкозу в концентрации 5–10 %, лимитирующий фактор – азот, цинк. Ферментация реализуется в условиях интенсивной аэрации поверхностным или глубинным способом. При этом в ходе ферментации проводят нейтрализацию среды углекислым кальцием или раствором щелочи. Максимальный выход кислоты – 58 % от потребленной глюкозы.

Биотехнологические методы получения органических кислот совершенствуются. Недавно в Японии разработан способ получения 2-кетоглюконовой кислоты на основе биосинтеза бактерий *Pseudomonas*, выход кислоты достигает 90 % от использованного сахара. Разработана технология получения щавелевой кислоты на средах с сахарами на основе грибов *A. ozyzae*. На основе селективированных штаммов дрожжей (*Candida lipolytica*) созданы технологии получения лимонной и изолимонной кислот. Специально отселектированные штаммы дрожжей рода *Candida* синтезируют на средах с нормальными парафинами фумаровую, яблочную, янтарную кислоты. Процесс на данном сырье постоянного состава более стабилен, чем на комплексных природных средах на основе мелассы; также упрощается стадия выделения и очистки готового продукта.

2.4. ВИТАМИНЫ

Витамины – это низкомолекулярные органические вещества, способные в очень низких концентрациях оказывать сильное и разнообразное действие. Природным источником многих витаминов являются растения и микроорганизмы. В настоящее время в производстве многих витаминов ведущие позиции принадлежат химическому синтезу, однако при производстве отдельных витаминов микробный синтез имеет огромное значение, например при производстве кормовых препаратов витаминов. Отдельные витамины, кобаламины, менахиноны продуцируются только мик-

робными клетками. Витамины принимают активное участие во многих процессах метаболизма человека и высших животных (процессы цикла трикарбоновых кислот, распад и синтез жирных кислот, синтез аминокислот и др.), оказывая влияние на разнообразные физиологические процессы.

Микробиологическим путем получают некоторые витамины группы В, а также эргостерин и каротин, являющиеся, соответственно, предшественниками витаминов D₂ и провитамина А.

Получение витамина В₁₂

Витамин В₁₂ – (α-5,6-диметилбензимидазол)-цианкобаламин – полимер сложного строения, являющийся гематопоэтическим и ростовым фактором для многих животных и микроорганизмов. Микробиологический синтез является единственным способом получения данного витамина. Способность к синтезу данного витамина широко распространена среди прокариотических микроорганизмов. Активно продуцируют витамин В₁₂ *Propionibacterium*, а также *Pseudomonas* и смешанные культуры матанообразующих бактерий. Получение витамина на основе пропионовокислых бактерий, способных к самостоятельному синтезу аденозилкобаламина 5,6 ДМБ (коэнзима В₁₂), осуществляется в две стадии в двух последовательных аппаратах объемом 500 л при коэффициенте заполнения 0.65–0.70. Первую стадию культивирования проводят в течение 80 ч и слабом перемешивании в анаэробных условиях до полной утилизации сахара; полученную биомассу центрифугируют. Сгущенную суспензию инкубируют во втором аппарате еще в течение 88 ч, аэрируя культуру воздухом (2 м³/ч). Среда содержит сахара (обычно глюкозу 1–10 %), добавки солей железа, марганца, магния и кобальта (10–100 мг/л), кукурузный экстракт (3–7 %). В качестве источника азота принят (NH₄)₂SO₄. Ферментацию проводят при 30°C, рН стабилизируют на уровне 6.5–7.0 подтитровкой культуры раствором (NH₄)OH. На второй стадии происходит образование ДМБ. После завершения ферментации витамин экстрагируют из клеток, нагреванием в течение 10–30 минут при 80–120°C. При последующей обработке горячей клеточной суспензии цианидом происходит образование CN-кобаламина; продукт сорбируют, пропуская раствор через активированный уголь и окислы алюминия; затем элюируют водным спиртом или хлороформом. После выпаривания растворителя получают кристаллический витамин. Выход В₁₂ составляет до 40 мг/л.

Активными продуцентами В₁₂ являются бактерии рода *Pseudomonas*. Разработаны эффективные технологии на основе термофильных бацилл *Bacillus circulans*, в течение 18 ч при 65–75°C в нестерильных условиях. Выход витамина составляет от 2.0 до 6.0 мг/л. Бактерии выращивают на богатых средах, приготовленных на основе соевой и рыбной муки, мясного и кукурузного экстракта. Продукция В₁₂ для медицины составляет около 12 т/г; форма выпуска – стерильный раствор CN-В₁₂ на основе 0.95-го

раствора NaCl и таблетки витамина в смеси с фолиевой кислотой или другими витаминами. Для нужд животноводства витамин В₁₂ получают на основе смешанной ассоциации термофильных метаногенных бактерий. Ассоциация состоит из 4-х культур, взаимосвязанно расщепляющих органический субстрат до СО₂ и СН₄: углеводсбраживающих, аммонифицирующих, сульфатовосстанавливающих и собственно метанообразующих бактерий. В качестве субстрата используют декантированную ацетонобутиловую барду, содержащую 2.0–2.5 % сухих веществ. Брожение проходит при 55–57°С в нестерильной культуре в две фазы: на первой образуются жирные кислоты и метан, на второй – метан, углекислота и витамин В₁₂. Длительность процесса в одном аппарате составляет 2.5–3.5 суток, в двух последовательных – 2–2.5 суток. Концентрация витамина в бражке достигает 850 мкг/л. Параллельно в значительных количествах, до 20 м³/м³ образуется газ (65 % метана и 30 % углекислоты). Бражка имеет слабощелочную реакцию. Для стабилизации витамина ее подкисляют соляной или фосфорной кислотой, затем в выпарном аппарате сгущают до 20 % содержания сухих веществ и высушивают в распылительной сушилке. Содержание В₁₂ в сухом препарате – до 100 мкг/г.

Получение витамина В₂

Витамин В₂ (рибофлавин) получил свое название от сахара рибозы, входящего в состав молекулы витамина в виде многоатомного спирта D-рибита. Широко распространен в природе и в значительных количествах синтезируется растениями, дрожжами, грибами, бактериями. Животные, не синтезирующие этот витамин, должны получать его в составе комбикормов. При дефиците рибофлавина в организме нарушаются процессы белкового обмена, замедляется рост. Препараты рибофлавина используют в медицине для лечения ряда заболеваний, а в животноводстве – в качестве добавки в корма. Микроорганизмы синтезируют рибофлавин и две его коферментные формы – ФАД и ФМН. продуцентами витамина являются бактерии (*Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamaticus*), дрожжи (*Candida guilliermondii*, *C. flaveri*), микроскопические (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*) и плесневые грибы (*Aspergillus niger*).

Промышленное получение рибофлавина осуществляется химическим синтезом, микробиологическим и комбинированным: при этом синтезируемая микроорганизмами рибоза химически трансформируется в В₂.

Для медицинских целей микробиологический рибофлавин получают на основе гриба *Aspergillus*. Для высоких выходов витамина (до 7 г/л) используют усовершенствованные штаммы и оптимизированные среды, содержащие (в %): кукурузный экстракт – 2.25, пептон – 3.5, соевое масло – 4.5 и стимуляторы (пептоны, глицин). Используют активный инокулят, которым засевают стерильную среду. Ферментацию проводят в течении 7 суток при 28°С и хорошей аэрации (0,3 м³/м³-мин.). Исходный рН составляет около 7.0, в ходе ферментации в связи с выделением кислот среда

подкисляется до pH 4.0–4.5. После утилизации углеродного субстрата продуцент начинает утилизировать кислоты; pH повышается и после этого начинается образование витамина В₂. При этом кристаллы рибофлавина накапливаются в гифах и вне мицелия. На постферментационной стадии для выделения витамина мицелий нагревают в течение 1 ч при 120°C.

В ряде стран для получения кормовых препаратов витамина В₂ используют достаточно простой способ на основе микроскопического гриба *Eremothecium ashbyii*, который выращивают в глубинной культуре в течение 80–84 ч при 28–30°C на среде с глюкозой или мальтозой (2.5 %), источником азота в виде NH₄NO₃ и карбонатом кальция (0.5 %). Выход рибофлавина составляет 1250 мкг/мл. Культуральная жидкость концентрируется в вакуумной выпарке до содержания сухих веществ 30–40 % и высушивается в распылительной сушилке. Товарная форма продукта – порошок с содержанием рибофлавина не менее 10 мг/г и 20 % сырого протеина, в препарате присутствуют никотиновая кислота и витамины В₁, В₃, В₆ и В₁₂. Полученный генноинженерным методом штамм *Bacillus subtilis* образует за 35 суток ферментации до 4 г/л рибофлавина.

Получение эргостерина

Эргостерин – (эргоста-5,7,22-триен-3β-ол) – исходный продукт производства витамина D₂ и кормовых препаратов дрожжей, обогащенных этим витамином. Витамин D₂ (эргокальциферол) образуется при облучении ультрафиолетом эргостерина, который в значительных количествах синтезируют бурые водоросли, дрожжи, плесневые грибы. Наиболее активные продуценты эргостерина – *Saccharomyces*, *Rhodotoryla*, *Candida*.

В промышленных масштабах эргостерин получают при культивировании дрожжей и мицелиальных грибов на средах с избытком сахаров при дефиците азота, высокой температуре и хорошей аэрации. Более интенсивно эргостерин образуют дрожжи рода *Candida* на средах с углеводородами. При получении кристаллического препарата витамина D₂ культивируют плесневые грибы (*Penicillium*, *Aspergillus*). Для получения кормовых препаратов облучают суспензию или сухие дрожжи (*Candida*). Облучают тонкий слой 5 % суспензии дрожжей ультрафиолетовыми лампами с длиной волны 280–300 нм. Кормовые препараты дрожжей содержат в 1 г АСВ 5000 Е витамина D₂ и не менее 46 % сырого белка. Для получения кристаллического препарата витамина дрожжи или грибной мицелий подвергают кислотному гидролизу при 110°C. Витамин экстрагируют спиртом, фильтруют, далее фильтрат упаривают, несколько раз промывают спиртом. Спиртовый экстракт сгущают до 50 % концентрации сухих веществ, омыляют щелочью. Полученные кристаллы витамина очищают перекристаллизацией и сушат в эфире, отгоняя последний. Кристаллический осадок растворяют в масле. Данный препарат используют в медицинских целях. Эргостерин является также исходным продуктом для по-

лучения ряда стероидных гормонов, пищевых и лекарственных препаратов.

2.5. БИОПОЛИМЕРЫ

Термин «биополимеры» относится ко многим высокомолекулярным соединениям (полисахаридам, липидам, полиоксикалкоанатам), которые являются для клеток резервными веществами и синтезируются в специфических условиях несбалансированного роста. Такими условиями, как правило, являются избыток углеродного и энергетического субстратов в среде и дефицит отдельных минеральных элементов (азота, фосфора, серы, магния и т.д.), лимитирующих синтез азотсодержащих компонентов и скорость роста клеток. Многие микробные биополимеры являются эндогенным источником углерода и энергии, поэтому способствуют сохранению выживаемости клеток в неблагоприятных условиях среды.

Полисахариды

Полисахариды (гликаны) – полимеры, построенные не менее чем из 11 моносахаридных единиц. Полисахариды являются обязательным компонентом всех организмов, присутствуют как изолированно, так и в комплексах с белками, липидами, нуклеиновыми кислотами. Полисахариды преобладают в растительных биомассах и составляют, следовательно, большую часть органического материала на планете. Полисахариды разнообразны по строению, локализации в клетках и, естественно, по своим физико-химическим свойствам. Особенно разнообразны полисахариды, синтезируемые микроорганизмами. Микробные полисахариды делятся на внутриклеточные, локализованные в цитоплазме, и внеклеточные – полисахариды слизи, капсул, чехлов. Многие полисахариды биологически активны и повышают устойчивость макроорганизмов к вирусной и бактериальной инфекциям, обладают противоопухолевым действием, а также антигенной специфичностью. Поэтому они находят все более широкое применение в медицине и фармацевтической промышленности в качестве диагностикумов, заменителей плазмы крови и пр. Чрезвычайно широки перспективы применения полисахаридов в связи с их гелеобразующими и реологическими свойствами в качестве загустителей сиропов и косметических средств, для упаковки продуктов и протравливания семян. Водные растворы отдельных полисахаридов чрезвычайно стабильны в широких интервалах pH и температуры, поэтому находят применения при добыче нефти и газа; флокулирующие свойства гликанов используют в процессах очистки, концентрирования и разделения металлов. Возможности полисахаридов раскрыты далеко не полностью, поэтому их изучение ведет к расширению сферы применения.

Большинство микроорганизмов синтезируют полисахариды из разнообразных источников углерода, обеспечивающих их рост, – углеводов, спиртов, карбоновых кислот, C₁-соединений. Природа и концентрация углеродного источника в среде существенно влияет на образование полисахаридов, которое сводится к созданию гликозидной связи между моносахаридными единицами (рис. 2.5); при этом гликозильный донор передает гликозил на акцептор-затравку, высвобождаясь при этом. Акцепторами служат олигосахара и недостроенные полисахариды. Часто первичным акцептором служат олигосахара, в ряде случаев – недостроенный полисахарид – «затравка». Полимеризация идет до образования готового полисахарида с участием специфических гликозилтрансфераз, которые отщепляют фрагменты линейной цепи недостроенного гликана и переносят их на ту же или аналогичную цепь в определенном положении.

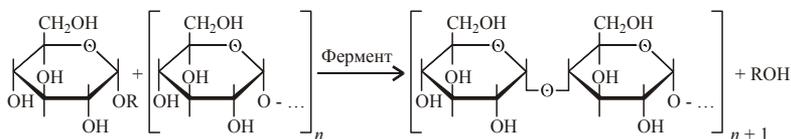


Рис. 2.5. Схема образования гликозидной связи.

Синтез полисахаридов определяется условиями культивирования продуцента и составом питательной среды, которые определяют возможность и интенсивность их образования, а также состав, структуру и, следовательно, свойства. Существенное значение имеют не только качественный состав используемого углеродного сырья, но также и концентрация, так как эффективный синтез полисахаридов осуществляется на средах с высоким содержанием углеродного субстрата. Количество и форма источника азота, не влияя на состав полисахаридов, оказывает влияние на скорость роста микроорганизмов и количественных выход полисахаридов. Существенна также роль фосфатов и ионов марганца, магния, кальция, являющихся кофакторами синтеза полисахаридов. Разнообразно и специфично влияние pH и температуры среды на накопления гликанов. Существенен хороший уровень аэрации культуры. Производство полисахаридов специфично для каждого и определяется природой, локализацией, свойствами, а также областью применения гликанов и, безусловно, физиологическими особенностями продуцента. Получение экзополисахаридов эффективнее внутриклеточных, так как их концентрация выше, меньше проблем на стадии выделения и очистки, однако в ходе ферментации возникают трудности с транспортом кислорода из газовой фазы в жидкую (при повышении экскреции гликанов в среду ее вязкость возрастает). Следствием этого становятся снижение роста клеток и торможение продукции полисахари-

Промышленные микробные полисахариды (по Gruger, Gruger, 1984)

Полисахарид	Продуцент
Ксантан	<i>Xanthomonas campestris</i>
Альгинат	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>
Курдлан	<i>Alcaligenes</i>
Склероглюкан	<i>Sclerotium glucanicum</i> , <i>S. delphinii</i> , <i>S. rolfsii</i>
Пуллан	<i>Pullularia pullulans</i>
Декстран	<i>Acetobacter</i> sp., <i>Leuconostac mesenteroides</i> , <i>L. dextransicum</i> , <i>Streptococcus mutans</i>

дов. Поэтому среду приходится разбавлять в десятки раз и после удаления клеток продуцента – концентрировать.

Спектр промышленных продуцентов и выпускаемых полисахаридов весьма разнообразен (табл. 2.3). Ведущими странами – производителями полисахаридов являются: США, Франция (ксантан, курдлан), Россия (декстран), Япония (пуллан, курдлан).

Технология получения декстранов

Продуцентами декстранов являются штаммы *Leuconostac mesenteroides*, растущие на средах с высоким содержанием сахарозы (10–30 %), декстраном-«затравкой», дрожжевым экстрактом и минеральными солями. В зависимости от состава минеральных солей и той или иной природы «затравки» синтезируются высокомолекулярные (60–80 тыс.) линейные или имеющие низкую молекулярную массу (20–30 тыс.) разветвленные декстраны. Последние обладают наибольшей биологической активностью. Из декстранов выпускают плазмозаменители (клинический декстран, полиглюкин, плазмодекс, хемодекс и др.).

Типичный пример ферментации – глубинная периодическая культура, реализуемая на первом этапе с целью образования биомассы продуцента при избытке сахаров и pH 6.5–8.0. Синтез декстрансахаразы, ведущий к образованию гликанов, наиболее интенсивен при pH около 7.0. Помимо ионов магния синтез декстранов стимулируется при замене сахарозы мелассой. Бактерии расщепляют сахарозу с образованием глюкозы и фруктозы. Последняя обрабатывается по гетероферментному пути с образованием молочной и уксусной кислот, маннита и углекислоты. Глюкоза быстро полимеризуется в декстран. Процесс завершается через 24 ч. Выделение декстрана из культуры проводят метанолом, для последующей очистки – многократно растворяют в воде, переосаждают метанолом и фракционируют. Декстрансахараза является экзоферментом, и ее концентрация в культуральной среде значительна. Поэтому возможен процесс получения полисахарида на основе растворимого фермента. Культуральная жидкость

с декстрансахаразой при рН около 5.0 и 15°C способна около месяца проявлять высокую ферментативную активность. Реализован процесс на основе культуральной среды с ферментом, содержащей сахарозу и декстран-«затравку», – процесс полимеризации завершается в течении 8 ч. Этот способ значительно упрощает процедуру ферментации и стадию выделения и очистки декстрана и позволяет в контролируемых условиях получать продукт заданной молекулярной массы. Перспективы имеет также процесс на основе иммобилизованной декстрансахаразы. В середине 90-х гг. начат выпуск конъюгатов модифицированного декстрана с ферментом стрептокиназой. Препарат представляет собой пролонгированную декстраном форму стрептокиназы.

Ксантан

Ксантан, продуцируемый бактериями *Xanthomonas campestris*, обладает уникальными реологическими свойствами. В низких концентрациях он образует очень вязкие растворы и обладает псевдопластичностью; его растворы не изменяют свои реологические свойства при изменении температуры, рН, солености в широких пределах.

Ксантан применяют в пищевой промышленности, при изготовлении гелевых дезодорантов, зубной пасты, при суспендировании сельскохозяйственных химикатов, используют при добыче нефти. Объемы производства ксантана – наиболее крупнотоннажны из всех других гликанов. Товарное название выпускаемого продукта (ксантан, келцан, келтрол).

Получают ксантаны в условиях периодической глубинной культуры на средах, содержащих 1–5 % углеводов (кукурузный крахмал, сахар-сырец или меласса), а также органические соединения азота, двузамещенный фосфорнокислый калий, микроэлементы. Ферментация длится в течение 3 суток при 28°C и рН 6.5–7.2 в две фазы: на первой реализуется рост клеток и накопление биомассы, на второй при дефиците азота в среде происходит образование полисахарида. Осаждают полисахарид из культуральной жидкости метанолом, полученный осадок высушивают.

Альгинат

Данный полисахарид ранее выделяли из морской водоросли *Laminaria*. Альгинат обладает в определенных условиях прекрасными гелеобразующими, а также псевдопластическими свойствами в широком диапазоне рН и температур, и используется в кондитерской и фармацевтической промышленности. Установлено, что альгинат является лучшим носителем для иммобилизации ферментов и, особенно, целых клеток. Сравнительно недавно среди бактерий идентифицированы продуценты полисахарида, близкого альгинату (*Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii*). Процесс реализован в промышленности на средах с избытком углерода. Варьируя концентрацию фосфата в среде, можно влиять на молекулярную массу синтезируемого полимера, а при изменении концентрации кальция из-

меняется соотношение моносахаридов, входящих в состав данного гликана, следовательно, и его свойства.

Курдлан

Бактерии *Alcaligenes faecalis* штамм 10С3 синтезируют курдлан, представляющий собой полимер глюкозы. Важные свойства данного полисахарида – образование термически необратимых гелей. При нагревании свыше 64°C происходит гелеобразование курдлана; прочность геля не изменяется в диапазоне температур 60–80° и существенно возрастает при увеличении температуры свыше 120°, при этом одиночная спираль переходит в тройную. Курдлан нерастворим в холодной воде.

Курдлан обладает противоопухолевой активностью, поэтому находит применение в медицине. Ацетильные производные курдлана применяют в качестве основы ультрафильтрационных полупроницаемых мембран для разделения веществ с молекулярной массой 200–2000. Ферментация протекает в глубинной периодической культуре в течение 80 ч на средах, содержащих 8 % глюкозы; выход полисахарида составляет около 40 г/л. В связи с привлекательностью свойств данного продукта технология его получения интенсивно совершенствуется.

Пуллан

Полисахарид продуцируется дрожжеподобным грибом *Aerobasidium pullulans* на средах, содержащих 50 % глюкозы в течение 80–100 ч. Вязкость пуллана зависит от pH среды: она минимальна при pH 4.0, молекулярная масса при этом составляет около 200 тыс., при увеличении pH молекулярная масса возрастает. Пуллан используют в качестве биоразрушаемого упаковочного материала для пищевых продуктов; он обладает также антиокислительными свойствами.

Склероглюкан

Склероглюкан (товарное название – политран) синтезируют грибы рода *Sclerotium*. Синтез данного полисахарида в отличие от большинства других максимален в ранней лог-фазе 48-ч культуры. Процесс разработан на средах с глюкозой, в том числе в проточном режиме, выход полисахарида от ассимилированной глюкозы составляет 50 %. В низких концентрациях (1.5 % растворы) образует в воде прочные гели, которые не изменяют свои свойства в широком интервале температур. Используют в качестве покрытия семян, пестицидов, а также при производстве латексов и красителей.

Задачей биотехнологии является совершенствование микробиологических процессов получения полисахаридов на основе улучшенных штаммов-продуцентов при расширении сырьевой базы за счет замены дорогостоящих сахаров более доступными субстратами, а также модификация физико-химических свойств самих гликанов.

Микробные полиоксисалканоаты

Полиоксисалканоаты (ПОА) – биополимеры оксипроизводных жирных кислот, синтезируются многими прокариотическими микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста при избытке углеродного и энергетического субстрата в среде и дефиците минеральных элементов (азота, серы, фосфатов и др.), а также кислорода. Среди наиболее перспективных продуцентов ПОА – *Azotobacter*, *Bacillus*, *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*.

Наиболее изученным в настоящее время является полиоксибутират – полимер β-оксисалканоатной кислоты ($C_4H_8O_2$). Молекулярная масса полимера определяется условиями синтеза полимера, спецификой продуцента, а также процедурой экстракции полимера из биомассы. Помимо полиоксибутирата, микроорганизмы способны синтезировать гетерополимерные ПОА – сополимеры оксибутирата и оксивалерата, оксибутирата и оксигексаноата, полиоксибутирата и полиоксигептаноата и др. а также трех-, четырех- и более компонентные полимеры. Таким образом, химический состав и, как установлено в последние два-три года, отдельные физико-химические свойства (молекулярный вес, кристалличность, температурные характеристики, скорости биодеградации, механическая прочность) могут существенно варьировать. Это открывает пути для получения в будущем полимерных материалов с заданными свойствами.

Практический интерес и значимость данных исследований определяются свойствами полиоксисалканоатов, которые по своим базовым показателям близки к полипропилену (табл. 2.4), но обладают также рядом уникальных свойств, включая совместимость с животными тканями, оптическую активность, пьезоэлектрические и антиоксидантные свойства и, самое главное, биодеградальность.

Свойства ПОА делают их перспективными для применения в различных сферах: медицине и хирургии (прочный рассасываемый хирургический материал, элементы для остеосинтеза, сосудистой пластики, пленочные покрытия ран и ожоговых поверхностей, одноразовые изделия, в т.ч. нетканые материалы), фармакологии (продлонгация действия лекарственных веществ), пищевой промышленности (предупреждение окислительной порчи напитков и продуктов, упаковочные материалы), сельском хозяйстве (обволакивание семян, покрытие удобрений и пестицидов), радиоэлектронике, коммунальном хозяйстве (различные разрушаемые тара и упаковочные материалы) и пр.

Таблица 2.4

Сравнение свойств полиоксibuтирата (ПОБ) и полипропилена (ПП) (по D. King, 1982)

Свойства	ПОБ	ПП
Температура плавления (°C)	175	176
Прозрачность (%)	80	70
Молекулярный вес (D)	5.10 ⁵	2.10 ⁵
Температура стеклования (°C)	15	-10
Удельный вес (г/см ³)	1.250	0.905
Модуль изгиба (ГПа)	4.0	1.7
Прочность на разрыв (МПа)	40	38
Растяжение на разрыв (%)	6	400
Устойчивость к ультрафиолету	хорошая	плохая
Устойчивость к растворителям	плохая	хорошая

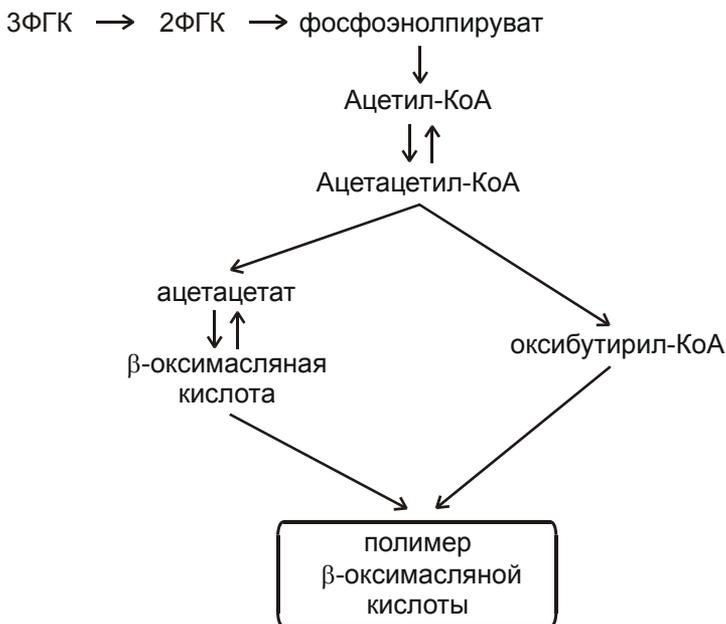
Таблица 2.5

Затраты сырья и выход полиоксibuтирата на различных субстратах (по Collins, 1987)

Субстрат	Цена, долл/т	Выход ПОБ, т/т субстрата	Затраты, долл/т ПОБ
Метанол	110	0.18	610
Этанол	440	0.50	880
Ацетат	370	0.33	1220
Декстроза	360	0.33	1180
Тростниковый сахар	200	0.33	500
Водород	500	1.0	500

Синтез полиоксibuтирата и других ПОА в принципе возможен с использованием различного сырья: сахаров, спиртов, ацетата, а также водорода и углекислоты (табл. 2.5).

Углерод, ассимилированный клетками тем или иным путем, превращается в пируват, который декарбоксилируется с образованием ацетил-КоА. Последний включается в реакции цикла трикарбоновых кислот, и при нарушениях в системах амфиболизма, вызванных дефицитом структурных элементов для синтеза белка, не становится предшественником аминокислот, а подвергается поликонденсации, далее восстанавливается с участием НАДН в реакциях β-окисления в оксимасляную кислоту, которая подвергается полимеризации с образованием полиоксibuтирата:



Процесс накопления полиоксибутирата осуществляют микробные клетки при несбалансированном росте, например, голодающие по азоту или кислороду, то есть медленно растущие. При этом возникает проблема, как получить большие урожаи биомассы с одновременным большим содержанием полимеров. Высокопродуктивные проточные системы ферментации не приемлемы для больших выходов ПОА. Процесс проводят в периодическом режиме, обычно в две стадии, на первой клетки, получая все необходимые питательные вещества, растут с достаточно высокими скоростями роста и образуют практически всю биомассу; на втором этапе процесс продолжается при избытке источников углерода и энергии, но при лимитировании роста одним из биогенов. В результате происходит включение ассимилированных клетками углерода, главным образом, в полимер, выходы которого могут достигать свыше 70 % к весу сухого вещества клетки.

В промышленных масштабах процесс реализован фирмой «Ай-Си-Ай» в Великобритании. В качестве продуцента используют мутантный штамм водородных бактерий *Alcaligenes eutrophus*, способный усваивать глюкозу. Процесс реализуется в периодическом двустадийном режиме при лимите азота в среде с затратами сахаров до 3 т/т полимера в течение 110–120 часов. Объемы применяемых для получения полимера ферментационных аппаратов достигают от 3,5 до 200 м³. Помимо глюкозы, возможно использование тростникового сахара, фруктозных сиропов, мелассы. Товарное название продукта «Биопол». Помимо гомогенного полиоксибути-

рата фирма выпускает гетерополимер – продукт сополимеризации оксипутирата и оксивалерата на средах, содержащих глюкозу и пропанол либо только валериановую кислоту в концентрации до 20 г/л. Получение клеток с высоким содержанием полимера – только одна часть проблемы. Существенной технологической задачей является также процедура экстракции полимера из биомассы и последующая очистка. Важная проблема, возникающая при этом, снижение молекулярной массы продукта в ходе постферментационной стадии. В общем виде процедура включает несколько стадий: отделение клеток от культуральной среды, разрушение клеток, экстракцию полимера из клеток с помощью неполярных растворителей (хлороформ, гексан), осаждение спиртом и высушивание.

На экономику производства микробных полиоксиканоатов существенным образом влияет стоимость исходного сырья, а также выходы полимера и его исходные физико-химические свойства.

В настоящее время полиоксипутират планируется применять в достаточно узких сферах (медицина, фармакология), однако экологичность данного материала по сравнению с неразрушаемыми и получаемыми в экологически тяжелых процессах нефтесинтеза полиолефинов позволяют считать, что микробные ПОА в недалеком будущем смогут стать базовым термопластичным полимером для различных сфер применения. Поэтому процессы получения полиоксипутирата и других гетерополимерных ПОА являются объектом пристального внимания и научных поисков всех развитых стран.

2.6. АНТИБИОТИКИ

Антибиотики (антибиотические вещества) – это продукты обмена микроорганизмов, избирательно подавляющие рост и развитие бактерий, микроскопических грибов, опухолевых клеток. Образование антибиотиков – одна из форм проявления антагонизма. В научную литературу термин введен в 1942 г. Ваксманом, – «антибиотик – против жизни». По Н. С. Егорову: «Антибиотики – специфические продукты жизнедеятельности организмов, их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (бактериям, грибам, водорослям, протозоя), вирусам или к злокачественным опухолям, задерживая их рост или полностью подавляя развитие».

Специфичность антибиотиков по сравнению с другими продуктами обмена (спиртами, органическими кислотами), также подавляющими рост отдельных микробных видов, заключается в чрезвычайно высокой биологической активности. Например, минимальная концентрация эритромицина (0.01–0.25 мкг/мл) полностью подавляет многие грамположительные формы.

Механизмы повреждающих воздействий антибиотиков на клетки различны. Отдельные антибиотики (пенициллины, новобиоцин, цефалоспори-

ны) подавляют процессы образования клеточных стенок; другие (стрептомицин, полимиксины) изменяют проницаемость мембран; третьи (грамидины) подавляют окислительное фосфорилирование; хлорамфеникол подавляет отдельные этапы синтеза белка на рибосомах; азасерин и сарколизин – вызывают нарушения в процессах синтеза нуклеиновых кислот и т.д.

Существует несколько подходов в классификации антибиотиков: по типу продуцента, строению, характеру действия. По химическому строению различают антибиотики ациклического, алициклического строения, хиноны, полипептиды и др. По спектру биологического действия антибиотики можно подразделить на несколько групп:

- антибактериальные, обладающие сравнительно узким спектром действия (пенициллин, эритромицин, грамицидин, бацитрацин), подавляют развитие грамположительных микроорганизмов (стафилококки, стрептококки, пневмококки), и широкого спектра действия (стрептомицин, тетрациклины, неомицин, хлоромидетин), подавляющие как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов (кишечную палочку, дифтерии, брюшной тифа);

- противогрибковые, группа полиеновых антибиотиков (нистатин, гризофульвин и др.), действующие на микроскопические грибы;

- противоопухолевые (актиномицины, митомицин и др.), действующие на опухолевые клетки человека и животных, а также на микроорганизмы.

В настоящее время описано свыше 6000 антибиотиков, но на практике применяется только около 150, так как многие обладают высокой токсичностью для человека, другие – инактивируются в организме и пр.

Антибиотики широко применяются в различных сферах человеческой деятельности: медицине, пищевой и консервной промышленности, сельском хозяйстве. Открытие антибиотиков вызвало переворот в медицине. Широко известно применение антибиотиков с бактерицидным и бактериостатическим действием; благодаря антибиотикам стали излечимыми многие инфекционные заболевания (чума, туберкулез, пневмония, брюшной тиф, холера и т.д.). В течение многих лет антибиотики применяют в сельском хозяйстве в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных животных, средств борьбы с болезнями животных и растений. Антибиотические вещества также широко применяют для борьбы с посторонней микрофлорой в ряде бродильных производств и в консервной промышленности. Однако нельзя не отметить, что длительное и неконтролируемое применение антибиотиков приводит к возникновению и широкому распространению в микробных популяциях R-фактора устойчивости к антибиотикам, передающегося от одной бактериальной клетки к другой при помощи плазмид в процессе конъюгации. Средствами борьбы с проявлением лекарственной устойчивости к антибиотикам является обоснованное и строго контролируемое их применение и получение новых, модифици-

рованных антибиотических препаратов, обладающих биологической активностью к резистентным формам.

Способность синтезировать антибиотики широко распространена среди различных представителей микробного мира. Связи между таксономическим положением микроорганизмов и способностью синтезировать тот или иной антибиотик нет. Так, микроорганизмы, принадлежащие к одной группе, способны синтезировать самые разнообразные по химическому строению и действию антибиотики, и один и тот же антибиотик может продуцироваться различными микроорганизмами. Производителями антибиотиков являются бактерии, актиномицеты, мицелиальные грибы.

Описано около 600 антибиотиков, которые синтезируются бактериями. Эти антибиотики по химическому строению принадлежат к полипептидам и низкомолекулярным белкам. Однако в промышленных масштабах выпускается незначительное число антибиотиков бактериального происхождения. Важнейшими из них являются: грамицидин (*Bacillus brevis*), полимиксины (*Bac. polymyxa*, *Bac. circulans*), бацитрацины (*Bacillus licheniformis*), низины (*Streptococcus lactis*).

Самое большое количество (свыше 70 %) антибиотиков, выпускаемых промышленностью и широко применяемых, синтезируется актиномицетами. Среди них – антибиотики различного химического строения, которые относят к нескольким группам: а) аминогликозиды – стрептомицин (*Streptomyces griseus*), неомицины (*Streptomyces fradiae*, *Str. albogriseolus*), канамицины (*Str. kanamyceticus*), гентамицины (*Micromonospora purpurea*) и др.; б) тетрациклины – хлортетрациклин (*Str. aureofaciens*), окситетрациклин (*Str. rimosus*); в) актиномицины – большая группа близких по строению препаратов, синтезируемых различными микроорганизмами, в том числе (*Streptomyces antibioticus*, *Str. chrysomallus*, *Str. flavus*); г) макролиды – эритромицин (*Streptomyces erythreus*), олеандоимицин (*Str. antibioticus*), магнамицин (*Str. halstedii*), филипин (*Str. filipensis*); д) анзамидины – стрептоварицины (*Str. spectabilis*), рифамицины (*Nocardia mediterranea*), галамицины (*Micromonospora halophytica*), нафтамицин (*Str. collinus*) и др.

Мицелиальные грибы также синтезируют достаточно большое количество антибиотиков (около 1200). Наиболее известны среди них следующие: пенициллины (*Penicillium chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *Aspergillus flavus*, *Asp. nidulans*), цефалоспорины (*Cephalosporium acremonium*), фулалгин (*Aspergillus fumigatus*), гризеофульвин (*Penicillium nigricans*, *P. griseofulvum*), трихоцетин (*Trichothecium roseum*).

Синтез антибиотиков микробными клетками – это специфический процесс обмена веществ, возникший и закрепленный в процессе эволюции организма. Каждый микробный вид способен образовывать один или несколько вполне определенных антибиотических веществ. Выделенные из природных источников, так называемые «дикие» штаммы обладают низ-

кой антибиотической активностью. В промышленности применяют в качестве продуцентов штаммы, которые по сравнению с исходными штаммами обладают повышенной на 2–3 порядка антибиотической активностью. Это достигается, как и во многих других биотехнологических процессах, двумя способами: генетическими усовершенствованиями организмов и оптимизацией условий ферментации.

Антибиотики – это вторичные продукты обмена микроорганизмов, (идиолиты). Характерной особенностью развития продуцентов антибиотических веществ является ярко выраженная двухфазность: в первой фазе развития микроорганизмов происходит накопление биомассы, во второй – синтез антибиотика. При этом очень важно создать условия ферментации, адекватные этой двухфазности с учетом ингибирующего действия антибиотика как продукта обмена на продуцент.

Нельзя не отметить, что создание промышленности антибиотиков является крупнейшим достижением биологии нашего столетия. Организация этого производства потребовала коренных преобразований существующей микробиологической промышленности: при этом были решены вопросы обеспечения строжайших условий стерильности в ходе всех стадий биотехнологического процесса, разработаны и созданы эффективная аппаратура с высокими газо-динамическими характеристиками, средства борьбы с сильным пенообразованием, методы получения стерильных препаратов антибиотиков высокой степени чистоты. Распространение этих достижений и применение их в других, сложившихся биотехнологических процессах, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов, сыграло решающую роль в становлении современной биотехнологии в целом.

В процессах производства антибиотиков очень большое значение имеет правильный выбор состава питательной среды. В зависимости от природы используемого микроорганизма в качестве источника углерода возможно применение различных субстратов. Например, для получения пенициллина лучшим источником углерода и энергии является глюкоза и лактоза; грамицидина – глицерин и соли янтарной кислоты; стрептомицина и неомицина – глюкоза. При разработке состава среды для каждого отдельного продуцента индивидуально подбирают не только тип углеродного субстрата, но и его концентрацию. В качестве источника азота многие продуценты антибиотиков используют восстановленные формы (аммоний и аминокислоты), однако некоторые предпочитают нитраты. Когда источник азота должен присутствовать в виде готовых аминокислот, полипептидов или белков, используют пшеничную и кукурузную муку, экстракты дрожжевой биомассы. Большое значение имеет также концентрация в среде фосфора, а также других минеральных элементов (серы, марганца, железа, кобальта и др.). В ряде случаев существенного увеличения выхода антибиотического вещества достигают в результате внесения в среду предшественников синтеза конкретного антибиотика. В связи с ин-

тенсивным пенообразованием, сопровождающим процесс синтеза антибиотиков, в состав среды вводят пеногасители (растительные и животные жиры, минеральные масла).

Помимо состава среды, большое влияние на выход антибиотиков оказывают другие физико-химические факторы среды: pH, температура, обеспечение кислородом, которые подбираются и задаются индивидуально для каждого продуцента.

На предферментационной стадии получают инокулят из музейной культуры и готовят питательную среду. После стерилизации технологического оборудования и среды в ферментер вносят требуемое количество инокулята и начинают процесс ферментации. В промышленности используют аппараты различной емкости, от 500 л до 100 м³ и более. В ходе ферментации культура непрерывно аэрируется стерильным подогретым воздухом. Температура среды, pH и ряд других параметров автоматически регулируются в соответствии с регламентом производства конкретного антибиотика.

Процесс ферментации осуществляется в строго стерильной, глубокой, аэробной и периодической культуре и носит выраженный двухфазный характер (рис. 2.6). Первая фаза сбалансированного роста (тропозафаза) характеризуется быстрым накоплением биомассы продуцента на фоне истощения углеродного субстрата, а также азота, фосфатов и др.

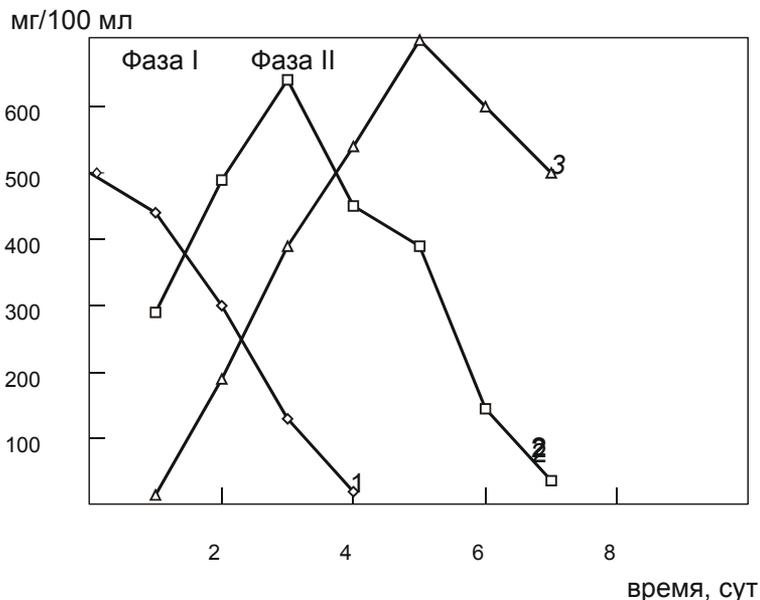


Рис. 2.6. Процесс развития *Streptomyces fradiae* 3535 и образования неомицина (по Вакману, 1953).

1 — глюкоза, 2 — мицелий, 3 — неомицин.

При этом может наблюдаться некоторое изменение величины рН; синтез антибиотиков не наблюдается или имеет место в незначительных количествах. На второй фазе (идио-фаза) прирост биомассы прекращается, и может иметь место некоторое падение концентрации клеток в культуре в результате гибели и лизиса некоторой части популяции. При этом среда обогащается продуктами обмена и продуктами автолиза погибших клеток, и начинается активный процесс синтеза антибиотиков. Исключительно важным на этом этапе становится правильно организованный режим пеногашения. Наряду с пеногасителями химической природы, дополнительно применяют механическое пеногашение с использованием специальных устройств. В большинстве случаев антибиотики выделяются в культуральную среду, хотя возможно и сохранение их внутри клеток. Локализация антибиотика, а также сфера применения последнего определяют специфику приемов постферментационной стадии. Если антибиотик находится в клетках, на первом этапе обработки биомассу выделяют из культуральной жидкости (фильтрацией или центрифугированием); далее после разрушения клеток антибиотик экстрагируют и переводят в растворимую фазу. Затем данный раствор, а также культуральные среды, (если антибиотик в процессе идио-фазы выделяется из клеток в среду) подвергают различным методам экстракции, разделения, очистки и концентрирования для получения готового продукта. Особенности процедуры выделения и очистки антибиотиков – разбавленные исходные растворы (около 1 %) и возможность инактивации антибиотика в ходе постферментационной стадии. Цель всех процедур постферментационной стадии – получение стерильных препаратов высокой степени чистоты. Особенно высокие требования предъявляют к антибиотикам медицинского назначения. Поэтому выделение, очистка, концентрирование, высушивание, а также расфасовка и упаковка медицинских антибиотиков осуществляются в асептических условиях. Готовый продукт подвергается тщательному биологическому и фармакологическому контролю. Биологический контроль определяет степень стерильности препарата. В ходе фармакологического контроля проводят всесторонние испытания препарата на токсичность, пирогенность, токсикогенность и пр., устанавливают максимально переносимую дозу антибиотика, дозы, вызывающие полную и 50 % гибель экспериментальных животных. Готовая форма лекарственного препарата антибиотического вещества поступает к потребителю с указанием биологической активности и даты выпуска.

Антибиотики немедицинского назначения, применяемые в сельском хозяйстве, получают также в условиях строго стерильной регламентированной культуры, однако готовый продукт представляет собой высушенную биомассу продуцента или культуральную среду. В таком препарате, помимо антибиотика, содержатся также другие биологически активные вещества (витамины группы В, ферменты, витамины, аминокислоты).

Наиболее известны среди применяемых в качестве кормовых антибиотических препаратов – биовит и биомицин, являющиеся препаратами хлортетрациклина, а также гризин, бацитрацин, гигромицин и др. Подавляя развитие болезнетворных микроорганизмов, тем самым снижая заболеваемость и смертность, антибиотики ускоряют рост и развитие животных и птицы. Так, применение антибиотиков в свиноводстве обеспечивает дополнительный привес от каждой тысячи животных до 120 ц при сокращении расхода кормов на 5–10 %. При добавлении антибиотиков в корм кур-несушек можно дополнительно получить до 15 тыс. яиц в год от 1000 кур. В течение последних 25 лет антибиотики применяют также для борьбы с фитопатогенами, возбудителями которых являются микроорганизмы. Антибиотические вещества наносят на вегетативные части растения, а также на семена или вносят в почву. В результате селективного действия на фитопатогенные микроорганизмы антибиотики задерживают рост или убивают микроорганизмы-возбудители, не нанося вреда растению. Наиболее эффективными фитопатогенными препаратами являются трихотецин, полимицин, фитобактериомицин, гризеофульвин.

Поиск продуцентов новых антибиотиков непрерывно продолжается. Огромные перспективы для получения высокопродуктивных штаммов открываются в связи с развитием новейших методов клеточной и генетической инженерии. Помимо усовершенствования природы микроорганизмов-продуцентов антибиотических веществ, оптимизации аппаратуры и технологий, большое значения для получения нового спектра препаратов, обладающих более ценными свойствами по сравнению с исходными, имеет так называемая модификация антибиотиков и получение полусинтетических препаратов. Полученные микробиологическим путем антибиотики подвергают химической модификации, в результате которой возможно получение препаратов с более выраженным физиологическим действием.

Глава 3. ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

В конце 60-х – начале 70-х гг. на базе технической биохимии, химической технологии, химической энзимологии и ряда инженерных дисциплин возникло новое научно-техническое направление биотехнологии – инженерная энзимология, к которой относят систему методов получения, очистки, стабилизации и применения ферментов. Основной задачей инженерной энзимологии является конструирование биоорганических катализаторов с заданными свойствами на основе ферментов или ферментных комплексов и разработка на их базе различных эффективных и экологически чистых биотехнологических процессов. Высокая субстратная специфичность ферментативного катализа и уникальная способность ускорять реакции в десятки и сотни раз в условиях нормального давления и физиологических температур позволяют получать высокие выходы продуктов и создавать практически безотходные биотехнологические процессы, не загрязняющие окружающую среду.

Эффективные биотехнологические процессы на основе ферментативного катализа используются все шире в различных сферах человеческой деятельности: пищевой промышленности, энергетике, медицине, биоэлектрокатализе и микроэлектронике.

3.1. ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты – это специфические катализаторы белковой природы, вырабатываемые клетками и тканями организмов. Они способны во много раз ускорять течение химических и биохимических реакций, не входя в состав конечных продуктов. Практические применения ферментов основаны на их высокой каталитической активности и более высокой по сравнению с небиологическими каталитическими системами субстратной специфичностью. Источником ферментов служат растительные и животные ткани, микроорганизмы. Химический синтез ферментов в промышленных масштабах очень сложен, дорог и экономически не целесообразен. Микробиологический метод получения ферментов – наиболее перспективен. Его преимущества заключаются в следующем: 1) богатство ассортимента ферментов, синтезируемых микроорганизмами, 2) возможность управления ферментативными системами и составом производимых препаратов, 3) высокие скорости размножения микроорганизмов и возможность использования различных, в том числе доступных и недорогих субстратов. Ферменты в микробных клетках могут иметь как внутриклеточную локализацию, так и выделяться в окружающую среду. Последние более доступны для препаративного получения, поэтому в промышленных масштабах получают главным образом внеклеточные ферменты. Из описанных к настоящему времени более 2000 ферментов практическое значение имеют около 50.

Согласно современной классификации, все ферменты подразделяются на 6 классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и линазы (синтетазы).

Негидролитические ферменты – оксидоредуктазы, лиазы, изомеразы и лигазы применяются сравнительно редко. Наиболее широкое применение получили микробные гидролазы, взаимодействующие с пептидами, гликозидами и другими соединениями с участием воды. Среди гидролаз – гликозидазы, протеиназы, липазы.

Гликозидазы катализируют гидролиз гликозидных соединений. Так, крахмал гидролизуют амилазы, продуцентами которых являются различные микроорганизмы (*Bacillus*, *Aspergillus*); декстраназа, взаимодействующая с гликозидными связями декстрана, синтезируется *Penicillium rugipogonium*; пуллоназа, гидролизующая пуллан, гликоген, декстрины, продуцируется бактериями *Klebsiella*; инвертаза синтезируется многими представителями рода *Aspergillus*; целлюлолитические ферменты, являющиеся сложным комплексом активных белков, воздействуют на различные участки молекулы целлюлозы. Фитопатогенные грибы *Fusarium oxysporum*, *Ergwinia* образуют пектинолитические ферменты; анаэробные бактерии *Clostridium felsineum* продуцируют полигалактуроназу, пектинэстеразу. Очень разнообразны протеиназы, катализирующие разрыв пептидных связей белков с образованием пептидов и свободных аминокислот. Протеиназы различных микроорганизмов существенно различаются своими свойствами; среди продуцентов протеиназ – *Aspergillus*, *Actinomyces*, *Clostridium*, *E.coli*. Продуцентами липаз, осуществляющих гидролиз триацилглицеролов с образованием жирных кислот и глицерина, являются различные микроорганизмы (*Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Candida*). Фосфокиназы, синтезируемые бактериями *Clostridium*, *Bacillus*, расщепляют сложные связи между жирными кислотами, глицерином и фосфатидной кислотой.

История применения ферментов уходит корнями в далекое прошлое. Некоторые ферменты, содержащиеся в природных растительных материалах, издавна использовались человеком для получения пива, спиртных напитков, производства хлеба и кисломолочных продуктов. Практика, основанная на коллективном опыте людей, намного опередила получение знаний и разработку научных основ для создания данных технологических процессов. Промышленная отрасль получения ферментных препаратов из природного растительного сырья стала зарождаться только в конце XIX столетия, а эра современной инженерной энзимологии насчитывает около 30 лет. Тем не менее, ферменты настолько широко вошли в нашу жизнь и настолько широко применяются в различных промышленных отраслях, что представить без них наше существование сегодня не представляется возможным. Промышленное получение и применение фермен-

тов в различных технологических процессах составляет в настоящее время один из важнейших разделов новейшей биотехнологии.

Огромное значение ферменты имеют в различных отраслях пищевой промышленности. В хлебопечении амилазы ускоряют процесс созревания и улучшают качество теста; их используют также для получения растворимого крахмала, патоки, декстрина. Грибные амилазы заменяют солод, лактазу используют для удаления молочного сахара из молока; инвертазы сахаров, предупреждающие кристаллизацию сахарозы, применяют в кондитерской промышленности. Комплекс ферментов – цитаз, используют для более полной экстракции соков из плодов и овощей, а также получения эфирных масел. Грибные глюкозидазы, освобождая продукты от остаточных сахаров, удлиняют сроки их хранения. С помощью каталазы из продуктов удаляют перекиси водорода, целлюлазы применяют для осахаривания крахмала из картофеля и зерна, а также увеличения выхода агар-агара из водорослей. Протеолитические ферменты микробного происхождения заменяют реннин в сыроделии. Липазы находят применение в производстве сухого молока и для ускорения созревания сыров.

Пектинолитические ферменты издавна применяются для обработки льносоломы и получения клея из тканей (расшлифовка); некоторые протеиназы применяют для удаления серицина и высвобождения шелковых волокон из шелка-сырца; для обезжиривания волокон используют липазы. В кожевенной промышленности при помощи протеолитических ферментов производят обезволашивание шкур и мягчение голя, ускоряют также процессы получения высококачественной шерсти. Ферментные препараты применяют в сельском хозяйстве при производстве кормов. Пектиназы и гемицеллюлазы повышают доступность и усвояемость кормов, ускоряют процессы силосования трудно- и несилосующихся зеленых кормов.

Все большее применение ферменты находят в тонком органическом синтезе в процессах получения различных сложных соединений (аминокислот, пептидов, нуклеотидов, полусинтетических антибиотиков), а также в медицине. Ряд ферментов применяют в так называемой «заместительной терапии» для восполнения имеющегося ферментативного дефицита. Так, препараты протеиназ используют для удаления некротических тканей в ходе лечения гнойных ран и ожогов. Бактериальную аспарагиназу, расщепляющую аспарагин, необходимый лейкозным клеткам, применяют при ряде злокачественных заболеваний. Препараты протеиназ (террилин и стрептокиназа) обладают тромболитическим действием и применяются для борьбы с тромбозами. Холестеринэстераза гидролизует холестерин, локализованный на внутренних стенках кровеносных сосудов. Особое место занимают высокоочищенные ферменты, используемые в аналитике, микроанализе, биоэлектрокатализе.

Таким образом, объемы и спектр выпускаемых ферментов, а также области их применения расширяются с каждым годом.

Микроорганизмы, являющиеся источником для получения разнообразных ферментов, существенно различаются между собой по способности синтезировать данные биологически активные соединения. Эти различия проявляются как в ассортименте синтезируемых ферментов тем или иным микробным видом, так и в их активности и исходных свойствах. Ферменты – вещества белковой природы, поэтому в смеси с другими белками определить их не представляется возможным. Наличие фермента устанавливают по протеканию той реакции, которую катализирует фермент; количественное определение фермента проводят по величине образовавшегося продукта реакции либо по расходу исходного субстрата. Принята так называемая стандартная единица активности (Е или U) – это количество фермента, которое катализирует превращение 1 микромоля субстрата в минуту при заданных стандартных условиях.

Выбор продуцента необходимого фермента сопряжен с проверкой активности огромного количества культур, приводящей к отбору наиболее активного продуцента. Природные штаммы обычно не синтезируют ферменты в избыточных количествах, так как процесс их синтеза находится под строгим генетическим контролем. Исключения составляют конститутивные ферменты, например ферменты гексозомонофосфатного пути, которые синтезируются в больших количествах в любых условиях роста. Наряду с отбором наиболее активных штаммов-продуцентов ферментов из микробных коллекций или выделенных из природных источников, продуцирующих конститутивные ферменты, широко используют индуцибельные и репрессибельные ферменты, которые синтезируются клетками в результате изменения условий ферментации или генетического аппарата клетки. К индуцибельным относятся многие ферменты, имеющие коммерческую ценность.

Индукция – это универсальный контроль для катаболических путей. Процесс ферментации с целью получения индуцибельных ферментов ведут в присутствии субстрата-индуктора. Так, для получения амилаз в среду вносят крахмал, рибонуклеазы – РНК, липаз – жиры, инвертазы – сахарозу и т.д. В результате способности синтезироваться индуцированно в ответ на заданный субстрат, возможно использование одной культуры для получения различных ферментов (табл. 3.1). Это свойство широко используется в промышленности для получения различных ферментов.

Репрессии синтеза фермента конечным продуктом можно избежать, не допуская накопления последнего. При выращивании ауксотрофных штаммов на средах с дефицитом факторов роста накопления конечного продукта не происходит, и фермент дерепрессируется. В результате этого активность целевого фермента удается повысить многократно (табл. 3.2). Дерепрессии синтеза ферментов можно добиться, выращивая частичный аук-

Таблица 3.1

Синтез протеолитических ферментов в глубинной культуре *Actinomyces fradiae* на средах с различными индукторами (по Р. В. Фениксовой, 1973)

Состав среды	Рост, ч	Белок, мг/мл	Активность, ед./мл		
			Казеиназа	Эластаза	Кератиназа
Соли, шерсть	72	0.5	0.1	0.2	0.2
Соли, крахмал, шерсть, янтарная кислота	72	0.9	1.5	2.9	3.4
Соли, крахмал, рог, янтарная кислота	72	1.1	2.3	5.3	6.0
Соли, крахмал, соевая мука	96	1.7	4.8	9.9	8.9

Таблица 3.2

Дерепрессия биосинтетических ферментов при ограниченном питании ауксотрофов факторами роста (по Wang e.a., 1983)

Фактор роста	Дерепрессированный фермент	Увеличение активности
Лейцин	Синтетаза гидроксиуксусной кислоты	в 40 раз
Тиамин	4 фермента тиаминового синтеза	до 1500 раз
Биотин	7-окси-8-амино-пеларгонат аминотрансфераза	в 400 раз

сотрофный организм, который медленно растет на минимальной среде. Но стимулируется ростовым фактором. Возможно получение конститутивных мутантов, которые не репрессируются конечным продуктом. Такие мутанты получают, адаптируя организмы к токсическому аналогу конечного продукта с последующей селекцией на устойчивость.

Многие ферменты, в основном катаболического индуцибельного типа, репрессируются при быстром росте клеток на легко утилизируемом субстрате. Для того чтобы избежать катаболитной репрессии, в среду не вносят репрессирующий субстрат, и применяют мутанты, устойчивые к катаболитной репрессии.

Выход ферментов можно увеличить также с помощью новейших методов биотехнологии. С помощью плазмид или трансдуцирующих фагов можно увеличить копийность генов, кодирующих синтез целевых ферментов. Усиление экспрессии генов возможно также в результате включения сильных промоторов в ДНК.

Помимо генетического фактора, огромное влияние на продукцию ферментов оказывают состав среды и условия культивирования микроорганизмов. При этом не только наличие индуктора в среде способно увеличить выход фермента. Чрезвычайно важным является качественный и количественный состав питательных сред. Например, большинство видов плесневых грибов рода *Aspergillus* хорошо растут на достаточно простой синтетической среде Чапека с сахарозой и нитратом. Для синтеза амилазы, однако, сахарозу следует заменить крахмалом и увеличить концентрацию углерода и азота в среде. После этого активность фермента возрастает в 3 раза. До-

бавление аминокислот в виде экстракта солодовых ростков выход фермента повышает дополнительно в 4–5 раз. Оптимизируя состав питательной среды, можно повысить активность амилазы более чем в 500 раз (табл. 3.3).

При подборе состава среды учитывают все факторы: вид и концентрацию источника углерода и энергии, факторы роста, минеральные элементы, индуцирующие субстраты. В качестве источников углерода и азота чаще всего применяют различное природное органическое сырье: крахмал, кукурузный экстракт, соевую муку, гидролизаты дрожжевых биомасс. Помимо источника углерода, азота и факторов роста, большое влияние на синтез ферментов оказывают минеральные соли магния, марганца, кальция, железа, цинка, меди и др., многие из которых входят в состав ферментов.

Биотехнологическое производство ферментов реализуется двумя способами – поверхностным и глубинным. Твердофазная поверхностная ферментация заключается в выращивании продуцента на поверхности тонкого слоя твердой сыпучей среды. Глубинная ферментация в жидкой среде может быть реализована как в условиях периодического процесса, так и с применением проточных систем.

При поверхностной ферментации для получения инокулята споровый материал размножают поверхностным способом или выращивают музейную культуру в условиях глубинной жидкой культуры. Далее посевной материал направляют на стадию ферментации, которая осуществляется на поверхности сыпучей среды в металлических лотках или вертикальных перфорированных с обеих сторон кюветах. Культура развивается на поверхности твердой рыхлой среды, основу которой составляют пшеничные отруби, зерновая шелуха, являющиеся источником ростовых веществ. Для разрыхления среды в отруби добавляют древесные опилки (5–10 %), овсяную шелуху. Смесь перед автоклавированием увлажняют до 20–40 % влажности и подкисляют для улучшения условий стерилизации. Прогрев сыпучей среды осуществляют острым паром в специальных стерилизаторах при непрерывном перемешивании среды; длительность процесса – 60–90 минут при 105–140°C. В охлажденную до 30°C среду вносят стерильные термолabile компоненты, инокулят (0.02–0.1 % от массы среды), быстро перемешивают ручным

Таблица 3.3

Влияние состава среды на синтез α -амилазы в глубинной культуре *Aspergillus oryzae* (по Р. В. Фениксовой, 1973)

Состав среды	Активность, ед./100 мл
Среда Чапека с 3 % сахарозы и 0.05 % азота	20
Среда Чапека с 6 % крахмала и 0.15 % азота	60
То же + 10 мл экстракта солодовых ростков	250–300
То же + 40 мл экстракта солодовых ростков	500–550
Концентрация компонентов (С, N, S, P) в 1.5 раза при оптимальной аэрации	1000–1100

способом и раскладывают в лотки слоем 2–3 см, которые устанавливают в герметичные аэрируемые камеры, предварительно простерилизованные. Исходная влажность среды – 58–60 %, температура культивирования 28–32°, длительность ферментации около 36–48 ч.

В течение первых 10–12 ч происходит прорастание конидий при 28°. В последующие 14–18 ч реализуется быстрый рост мицелия, в этот период потребляется основное количество питательных веществ из среды при максимальном термогенезе. Аэрация становится максимальной (до 60 объемов стерильного воздуха на объем камеры/ч). Для предотвращения высыхания конидий в результате повышения температуры влажность воздуха повышают практически до 100 %. Вследствие больших расходов воздуха принята его рециркуляция. Циркулирующий воздух проходит через систему охлаждения и используется повторно; отработанная часть после очистки на волокнистых фильтрах выбрасывается в атмосферу. В этот период скорость образования фермента достигает максимальных значений. В последующие 12–18 ч процессы метаболизма ослабевают, но синтез ферментов еще продолжается. Мицелий обволакивает и прочно склепляет твердые частицы среды, поэтому для нормального транспорта и окисления веществ среда должна быть достаточно рыхлой и влажной. Эффективный транспорт кислорода из газовой фазы и растворение в среде происходит при условии хорошей аэрируемости довольно тонкого слоя твердой сыпучей среды. Это приводит к необходимости использования больших объемов производственных площадей. Поверхностный метод ферментации является экстенсивным методом с большой долей ручного труда. При этом, однако, он не энергоемок и обеспечивает более высокий выход продукта на единицу массы среды по сравнению с глубинной ферментацией.

Поверхностная ферментация с использованием вместо лотков кювет более совершенна. Конструкция обеспечивает более эффективную аэрацию и позволяет частично механизировать процесс. Применяемые в промышленности колонные аппараты объемной аэрации еще более улучшают процесс твердофазной ферментации. Такой аппарат разделен на секции перфорированными пластинами, закрепленными на поворотных осях. Среда в ходе ферментации разрыхляется с помощью вращающихся перемешивающих устройств. Это позволяет увеличить высоту слоя до 30 см. Режим перегрузки среды на тарелках задается автоматически. Производительность аппарата достигает 1 т культуры в сутки.

После завершения стадии ферментации выросшая культура представляет собой корж (пек) из набухших частиц среды, плотно связанных разросшимся мицелием. Данную массу измельчают с помощью дробилок различного типа (барабанно-зубчатых, шнековых, молотковых) до частиц размером 5–6 мм. Для предотвращения инактивации ферментов массу подсушивают до остаточной влажности около 10–12 %. Технические пре-

параты ферментов, используемые к текстильной, кожевенной промышленности, упаковывают в бумажные многослойные крафт-мешки и отправляют потребителю. Процедура получения очищенных активных препаратов ферментов сложна и многоэтапна.

Важнейшим нормируемым показателем выпускаемых ферментных препаратов является активность, которая выражается в микромолях субстрата, прореагировавшего под действием 1 мл ферментного раствора или 1 г препарата в оптимальных для протекания ферментативной реакции условиях за 1 минуту. Существует также понятие активности условного ферментного препарата. Данная единица рассчитывается по активности основного фермента в стандартном условном препарате. За активность условного стандартного препарата принимают его среднюю устойчивую активность, достигаемую в производственных условиях.

Глубинный способ микробиологического получения ферментов имеет преимущества по сравнению с поверхностным, так как проходит в контролируемых условиях ферментации, исключает ручной труд, позволяет автоматизировать процесс. Питательная среда для ферментации готовится, исходя из физиологических потребностей используемой микробной культуры, а также из типа целевого фермента. Основным углеродным сырьем служат различные сорта крахмала (кукурузный, пшеничный, картофельный), кукурузный экстракт, свекловичный жом, а также глюкоза, мальтоза, декстрины. В качестве источника азота применяют органические соединения (гидролизаты казеина или микробных биомасс), а также минеральные соли (NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Для биосинтеза целлюлолитических ферментов источником углерода служит хлопок, солома, целлюлоза; липолитических – липиды.

На предферментационной стадии технологическое оборудование и питательная среда подвергаются стерилизации. После охлаждения среды до 30° в нее вносят выращенный инокулят (2–5 % от объема производственной культуры). Процесс проводят в цилиндрических аппаратах объемом до 100 м^3 . Синтез фермента в глубокой культуре протекает в течение 3–4 суток при непрерывной подаче стерильного воздуха, стабилизации pH и температуры среды на строго определенных уровнях. Незначительные изменения значений данных параметров могут вызвать многократное снижение ферментативной активности.

Динамика образования биомассы и выхода фермента α -амилазы на основе культуры *Aspergillus* показаны на рис. 3.1. В течение первого периода (24–30 ч) мицелий бурно развивается и идет быстрое потребление легкоусвояемого субстрата. Далее в среду вносят индуктор. После этого начинается интенсивный синтез целевого фермента. Периодически в среду вносят стерильный пеногаситель, добавку углеродного субстрата, раствор для коррекции и стабилизации pH.

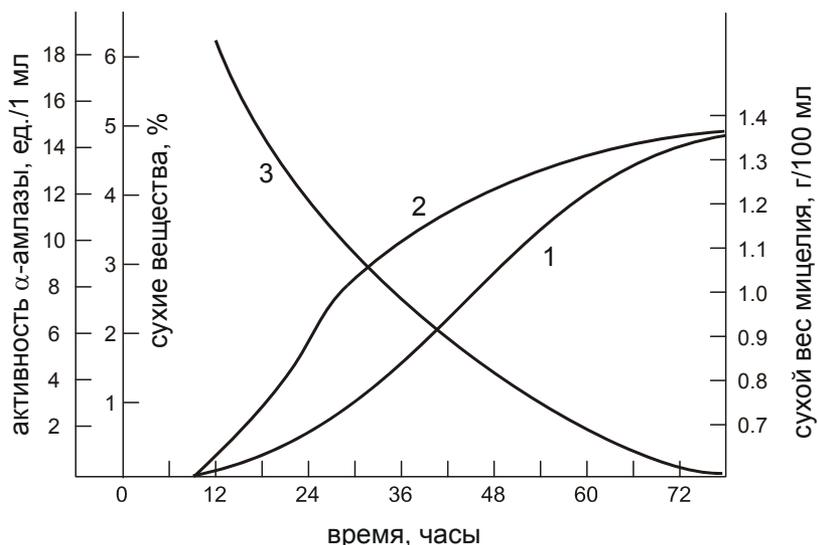


Рис. 3.1. Рост мицелия, образование α-амилазы и потребление субстрата в глубокой культуре *A. oryzae* (по Р. В. Фениксовой, 1973).

1 – α-амилаза, 2 – мицелий, 3 – сухие вещества среды.

Процесс образования биомассы продуцента не совпадает во времени с максимумом продукции фермента, при этом условия для образования фермента могут существенно отличаться от условий для оптимального режима синтеза биомассы. Поэтому условия среды в ходе протекания процесса ферментации контролируются и изменяются. Известны стадийные процессы в двух последовательных аппаратах. В первом создают условия для развития мицелия; во втором – для синтеза и накопления фермента. На промышленном уровне реализованы также проточные режимы, например, для получения глюкоизомеразы с использованием бактериальной культуры *Vacillus coagulans*. Ферментацию проводят при дефиците глюкозы и кислорода в среде (глюкоизомераза ингибируется кислородом); максимальная продуктивность сохраняется длительное время, до 200 ч.

После завершения ферментации для предотвращения инактивации ферментов культуральную жидкость охлаждают до 3–5°C и направляют на обработку. После отделения мицелия культуральную среду освобождают от грубых взвешенных частиц и концентрируют под вакуумом или подвергают ультрафильтрации. В связи с термолабильностью многих ферментов процессы обработки ведут при контролируемых, часто пониженных температурах. Глубокая очистка ферментов приводит к существенной потере активности препаратов и также очень дорогостояща. Более того, высокоочищенные белки менее стабильны по сравнению с неочищенными. Поэтому при использовании растворимых ферментов редко пользуются полной очисткой. Тем более что в зависимости от сферы при-

менения требования к чистоте ферментных препаратов различны. Так, ряд ферментных препаратов, получаемых при поверхностной ферментации, выпускают в виде высушенных отрубей с остатками мицелия, а также высушенных осадков белков или высушенных растворов. Товарные формы таких препаратов известны в виде сухих препаратов или растворов ферментов. Последние хранят при отрицательных температурах, с применением стабилизаторов (соли кальция или магния, а также хлорид натрия, сорбит, бензоат и др.). Для получения очищенных препаратов ферментов применяют различные методы (осаждение солями или органическими растворителями, высаливание, сорбционную и хроматографическую очистку с использованием высокоселективных ионитов). Процесс завершается стадией высушивания на распылительных или вакуумных аппаратах в щадящем температурном режиме, не допускающем больших потерь активности ферментов. После стандартизации продукт направляется потребителю.

3.2. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Широкие перспективы открылись перед инженерной энзимологией в результате создания нового типа биоорганических катализаторов, так называемых иммобилизованных ферментов. Термин «иммобилизованные ферменты» узаконен сравнительно недавно, в 1974 г. Сандэремом и Реем, хотя еще в 1916 г. Нельсон и Гриффи показали, что инвертаза, адсорбированная на угле или алюмогеле, сохраняет свою каталитическую активность. Однако начало целенаправленных исследований, ориентированных на создание такого рода стабилизированных ферментных катализаторов, относится к середине XX века, при этом широкий фронт работ и ощутимые успехи достигнуты в последние 20–25 лет. Иммобилизация – это процесс прикрепления ферментов к поверхности природных или синтетических материалов, включение их в полимерные материалы, полые волокна и мембранные капсулы, поперечная химическая сшивка. Иммобилизацию также можно характеризовать как физическое разделение катализатора и растворителя, в ходе которого молекулы субстрата и продукта легко обмениваются между фазами. Разделение может быть достигнуто адсорбционным или ковалентным связыванием фермента с нерастворимыми носителями, либо связыванием отдельных молекул фермента с образованием агрегатов. При иммобилизации ферментов происходит стабилизация каталитической активности, так как этот процесс препятствует денатурации белков. Иммобилизованный фермент, имеющий ограниченную возможность для конформационных перестроек, быстрее растворимого находит кратчайший путь к функционально активной конформации. Иммобилизованные ферменты приобретают, помимо стабильности, отдельные свойства, не характерные для их свободного состояния, например, возможность функционировать в неводной среде, более широкие зоны оптимума по температуре и рН. По образному выраже-

нию А. М. Егорова (1987) «Иммобилизованные ферменты как гребцы-невольники на галерах, прикованные каждый к своей скамье, пространственно разобщены на носителе. Это означает резкое затруднение межмолекулярных взаимодействий типа агрегации, которые могут вызвать инактивацию фермента». При этом фермент из разряда гомогенных катализаторов переходит в разряд гетерогенных, то есть находится в фазе, не связанной ни с исходным субстратом, ни с образуемым продуктом. Это позволяет организовывать на базе иммобилизованных ферментов различные более эффективные биотехнологические процессы многократного периодического, а также непрерывного действия с использованием принципа взаимодействия подвижной и неподвижной фаз.

Длительность сохранения каталитической активности и ряд свойств ферментов определяются правильностью выбора носителя, метода и условий проведения иммобилизации. Существует несколько принципиально различных подходов, позволяющих связать фермент с носителем: адсорбционные методы и методы химического связывания на поверхности, методы механического включения или захвата, методы химического присоединения (рис. 3.2).

Методы иммобилизации путем адсорбции основаны на фиксировании фермента на поверхности различных материалов – неорганических (силикагель, пористое стекло, керамика, песок, обожженная глина, гидроокиси титана, циркония, железа) и органических (хитин, целлюлоза, полиэтилен, ионообменные смолы, вспененная резина, полиуретан с ячеистой структурой). Насколько разнообразны материалы, применяемые для адсорбции ферментов, настолько различны механизмы и прочность связывания фермента с носителем. Характеризуя эти связи, можно говорить о широком их спектре, от простого обрастания носителя до образования полярных, ионных и ковалентных связей. Адсорбция – это самый простой метод им-

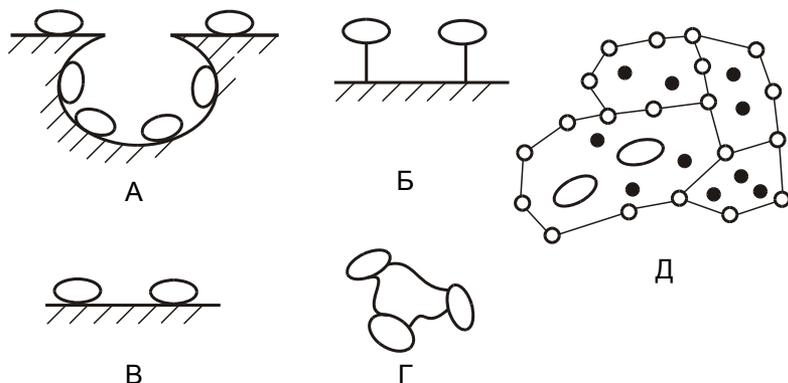


Рис. 3.2. Основные методы иммобилизации ферментов.

А – адсорбция на крупнопористом носителе; Б – ковалентное связывание; В – адсорбция;
Г – поперечная сшивка; Д – включение в гель.

мобилизации ферментов на поверхности нерастворимых носителей.

Процедура иммобилизации состоит в смешивании в определенных условиях фермента с носителем и инкубации смеси. Затем при помощи фильтрования и центрифугирования проводят отделение нерастворимого компонента смеси от растворимого. В процессе адсорбции фермента на носителе при их взаимодействии возникают солевые связи, а также другие слабые взаимодействия (водородные, ван-дер-ваальсовы). Адсорбция – мягкий метод иммобилизации, при котором влияние носителя на активность фермента минимально, поэтому, как правило, ферменты хорошо сохраняют активность. Недостаток данного метода – непрочность связей. Поэтому при незначительном изменении условий среды (рН, температуры, ионной силы, концентрации продукта) возможна десорбция фермента с поверхности носителя. Более прочными являются связи, основанные на ионном взаимодействии, когда адсорбция поддерживается при определенных значениях рН и ионной силе омывающего фермент раствора.

Методы химического связывания имеют долгую историю и реализуются в различных модификациях. Практически все функциональные группы белков могут быть использованы для связывания катализатора с носителем. Широкое применение нашли реакции, ведущие в присутствии водоотнимающего агента к образованию пептидных связей между аминокислотными группами фермента и карбоксильными группами носителя или, наоборот, – между карбоксильными группами фермента и аминокислотными группами носителя. В качестве водоотнимающего агента используют дициклогексилкарбодимид, сшивающим агентом может служить бромциан. Возможно проведение сшивки без участия сшивающих агентов. Перспективным подходом в развитии данного метода является использование в качестве носителя привитых полимеров. Прививая к поверхности полимерного материала боковые ветви, можно регулировать его свойства и влиять на реакционную способность за счет создания на поверхности носителя микроструктур, оптимальных для стабильного функционирования биокатализатора. Пример такого подхода – применение полиэтилена с привитыми поливиниловым спиртом или полиакриловой кислотой. С целью снижения диффузионных затруднений между субстратом и ферментом, а также для облегчения оттока образующихся продуктов, при иммобилизации можно выводить фермент из микроструктуры молекулы носителя. Фермент присоединяют к поверхности носителя через некоторую, определенной длины, химическую последовательность, так называемый спейсер («поясок»).

Иммобилизация путем химической сшивки фермента с носителем характеризуется высокой эффективностью и прочностью связи. Для предотвращения снижения каталитической активности фермента место сшивки удаляют от активного центра катализатора и присоединение проводят не по белковой части молекулы, а по углеводной.

Одним из наиболее эффективных методов иммобилизации с образованием химических связей считают образование ковалентных связей между молекулой носителя и катализатором. Как правило, для ковалентного присоединения носитель нужно предварительно активировать (активацию аффинных носителей проводят, например, бромцианом). Более простым, не требующим предварительной модификации носителя и быстрым методом иммобилизации в простых условиях является металлохелатный метод. Он заключается в иммобилизации ферментов на носителях из полимеров гидроксидов металлов (титана, циркония, олова, железа). Гидроксильные группы вытесняются из координационной сферы того или иного металла функциональными группами фермента, в результате между носителем и ферментом возникает координационная или ковалентная связь. Успех метода определяется рядом условий: в молекуле фермента должны присутствовать группы, играющие роль лигандов и способные стерически контактировать с атомами титана; данные группы должны быть удалены от активного центра. Метод применяют в различных вариантах, с использованием органических и неорганических носителей, включая ионообменные носители. Природа комплекса может существенно влиять на активность и операционную стабильность иммобилизованного фермента (табл. 3.4–3.5).

Сравнительно новой разновидностью металлохелатного метода является иммобилизация ферментов на основе гидроксидов переходных металлов, в основном титана и циркония. Молекулы фермента закрепляются на поверхности носителя путем образования хелатов. Для реализации данного метода, помимо фермента, необходимо наличие только одного реагента, собственно гидроксида металла.

Таблица 3.4

Влияние метода иммобилизации с использованием комплекса $TiCl_4$ на активность глюкоамилазы (по Дж. Вудворду, 1988)

Комплекс, использованный для активации	Активность фермента, ед./г
$TiCl_4$ – акриламид	1.03
$TiCl_4$ – мочевины	0.36
$TiCl_4$ – лимонная кислота	0.41
$NiCl_4$ – лактоза	0.48

Таблица 3.5

Операционная стабильность ферментов, иммобилизованных на носителях, активированных титаном (IV) (по Дж. Вудворду, 1988)

Фермент	Носитель	Температура, °C	Время полуинактивации
Глюкоамилаза	Роговая обманка	50	10 ч.
	пористое стекло	45	1 ч.
Инвертаза	Роговая обманка	25	54 сут.
	пористое стекло	18	8 сут.

Недостатком методов иммобилизации на основе физической адсорбции или ковалентного присоединения является необходимость использования достаточно больших количеств катализатора. Более того, химическая модификация, которой подвергаются ферменты в процессе иммобилизации. Может существенно снижать их каталитическую активность. Избежать этого можно при использовании методов иммобилизации ферментов путем включения в полимерную структуру.

В качестве полимерных носителей применяют природные и синтетические материалы (альгинат, желатину, каррагинан, коллаген, хитин, целлюлозу, полиакриламид, фоточувствительные полимеры). Раствор фермента смешивают с раствором мономеров носителя. Далее создают условия для процесса полимеризации, в ходе которого происходит механическое включение фермента в структуру носителя. Важным моментом является равномерность распределения молекул фермента в объеме носителя и однородность получаемых агрегатов. Техника включения зависит от природы и свойств используемого материала, образуемые при этом биосистемы имеют вид гранул, волокон, полимерных сеток, пленок и т.п.

Иммобилизация в полиакриламидный гель (ПААГ), который наиболее часто используется для этих целей, заключается во внесении раствора фермента в раствор мономера (N, N¹-метиленадиакриламида). Далее в подобранных условиях быстро формируется гель в виде блока. Монолитный гель измельчают, придавая частицам форму кубиков желаемого размера. При использовании желатины или агар-агара вначале подогревают их растворы, затем охлаждают и вносят фермент. В процессе последующего охлаждения происходит формирование геля. Полимеризация альгината происходит в присутствии некоторых катионов. Поэтому на первом этапе смешивают растворы фермента и мономеров этих полисахаридов, далее смесь с помощью дозирующего устройства вносят в раствор, содержащий ионы Ca²⁺ или Ba²⁺ (для альгината) или Al³⁺, Fe³⁺, K⁺ или Mo²⁺ (для каррагинана), при этом образуются сферические полимерные частицы в виде гранул.

Гели в зависимости от природы используемого полимерного материала отличаются по ряду показателей. Например, гели ПААГ недостаточно прочные, но этого можно избежать при использовании ПААГ, содержащего жесткую арматуру из керамики. При увеличении степени сшивки с целью придания большей прочности гелю возникают проблемы диффузионных затруднений. Альгинатные гели отличаются высокой прочностью и хорошими гидродинамическими свойствами, что не создает препятствий для притока к активным центрам молекул ферментов субстрата и оттоку образуемого продукта. При работе с альгинатом кальция важно отсутствие в иммобилизационной системе хелатирующих агентов (фосфатов, цитратов), которые, связывая кальций, разрушают структуру геля.

Привлекательной для использования является иммобилизация ферментов методом инкапсулирования. В этом методе главным является не создание физических или химических сил, необходимых для связывания катализатора с носителем, а удержание раствора, окружающего фермент. В процессе инкапсулирования иммобилизуются не отдельные молекулы фермента, а исходный раствор, содержащий фермент. При использовании метода иммобилизации применительно к ферментам чаще всего применяют коацервацию и межфазовую полимеризацию. Первый прием реализуется без химических реакций и включает фазовое разделение коллоидных частиц полимера, которые ассоциируют вокруг маленьких водных капель и образуют затем непрерывную мембрану. В качестве полимерных материалов при этом используют нитрат или ацетат целлюлозы, бутадиеновый каучук. При межфазовой полимеризации для образования полупроницаемой мембраны один из реагентов находится в водной, другой – в органической фазе; на границе раздела фаз происходит реакция полимеризации и вокруг диспергированных в органической фазе капель образуется слой полимера. С помощью этого метода могут быть получены мембраны из полиуретана или эпоксидных смол. Полупроницаемые мембраны, покрывающие раствор с ферментом, могут быть изготовлены из различных материалов (полистирола, полиакрилата, полиуретана, полиэфиров, липидов, поликарбонатов и т. д.). Варьируя материалы для получения полупроницаемой мембраны, можно осуществлять контроль размеров молекул. Например, большие по размерам молекулы ферментов удерживаются внутри капсулы, а более мелкие молекулы исходных субстратов и синтезируемых продуктов могут свободно диффундировать через мембрану. Диаметр микросфер может составлять от нескольких микрон до нескольких тысяч микрон при толщине мембран от сотен ангстрем до нескольких микрон. Безусловным преимуществом микрокапсулирования является большая площадь поверхности, приходящаяся на единицу активности иммобилизованного фермента, что позволяет использовать высокие концентрации ферментов в исходном растворе и достигать высокой эффективности их действия. При этом возможно также придать ферменту способность функционирования в неводной среде и получать высокие выходы целевого продукта высокой степени чистоты.

К методу инкапсулирования близок метод обращенных мицелл. Фермент включают в замкнутую структуру из поверхностно-активного вещества (липид, детергент), содержащую микроскопическую каплю воды. Фермент функционирует на границе раздела двух фаз: органической, находящейся в биореакторе, и водной, заключенной в обращенную мицеллу.

Существенный интерес представляет способ включения ферментов в полые волокна. Применяют волокна, изготовленные из природных либо синтетических полимерных материалов. Раствор фермента вводят во внутренний объем полых волокон и затем «запечатывают» волокно с обоих

Таблица 3.6

Иммобилизованные ферменты, используемые в промышленности (по Poulsen, 1984)

Иммобилизованный фермент	Объемы выпуска, т/г	Получаемый продукт	Страна
Аминоацилаза	менее 5	L-аминокислоты	Япония
Аминоглюкозидаза	1	Глюкоза	Англия
Глюкозоизомераз	1500–1750	Глюкозо-фруктозные сиропы	Дания, Нидерланды, Япония
Гидантоиназа	менее 1	D-фенилглицин-	Япония
Лактаза	5	Лактозные гидролизаты	Япония
Нитрилаза	0.1	Акриламид	Япония
Пенициллин G-ацилаза	3–4	6 АПК	Япония, Нидерланды
Пенициллин V-ацилаза	1	6 АПК	Англия, Австрия

лидирующие в этой области, ежегодно выпускают ферментов на сотни млн. долларов. Производство протеаз, глюкозоизомераз, ацилтрансфераз достигает сотен и тысяч кг/г (табл. 3.6).

Внедрение иммобилизованных ферментов в промышленные отрасли и организация на их основе принципиально новых, экологически чистых и компактных биотехнологических процессов дает ощутимый экономический эффект. Для таких процессов разрабатывают специальные биореакторы, имеющие аналогию с реакторами для химических процессов с гетерогенным катализом. Иммобилизованный фермент в таком биореакторе представляет собой неподвижную фазу, через которую протекает субстрат, подлежащий биопревращению. Реакторы бывают периодического и непрерывного действия. Чаще всего фермент, включенный в полимерную структуру, представляет собой малые сферические частицы одинакового размера. Это обеспечивает большую площадь реакционной поверхности и, следовательно, улучшение диффузии. Сферические частицы или гранулы с ферментом максимально плотно упаковывают в аппарате. В результате этого концентрация каталитического агента, участвующего в биотехнологическом процессе, значительно выше по сравнению с ферментными системами на основе микробных клеток. Повышение концентрации биокатализатора обеспечивает большую производительность аппарата и более высокий выход продукта. Одностадийные превращения субстрата с использованием иммобилизованных ферментов осуществляются обычно в проточных реакторах с перемешиванием, псевдооживленным слоем, а также в реакторах с полыми волокнами (рис. 3.3).

Все представленные системы имеют определенные ограничения в части неравномерного распределения катализатора, а также перепадов давле-

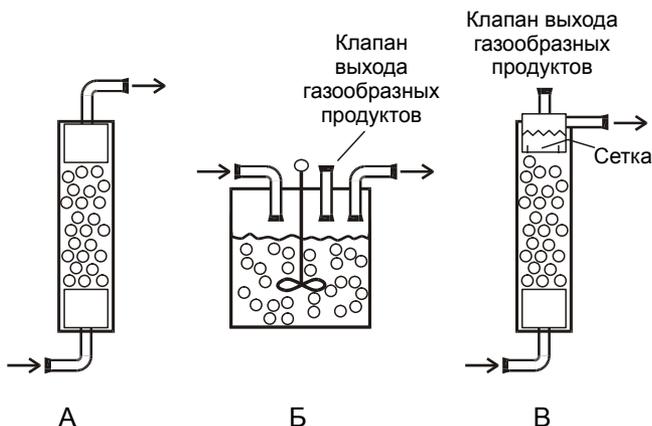


Рис. 3.3. Типы реакторов с иммобилизованными катализаторами (по Дж. Вудворду, 1988).
 А – реактор колоночного типа, Б – Реактор с перемешиванием,
 В – модифицированный реактор колоночного типа.

ния. Применяют реакторы колоночного типа, реакторы с перемешиванием на базе магнитной или подвесной мешалки. В реакторах с перемешиванием возможно разрушение довольно мягких частиц геля. Оригинальна конструкция биореактора «корзиночного» типа, в котором для предотвращения разрушения гранул перемешивание осуществляется за счет вращения проволочной «корзины», в ячейках которой иммобилизованы гранулы с включенным ферментом. В данном варианте реализованы два типа иммобилизации: полимерные гранулы с включенными молекулами фермента сами иммобилизованы в ячейках проволочной сетки. Применяются также биореакторы периодического действия, без протока, в которых фермент, включенный в гель в виде монолитного блока, заполняет весь объем аппарата. В толще геля в процессе иммобилизации и формирования монолита или после завершения этого процесса для осуществления газо- и массообмена формируют вертикальные каналы.

Эра биореакторов для иммобилизованных биокатализаторов только начинается; их конструкции непрерывно совершенствуются применительно к различным биотехнологическим процессам, реализуемым на их базе. Эти процессы относятся к сфере органического синтеза и медицины, конверсии растительного сырья и преобразования энергии, производства пищевых веществ и напитков.

Иммобилизованные ферменты в пищевой промышленности

В истории пищевой технологии, насчитывающей тысячелетия, иммобилизованные биокаталитические системы (ферменты, клетки) за последние 20–25 лет вписали совершенно новые страницы, обозначив принципиальные сдвиги в области самих технологий и в улучшении качества пище-

вых продуктов. Все большее применение в развитых странах находят биотехнологические процессы получения глюкозо-фруктозных сиропов, оптически активных L-аминокислот из рацемических смесей, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки, синтеза L-аспарагиновой и L-яблочной кислот из фумаровой кислоты.

Получение глюкозо-фруктозных сиропов, важный с точки зрения диетологии процесс, впервые был реализован в промышленности в 1973 г. американской компанией «Клинтон Корн». В настоящее время это самый крупный промышленный процесс на основе иммобилизованных ферментов.

Фруктоза по сравнению с глюкозой, обладая более приятным вкусом, на 60–70 % слаще, то есть ее потребляется меньше обычного сахара, кроме того, метаболизм фруктозы в организме человека не связан с превращением инсулина, она менее вредна для зубов и т.д. Технологии получения глюкозо-фруктозных сиропов за короткий срок были разработаны и освоены в промышленных масштабах многими западными странами. В 1980 г. их выпуск составил 3.7 млн. тонн. Продукт с товарным названием «изоглюкоза» поступает на рынок в виде сиропов, содержащих глюкозу и фруктозу в соотношении, близком к 1:1; с использованием разделительных процессов типа жидкой хроматографии содержание фруктозы может быть повышено до 90 %.

Биохимическая сущность процесса сводится к превращению (изомеризации) глюкозы, предварительно полученной в результате гидролиза кукурузного или картофельного крахмала, во фруктозу под воздействием иммобилизованной глюкозоизомеразы. Реакция протекает в одну стадию до тех пор, пока в реакционной смеси соотношение глюкозы и фруктозы практически не уравнивается. Конечным продуктом может быть данный раствор; фруктоза может быть отделена из раствора, а глюкоза – подвергнута дальнейшей изомеризации. Процесс протекает непрерывно в реакционных колоннах высотой 5 м, заполненных слоем катализатора – иммобилизованного фермента в виде полимерных гранул, полых волокон, кусочков геля и т.д. Технические детали процесса и способы иммобилизации фермента подробно в литературе не описаны, так как являются секретом производства. Время полуинактивации фермента составляет от 20 до 50 суток, то есть заменять или обновлять катализатор приходится раз в 2–3 месяца. Производительность биореакторов варьирует от 1 до 9 т глюкозо-фруктозного сиропа на 1 кг иммобилизованного фермента. По экономическим оценкам, выполненным в Венгрии на основе анализа производства глюкозо-фруктозных сиропов мощностью 120 тыс. т кукурузного зерна в год, производство такого типа экономичнее в 1.5 раза по сравнению с традиционным получением сахара из сахарной свеклы. Датская компания «Ново» рекомендует в качестве лучших следующие параметры процесса: активность катализатора – 200 межд. ед./г, высота слоя катализатора – 5 м, ли-

нейная скорость потока – 3.6 м/ч., производительность реактора – 400 т в сутки.

Корпорацией «Цетус» (США) разработан новый процесс получения 100 % фруктозы из глюкозных сиропов. На первом этапе глюкоза под действием иммобилизованной пиранозо-2-оксидазы окисляется в D-глюкозон, который на втором, химическом, этапе на палладиевом катализаторе практически со 100 % выходом восстанавливается до фруктозы. США планируют к 2000 г. заменить на 30–40 % потребление сахара такими фруктозными сиропами, Япония – резко сократить экспорт сахара за счет биотехнологического процесса изомеризации глюкозы во фруктозу.

Получение L-аминокислот ферментативным разделением химических рацемических смесей D,L-аминокислот реализовано на промышленном уровне фирмой «Танабе Суйяку» в 1969 г. В качестве исходного сырья используют полученные химическим синтезом ацилированные D,L-аминокислоты (метионин, валин, фенилаланин, триптофан), раствор которых пропускают через колонку объемом 1 м³, заполненную иммобилизованной аминокислотой. Фермент гидролизует L-ацил-изомеры, после отщепления объемной ацил-группы более мелкие и растворимые молекулы L-аминокислот выносятся из биореактора через мембрану. В конце концов в реакционной смеси остаются только ацил-D-аминокислоты, которые при нагревании вновь рацемизируются на D- и L-изомеры. Период полуинактивации фермента, иммобилизованного на полимерной смоле, составляет 65 дней. Периодически в колонку доливают свежую порцию раствора фермента, который вновь адсорбируется смолой. Время работы колонки без смены носителя составило более 8 лет.

В Италии фирмой «Сентрале дель Латте» в середине 80-х годов реализован первый коммерческий процесс получения безлактозного молока. Лактоза, присутствующая в достаточно больших количествах в молоке и плохо растворимая, вызывает кристаллизацию ряда молочных продуктов и кондитерских изделий, снижая их качество. Кроме этого, некоторая часть населения не может употреблять нативное молоко вследствие недостаточности лактазы, фермента, гидролизующего молочный сахар с образованием глюкозы и галактозы. Молоко после такой обработки приобретает качества диетического продукта. Масштабы производства безлактозного молока возрастают во многих европейских странах.

Получение сахаров из молочной сыворотки в процессе ферментативного гидролиза позволяет получать дополнительные количества сахаристых веществ из отходов молочной промышленности. Первые промышленные процессы гидролиза лактозы молочной сыворотки с использованием иммобилизованной лактазы осуществлены в 1980 г. в Англии и Франции. Предварительно деминерализованную сыворотку пастеризуют и затем пропускают через ферментационную колонку с иммобилизованной лактазой. Период полуинактивации фермента удается увеличить до 60

суток, мощность установок – 1000 л/ч при 80 % конверсии лактозы. Получаемые при этом глюкоза и галактоза превосходят по степени сладости обычные сахара в 1.5 раза при равных экономических показателях.

Получение L-яблочной кислоты ферментативным способом из L-аспарагиновой кислоты основано на использовании иммобилизованной в геле фумаразы. Яблочная кислота достаточно широко используется в пищевой и фармацевтической промышленности в качестве заменителя лимонной кислоты. Компанией «Танабе Суйяку» в результате иммобилизации фумаразы в карраген удалось повысить ее операционную стабильность при времени полуинактивации свыше 100 суток, при этом продуктивность процесса превращения фумаровой кислоты в яблочную возросла более чем в 5 раз.

Получение L-аспарагиновой кислоты с помощью фермента аспартазы, иммобилизованной в геле, со временем полуинактивации препарата до 30 суток возможно из фумаровой кислоты. Фермент, присоединяя аммиак к двойной связи фумаровой кислоты, в одну стадию образует оптически активную форму L-аспарагиновой кислоты. Процесс реализован также на основе иммобилизованных в гель микробных клеток с дополнительным химическим связыванием, время полуинактивации аспартазы, находящейся в клетках, возросло до 120 суток; технологический процесс практически полностью автоматизирован и реализуется в непрерывном режиме. Производительность установок – до 1.7 т/1м³ в день.

Помимо представленных и реализованных в промышленных масштабах процессов, иммобилизованные ферменты в настоящее время широко используются в научных исследованиях при разработке новых биотехнологических процессов получения ценных продуктов. Это процесс получения глюкозы из крахмала с участием амилазы и глюкозоамилазы; получение инвертного сахара (аналог глюкозо-фруктозных сиропов) из сахарозы с использованием инвертазы. В рамках диетологии разрабатываются процессы получения белковых гидролизатов заданного состава с участием иммобилизованных протеаз. Осваиваются установки для непрерывного ферментативного получения глюкозы из различных целлюлозосодержащих отходов.

Использование иммобилизованных ферментов в тонком органическом синтезе

Высокие скорости протекания реакций в «мягких» условиях, уникальная специфичность и стереоспецифичность действия ферментов позволяет создавать на их основе эффективные и перспективные технологические процессы. В настоящее время успехи в тонком органическом синтезе на основе иммобилизованных ферментов особенно наглядны в сфере получения лекарственных препаратов (антибиотиков, стероидов, простагландинов).

С использованием иммобилизованных ферментов созданы процессы получения более эффективных аналогов существующих антибиотиков

пенициллинового ряда и цефалоспоринов, модификация которых химическим путем является чрезвычайно сложной задачей. Так, на основе иммобилизованной пенициллинамидазы реализован процесс эффективного деацилирования бензилпенициллина, являющегося сырьем для получения 6-амино-пеницилановой кислоты (6-АПК). Это достаточно простой технологический процесс, протекающий в одну стадию при обычных условиях в диапазоне температур 10–40°C. Промышленная реализация процесса получения 6-АПК привела к существенному увеличению выпуска полусинтетических пенициллинов и удешевлению их. На основе этого же фермента разработан процесс получения 7-аминодезацетоксицефалоспоровой кислоты, представляющей собой ключевой субстрат для синтеза новых цефалоспоринов.

Перспективно применения ферментативного катализа для получения ряда лекарственных веществ (простагландинов, тромбоксанов, простаглицина и др.) из арахидоновой кислоты с использованием сложных полиферментных систем. Ключевым ферментом здесь является простаглицинэндопероксидсинтетаза, катализирующая трехсубстратную реакцию. В ходе реакции происходит сопряженное окисление арахидоновой кислоты кислородом и донором электронов в виде НАДН, триптофана, ферроцианида. Следует отметить, что исходный субстрат для этих реакций, арахидоновая кислота, может быть получена из масел с использованием специфических фосфолипаз.

Интересным направлением являются разрабатываемые процессы превращения достаточно доступных субстратов (фумарата аммония, фенола, индола, пирувата аммония) в редкие аминокислоты (тирозин, фенилаланин, триптофан, 5-окситриптофан) с участием лиаз, процессы получения органических кислот из фумаровой, ферментативная модификация нуклеиновых кислот, синтез олиго- и полипептидов. Ферментативный органический синтез, находящийся в настоящее время на стадии становления и развития, имеет огромные перспективы для существенного расширения сферы применения в ближайшем будущем.

3.4. ФЕРМЕНТЫ В МИКРОАНАЛИЗЕ

Высокая каталитическая активность и уникальная специфичность действия ферментов являются основой применения их для аналитических целей. Ферментные методы анализа характеризуются высокой чувствительностью, специфичностью, точностью, быстродействием, а также возможностью применения в сложных многокомпонентных средах. В аналитической энзимологии применяется широкий спектр ферментов, относящихся ко всем классам (оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы). При этом наряду с моноферментными системами, широко используются полиферментные системы. В настоящее время созданы, наряду с классиче-

скими фотометрическими методами регистрации, принципиально новые методы – электрохимические, био- и хемоллюминесцентные.

Ферментный анализ относится к кинетическим методам анализа, при котором искомое вещество определяют по скорости реакции, пропорциональной концентрации определяемого вещества. Например, при превращении вещества А в продукт Р: $A \rightarrow P$, концентрация последнего будет нарастать во времени, при этом начальная скорость реакции v_0 пропорциональна концентрации А: $v_0 = k [A]$, где k – константа скорости реакции. Чем выше исходная концентрация определяемого вещества, тем больше начальная скорость реакции. Предварительно построенный калибровочный график зависимости v_0 от $[A]$ позволяет определять неизвестные концентрации веществ в анализируемой смеси.

Ферментный электрод – это комбинация датчика, основой которого является ионоселективный электрод с иммобилизованным ферментом. Понятие ферментного электрода ввели Кларк и Лайон в 1962 г.; в то время использовали растворимые ферменты. В 1969 г. Гильбо и Монталво впервые описали потенциометрический ферментный электрод для определения мочевины, позволявший измерять разность потенциалов, возникающую в системе при отсутствии внешнего напряжения. Иммобилизованный фермент в конструкции электрода первыми применили Апдайк и Хикс в 1971 г., укрепив иммобилизованную в геле глюкозооксидазу на поверхности полярографического кислородного датчика (датчик вольтометрического или амперметрического типа позволяет измерять ток при наложении постоянного напряжения). С тех пор разработано свыше 100 различных конструкций ферментных электродов, некоторые из них представлены в табл. 3.7.

В ферментном электроде фермент используют обычно в иммобилизованном виде. Для этого применяют два метода: химическую модификацию молекул фермента путем введения групп, обеспечивающих нерастворимость, и физическое включение фермента в инертный носитель (крахмал, ПААГ) (рис. 3.4). Ферментный электрод используют как обычный ионоселективный электрод. Потенциометрические датчики (электроды для определения мочевины, пенициллина, аминокислот) непосредственно подключают к цифровому вольтметру; строят график зависимости потенциала (мВ) от концентрации определяемого вещества в полулогарифмических координатах.

При использовании амперметрических электродов (платинового или кислородного) для определения глюкозы, спирта применяют полярограф. При этом строят график зависимости силы тока (мкА) от концентрации вещества в линейных координатах. Вместо полярографа можно использовать устройство (адаптор), которое подает потенциал на амперметрический датчик (в случае определения глюкозы или спирта), преобразуя ток в разность потенциалов, регистрируемую вольтметром. Вместе с ферментным электродом используют электрод сравнения (например, каломельный). Последний может быть частью комбинированного ферментного

А

Электродный датчик Резиновое кольцо Нейлоновая сеточка Слой геля, содержащего фермент Диализная мембрана

Типичные ферментные электроды и их параметры (по Дж. Вудворду, 1988)

Определяемое вещество	Фермент	Датчик	Стабильность	Время реакции	Чувствительность, М/л
Мочевина	Уреаза	Катионный Газовый (NH ₃)	3 недели 1 мес.	10–60 с 2–4 мин.	10 ⁻² – 3·10 ⁻⁵ до 5·10 ⁻⁴
Глюкоза	Глюкозо-оксидаза	pH-электрод Газовый (O ₂)	1 неделя 3 недели	5–10 мин. 2–5 мин.	10 ⁻¹ – 10 ⁻³ 2·10 ⁻⁴
L-аминокислоты	Оксидаза L-аминокислот	Pt (H ₂ O ₂)	1 мес.	2 с	10 ⁻³ – 10 ⁻⁵
Спирты	Алкоголь-оксидаза	Pt (H ₂ O ₂)	1 мес.	12 с	0.5 – 100 мг/ %
Пенициллин	Пенициллиназа	pH-электрод	2 недели	0.5–2 мин.	10 ⁻² – 10 ⁻⁴
Мочевая кислота	Уратоксидаза	Pt (H ₂ O ₂)	4 мес.	30 с	10 ⁻² – 10 ⁻⁴
Нитрат	Нитрат-редуктаза	NH ₄ ⁺ Электродный датчик	2–3 мес.	2–3 мин.	10 ⁻² – 10 ⁻⁴
Нитрит	Нитрит-редуктаза	Газовый (NH ₃)	3–4 мес.	2–3 мин.	5·10 ⁻² – 5·10 ⁻⁴
Сульфат	Акрил-сульфатаза	Pt	1 мес.	1 мин.	10 ⁻¹ – 10 ⁻⁴

Рис. 3.4. Изготовление ферментных электродов (по Дж. Вудворду, 1988).
А – с использованием физически включенных ферментов, Б – химически связанных ферментов.

электрода, – датчика NH_3 , CO_2 , O_2 , на основе которых делают ферментные электроды для детекции мочевины, аминокислот, спирта и т.д. На рис. 3.5 показаны конструкции ферментных электродов.

Стабильность работы электродов главным образом зависит от способа иммобилизации фермента: правильного подбора фермента и носителя, концентрации фермента в носителе, стабильности применяемого датчика, на основе которого сделан электрод, а также от условий проведения анализа и условий хранения электрода.

Эра широкого внедрения ферментных электродов в различные сферы аналитики только начинается. Биосенсоры, помимо высокой чувствительности и быстрого действия, существенно уменьшают объем анализируемых проб, автоматизируют и упрощают схему анализа. Особенно эффективно применение ферментных методов анализа для контроля состояния окружающей среды, в пищевой и биотехнологической промышленности, в клинической аналитике, а также в научных исследованиях. Широкие перспективы открывают возможности применения мультиферментных систем, в которых один из ферментов обеспечивает специфичность реакции, а другой – детекцию продуктов этой реакции (например, перекисей). Полиферментная аналитика существенно, до 10^{-11} – 10^{-14} М, увеличивает

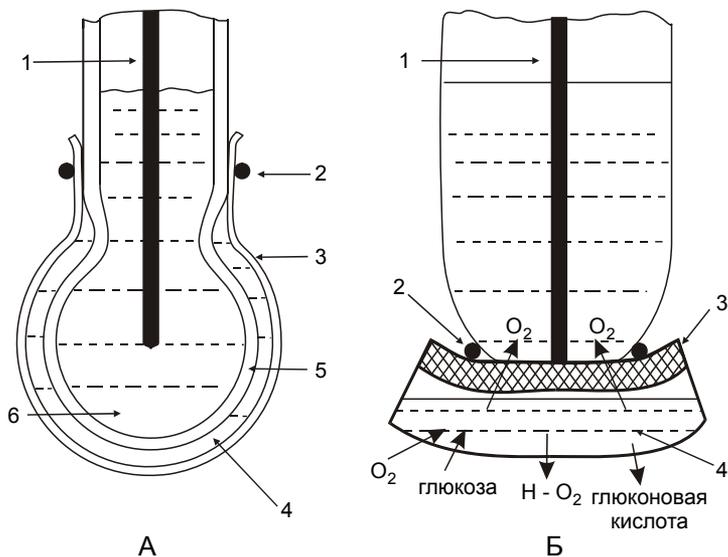


Рис. 3.5. Ферментные электроды (по Н. Н. Угаровой, 1987).

А – ферментный электрод на основе стеклянного электрода для измерения pH:

1 – металлический электрод, 2 – резиновое кольцо, 3 – полупроницаемая мембрана, 4 – слой фермента, 5 – стеклянная мембрана, проницаемая для ионов водорода, 6 – приэлектродный буферный раствор;

Б – схема электрода для определения глюкозы:

1 – катод, 2 – электрод сравнения, 3 – полупроводниковая полимерная мембрана, 4 – слой иммобилизованной глюкозооксидазы.

чувствительность анализа.

Перспективным методом анализа считают также биолюминесцентный микроанализ на основе светлячковой и бактериальной люцифераз. Эти методы анализа позволяют определять, например, АТФ и НАД с чувствительностью до 10^{-14} М. Сопряжение люцифераз с другими ферментами, катализирующими протекание реакции с образованием АТФ и НАДН, открывают широкие возможности для создания высокоспецифичных, экспрессных и высокочувствительных методов анализа.

Глава 4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

При оптимизации любого биотехнологического процесса, протекающего с участием живых организмов, основные усилия обычно направлены на улучшение их генетических свойств. Традиционно для этих целей использовали мутагенез с последующим скринингом и отбором подходящих вариантов. Сегодня в этой области произошли громадные перемены. В настоящее время разрабатываются и применяются принципиально новые методы, основанные на технологии рекомбинантных ДНК. Модификация генетического материала осуществляется разными методами: в живом организме (*in vivo*) и вне его (*in vitro*), соответственно, это два направления – **клеточная инженерия и генетическая инженерия**.

С помощью этих методов возможно получение новых высокопродуктивных продуцентов белков и пептидов человека, антигенов, вирусов и др. Развитие генетической и клеточной инженерии приводит к тому, что биотехнологическая промышленность все шире и шире завоевывает новые области производства. Фундаментом для возникновения новейших методов биотехнологии послужили открытия в генетике, молекулярной биологии, генетической энзимологии, вирусологии, микробиологии и других дисциплинах.

4.1. МЕТОДЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Быстрое внедрение новейших фундаментальных достижений в практику и существенное влияние последних на уровень теоретических исследований, свойственные биотехнологии, наиболее наглядно проявляются на примере развития генетической инженерии.

Важнейшим этапом для развития биотехнологии было выделение в середине текущего столетия молекулярной биологии в самостоятельную дисциплину. Возникновение молекулярной биологии стало возможным благодаря взаимодействию генетики, физики, химии, биологии, математики и др. Э. Чаргофф и З. Д. Хочкис, исследуя молекулярные соотношения нуклеотидных оснований в ДНК (аденин, гуанин, цитозин, тимин) показали, что у различных организмов они одинаковы. Это открытие сыграло ключевую роль в установлении структуры ДНК. Большую роль в расшифровке структуры ДНК сыграл прогресс в области генетики бактерий и бактериофагов. Было установлено (А. Херши, М. Чейз, Дж. Ледерберг, Н. Циндер), что **трандукция (перенос генетического материала)** может осуществляться с помощью бактериофага, а фаговой ДНК может принадлежать роль носителя наследственности. Б. Хейсом были выяснены также

закономерности полового процесса у бактерий (**конъюгация**), при котором из донорских клеток, имеющих **F-фактор (фертильность)** генетический материал переносится в реципиентные клетки. Дж. Уотсон и Ф. Крик предложили комплиментарную модель строения ДНК и механизм ее репликации; было раскрыто уникальное свойство ДНК – способность самовоспроизведения (**репликация**).

На базе молекулярной биологии и генетики микроорганизмов к началу 60-х гг. сформировалась молекулярная генетика. Г. Гамов в 1954 г. выдвинул гипотезу о том, что каждый **кодон** (последовательность нуклеотидов, кодирующая одну аминокислоту) должен состоять из трех нуклеотидов. В 1961 г. было подтверждено экспериментально, что первичная структура белка закодирована в ДНК в виде последовательности нуклеотидных триплетов (кодонов), каждая из которых соответствует одной из 20 аминокислот. К 1966 г. удалось получить данные о строении генетического кода.

Следующим был вопрос о том, как переносится информация с ДНК, находящейся в ядре, в цитоплазму, где реализуется синтез белка на рибосомах. Было установлено, что последовательность триплетных кодонов, хранящаяся в ДНК, **транскрибируется** (переписывается) в недолговечные молекулы информационной РНК (иРНК). Данный этап **ДНК → иРНК** был назван **транскрипцией**, а этап **иРНК → белок** – **трансляцией**. Перенос аминокислоты и определение ее местонахождения в синтезирующейся белковой молекуле осуществляет **транспортная РНК (тРНК)**. На ДНК, как на матрице, синтезируется РНК, а на РНК – белок. У некоторых вирусов отсутствует первое звено, и РНК служит для них материалом наследственности.

Механизм контроля генной активности долгое время оставался неизвестным. Большое значение имели работы Ф. Жакоба и Ж. Моно, показавшие, что у бактерий есть **структурные гены**, дающие информацию о синтезе определенных белков и **регуляторные гены**, которые осуществляют включение или выключение отдельных генов или их блоков. Далее выяснилось, что регуляция генов по этому принципу имеет место и у других организмов. Существуют также иные механизмы регуляции.

Следующим важным шагом было проведение работ по расшифровке нуклеотидных последовательностей (**секвенирование**), которое дает информацию о первичной структуре участка генома, выполняющего определенные функции. Структура и функции приобрели общее молекулярно-биологическое выражение, его суть заключается в том, что функциональные состояния выражают структурные изменения макромолекул и ассоциаций.

От изучения закономерностей функционирования генетического материала в клетке вскоре исследователи перешли к генетическим манипуляциям. Возникла новая экспериментальная технология, заключающаяся в введении в клетки чужеродных генов. Названия «генетическая (или генная) инженерия» или «работа с рекомбинантными ДНК» эквивалентны.

Суть этой технологии заключается в **восоединении фрагментов ДНК in vitro с последующим введением новых («рекомбинантных») генетических структур в живую клетку.**

В 1972 г. Берг с сотрудниками создали первую рекомбинантную молекулу ДНК, состоящую из фрагмента ДНК вируса ОВ40 и бактериофага λ dvgal с галактозным опероном *E. coli*. Инструментом для генетического конструирования стали две группы ферментов – **рестриктирующие эндонуклеазы (рестриктазы)** и **лигазы**. Первые необходимы для получения однородных фрагментов ДНК, вторые – для их соединения. Рестриктазы и лигазы в совокупности с другими ферментами (нуклеазами, обратной транскриптазой, ДНК-полимеразой и др.) обеспечивают проведение всех генноинженерных манипуляций.

Техника генетического конструирования in vitro включает несколько последовательных процедур (рис. 4.1):

- 1) получение нужного гена;
- 2) встраивание его в генетический элемент, способный к репликации (вектор);
- 3) введение гена, входящего в состав вектора, в организм-реципиент;
- 4) идентификацию (скрининг) и отбор клеток, которые приобрели желаемый ген или гены.

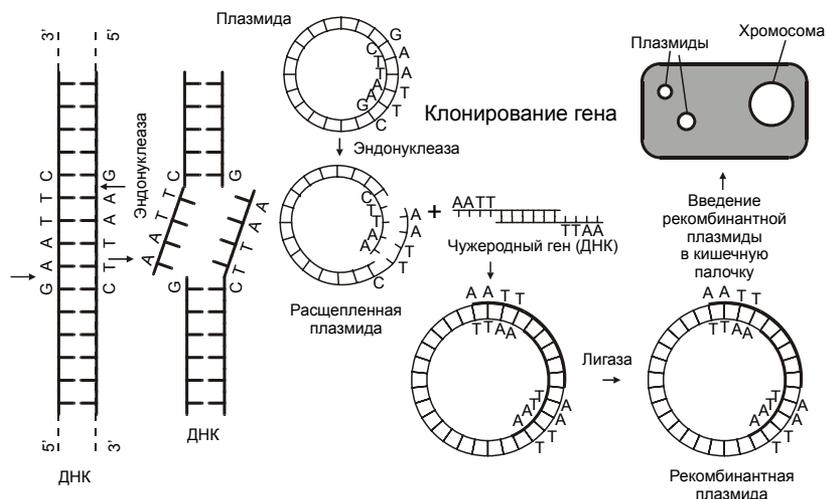


Рис. 4.1. Введение гена в плазмиду *E. coli* и клонирование рекомбинантной ДНК в клетках (по А. Сассону, 1987).

Плазмида *E. coli* расщепляется рестриктазой в обоих частях ДНК с образованием на концах неспаренных нуклеотидов (ТТАА или ААТТ). Ген выщеплен с помощью этой же рестриктазы с образованием на концах, комплиментарных плазмиде, последовательностей (ААТТ и ТТАА). Обе ДНК (гена и плазмиды) сшивают с помощью лигазы. Гибридную плазмиду вводят в *E. coli*, которая при размножении образует клон, все клетки которого содержат рекомбинантную плазмиду и чужеродный ген. Ген клонирован в бактериальной клетке и индуцирует в ней синтез белка.

Получение генов

Получение генов возможно несколькими путями: выделением из ДНК, химико-ферментным синтезом и ферментным синтезом.

Выделение генов из ДНК проводят с помощью рестриктаз, катализирующих расщепление ДНК на участках, имеющих определенные нуклеотидные последовательности (4–7 нуклеотидных пар). Расщепление можно проводить по середине узнаваемого участка нуклеотидных пар; при этом обе нити ДНК «разрезаются» на одном уровне. Образующиеся фрагменты ДНК имеют так называемые «тупые» концы. Возможно расщепление ДНК со сдвигом, при этом одна из нитей выступает на несколько нуклеотидов. Образуемые при этом «липкие» концы в силу своей комплементарности вступают во взаимодействие.

Нуклеотидную последовательность с липкими концами можно присоединить к вектору (предварительно обработанному той же рестриктазой), превратить в кольцевую в результате сшивания лигазами взаимно комплементарных концов. Метод имеет существенные недостатки, так как достаточно трудно подобрать действие ферментов для строгого вычленения нужного гена. Вместе с геном захватываются «лишние» нуклеотиды или, наоборот, ферменты отрезают часть гена, превращая его в функционально неполноценный.

Химико-ферментный синтез применяют в том случае, если известна первичная структура белка или пептида, синтез которого кодирует ген. Необходимо полное знание нуклеотидной последовательности гена. Этот метод позволяет точно воссоздать нужную последовательность нуклеотидов, а также вводить в гены участки узнавания рестриктаз, регуляторных последовательностей и пр. Метод состоит из химического синтеза одноцепочечных фрагментов ДНК (олигонуклеотидов) за счет поэтапного образования эфирных связей между нуклеотидами, обычно 8–16-звенных. В настоящее время существуют «генные машины», которые под контролем микропроцессора очень быстро синтезируют специфические короткие последовательности одноцепочечной ДНК. На рис. 4.2 показана схема такой машины, сконструированной канадской фирмой «Био лоджикэлс». Нужная последовательность оснований вводится на клавишный пульт управления. Микропроцессор открывает клапаны, через которые с помощью насоса в синтезирующую колонку последовательно поступают нуклеотиды, а также необходимые реагенты и растворители. Колонка наполнена бусинками кремния, на которых собираются молекулы ДНК. В данном устройстве возможен синтез цепей длиной до 40 нуклеотидов со скоростью 1 нуклеотид за 30 минут. Полученные олигонуклеотиды с помощью ДНК-лигазы сшиваются между собой с образованием двуцепочечного нуклеотида. С помощью данного метода были получены гены А- и В-цепей инсулина, проинсулина, соматостатина и др.

ДНК, комплиментарная мРНК (**кДНК**). Полученная **комплиментарная ДНК** (кДНК) служит матрицей для синтеза второй нити ДНК с использованием **ДНК-полимеразы** или ревертазы. Затравкой при этом служит олигонуклеотид, комплиментарный 3'-концу мРНК; новая цепь ДНК образуется из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов в присутствии ионов магния. Метод с большим успехом применен для получения в 1979 г. гена гормона роста человека (соматотропина).

Полученный тем или иным способом ген содержит информацию о структуре белка, но сам не может ее реализовать. Поэтому нужны дополнительные механизмы для управления действием гена.

Перенос генетической информации в клетку реципиента осуществляется в составе вектора. Вектор – это, как правило, кольцевая молекула ДНК, способная к самостоятельной репликации. Ген вместе с вектором образует рекомбинантную ДНК.

Конструирование рекомбинантных ДНК

При обычном введении в бактериальную клетку ДНК подвергается ферментативной атаке, в результате которой разрушается. Чтобы этого не происходило, используют векторные молекулы ДНК, способные при введении в клетку существовать автономно, а при делениях клетки – реплицироваться. Вектор также несет в своем составе генетический признак, необходимый для последующего распознавания и отбора трансгенных организмов. Обычно в качестве маркерных генов используют гены устойчивости к антибиотикам.

Конструирование рекомбинантных ДНК осуществляется *in vitro* с изолированными ДНК при помощи эндонуклеаз рестрикции, которые расщепляют вектор в одном участке, превращая его из кольцевой формы в линейную с образованием липких концов, комплиментарных концам вводимой ДНК. Комплиментарные концы вектора и вводимого гена сшиваются лигазой. Полученную рекомбинантную ДНК с помощью той же ДНК-лигазы замыкают с образованием кольцевой молекулы.

В качестве векторов используют плазмиды и вирусы. Вирусы быстро транспортируются из клетки в клетку, за короткое время способны быстро заразить весь организм. Важной проблемой при их использовании является аттенюация – ослабление патогенности для хозяина; таким образом, не очевидно, что зараженные вирусом клетки выживут и смогут передавать потомству измененную генетическую программу. Наиболее распространенными векторами являются многокопийные плазмиды с молекулярной массой 3–10 кб. Первые плазмиды были выделены из бактерий, впоследствии их стали конструировать методами генной инженерии.

Использование векторов общего назначения методически – несложная задача, не требующая специального оборудования. Наиболее используемыми плазмидными векторами для клонирования являются плазмиды *E. coli* (pBR322, pBR325, pACYC117, pACYC 184), а также сконструирован-

ные на основе плазмиды CoIE1. Современные плазмидные векторы в присутствии хлорамфеникола способны к репликации, независимо от деления хромосомы, количество копий плазмид при этом может возрастать до $1-2 \cdot 10^3$ копий на клетку.

При получении библиотеки генов растений и высших животных, у которых общая длина генома составляет до $3 \cdot 10^9$ и более, емкость вектора часто играет решающую роль. В данном случае в качестве вектора используют ДНК фага λ . При помощи специальных методов рекомбинантные ДНК вводят прямо в фаговые головки. Еще большей емкостью обладают плазмиды – космиды (до 40 кб), у которых *cos*-фрагмент генома фага λ , участвует в упаковке ДНК в фаговую частицу на конечной стадии развития. Для упаковки ДНК необходимо, чтобы ДНК содержала *COS*-участок и ее размер был примерно равным размеру генома ага I. Достигнутые методы упаковки ДНК в фаговую головку при помощи космид позволяют получать библиотеки генов практически любых организмов.

Перенос генов в клетки организма-реципиента

Перенос рекомбинантных ДНК осуществляется путем **трансформации** или **конъюгации**. Трансформация – это процесс изменения генетических свойств клетки в результате проникновения в нее чужеродной ДНК. Впервые она была обнаружена у пневмококков Ф. Гиффитом, который показал, что некоторые клетки невирулентных штаммов бактерий при заражении ими мышей совместно с вирулентными штаммами приобретают патогенные свойства. В дальнейшем трансформация была продемонстрирована и изучена у различных видов бактерий.

Установлено, что к трансформации способны лишь некоторые, так называемые «компетентные», клетки (способные включать чужеродную ДНК и синтезирующие особый трансформирующий белок). Компетентность клетки определяется также факторами внешней среды. Этому может способствовать обработка клеток полиэтиленгликолем или хлоридом кальция. После проникновения в клетку одна из нитей рекомбинантной ДНК деградирует, а другая за счет рекомбинации с гомологичным участком реципиентной ДНК может включиться в хромосому или внехромосомную единицу. Трансформация является наиболее универсальным способом передачи генетической информации и имеет наибольшее значение для генетических технологий.

Конъюгация – один из способов обмена генетического материала, при котором происходит однонаправленный перенос генетической информации от донора к реципиенту. Этот перенос находится под контролем особых конъюгативных плазмид (фактор фертильности). Перенос информации от донорской клетки в реципиентную осуществляется через специальные половые ворсинки (пили). Возможна передача информации и с помощью неконъюгативных плазмид при участии плазмид-помощниц.

Передача всего набора генов вируса или фага, приводящая к развитию в клетке фаговых частиц, называется **трансфекцией**. Методика применительно к бактериальным клеткам включает получение сферопластов, очистку инкубационной среды от нуклеаз и добавление очищенной фаговой ДНК (присутствие протаминсульфата повышает эффективность трансфекции). Методика применима к животным и растительным клеткам с участием специальных челночных вирусных векторов.

Скрининг и отбор рекомбинантных клеток

После переноса сконструированных ДНК, как правило, лишь небольшая часть реципиентных клеток приобретает необходимый ген. Поэтому очень важным этапом является идентификация клеток, несущих ген-мишень.

На первой стадии идентифицируют и отбирают клетки, несущие вектор, на основе которого осуществлен перенос ДНК. Отбор проводят по генетическим маркерам, которыми помечен вектор. Главным образом маркерами являются гены устойчивости к антибиотикам. Поэтому отбор проводят высевом клеток на среды, содержащие конкретный антибиотик. После высева на этих средах вырастают только клетки, в составе которых находится вектор с генами антибиотиковой устойчивости.

На второй стадии отбирают клетки, несущие вектор и ген-мишень. Для этого используют две группы методов: 1) основанные на непосредственном анализе ДНК клеток-реципиентов и 2) основанные на идентификации признака, кодируемого геном-мишенью. При использовании первой группы методов из клеток, предположительно содержащих нужный ген, выделяют векторную ДНК, и в ней проводится поиск участков, несущих данный ген. Далее проводят секвенирование части нуклеотидной последовательности гена. Возможен другой метод – гибридизация выделенной из клеток ДНК с зондом (искомый ген или соответствующая ему мРНК); выделенную ДНК переводят в одноцепочечное состояние и вводят ее во взаимодействие с зондом. Далее определяют наличие двуцепочечных гибридных молекул ДНК. Во втором варианте возможен непосредственный отбор клеток, синтезирующих белок – продукт транскрипции и трансляции гена-мишени. Применяются также селективные среды, поддерживающие рост только клеток, приобретших ген-мишень.

С помощью методов генетической инженерии возможно конструирование новых форм микроорганизмов по заданному плану, способных синтезировать разнообразные продукты, в том числе эукариотических организмов. Рекомбинантные микробные клетки быстро размножаются в контролируемых условиях и способны утилизировать при этом разнообразные, в том числе, недорогие субстраты.

Основные проблемы, возникающие при генетических манипуляциях, заключаются в следующем: 1) гены при трансформации, попадая в чужеродную среду, подвергаются воздействию протеаз, поэтому их надо защищать; 2) как правило, продукт трансплантированного гена аккумулирует

ется в клетках и не выделяется в среду; 3) большинство желаемых признаков кодируется не одним, а группой генов. Все это существенно затрудняет перенос и требует разработки технологии последовательной трансплантации каждого гена.

К настоящему времени генетическая инженерия освоила все царства живого. Фенотипическое выражение «чужих» генов (**экспрессия**) получены у бактерий, дрожжей, грибов, растений и животных. Блестящие успехи достигнуты на клетках наиболее и всесторонне изученных микроорганизмов. Эра рекомбинантных ДНК применительно к растениям и высшим животным только начинается. В области генетической инженерии животных клонированы гены β -глобина мышей, фага λ . Помимо почечных клеток зеленой африканской мартышки, испытываются все новые виды культуры животных клеток, в том числе клетки человека. Например, в клетках непарного шелкопряда с применением вирусного вектора удалось добиться экспрессии гена β -интерферона человека. Этот ген также клонирован в клетках млекопитающих. В генетической инженерии человека, как и в генетическом конструировании растений, пока не достигнуто тканеспецифического выражения генов. Решения данной проблемы ищут на путях введения определенных промоторов регуляторных участков в конструируемые векторы. Пока остается достаточно отдаленной задачей возможность улучшения сельскохозяйственных пород животных. К настоящему времени практически нет сведений по генетике таких признаков, как плодовитость, выход и жирность молока, повышение устойчивости к болезням и др. Это препятствует попыткам генетических манипуляций в данной области.

Генетическая инженерия дает в руки биотехнологов не только новые продуценты ценных соединений, но и улучшает и повышает эффективность ценных свойств уже традиционно используемых организмов. Распространенным методом повышения выхода полезного продукта является **амплификация – увеличение числа копий генов**. Образование многих целевых продуктов (аминокислот, витаминов, антибиотиков и др.) характеризуется длинным биохимическим путем синтеза, который управляется не одним, а десятками генов. Выделение этих генов и клонирование с помощью амплификации представляет довольно трудную, но в ряде случаев возможную задачу. Повышение выхода полезного продукта достигается также с помощью **локализованного (сайт-специфического) мутагенеза in vitro**: с использованием химического мутагенеза обрабатывается не весь геном клетки, а его фрагмент, полученный с помощью рестрикции.

4.2. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ПРОМЫШЛЕННО ВАЖНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ

Развитие техники рекомбинантных ДНК позволяет проводить выделение генов эукариот и экспрессировать их в гетерологических системах. В

настоящее время методы генетической инженерии позволяют конструировать генетические системы, способные функционировать в клетках прокариот и эукариот. Эти возможности позволяют создавать организмы, обладающие новыми ценными свойствами, например, бактериальные штаммы, способные синтезировать эукариотические белки.

Среди белковых продуктов, представляющих большой интерес, выделяются такие биологически активные вещества, как гормоны. Важное место среди них занимают белковые и пептидные гормоны. Эти гормоны, многие из которых остро необходимы в медицине, до недавнего времени получали экстракцией из тканей животных при условии, что гормон не обладает выраженной видовой специфичностью. Сравнительно короткие пептидные гормоны пытались получать химическим синтезом. Но такой путь получения оказался нерентабельным уже для молекул, состоящих из нескольких десятков звеньев. Единственным источником гормонов с крайне выраженной видовой специфичностью (гормон роста соматотропин) были органы умерших людей.

Успехи генетической инженерии вселили надежды на возможность клонирования генов синтеза ряда гормонов в микробных клетках. Эти надежды в значительной мере оправдались, в первую очередь, на примере микробиологического синтеза пептидных гормонов.

Первые успешные результаты по экспрессии химически синтезированной последовательности нуклеотидов ДНК, кодирующей 14-звенный пептидный гормон соматостатин (антагонист соматотропина), получены в 1977 г. в США компанией «Генетек». Для предотвращения процесса разрушения гормона в бактериальных клетках под воздействием пептидазы авторы применили подход, который потом был успешно использован для получения других пептидных гормонов. Был сконструирован гибридный ген, часть которого была взята из гена фермента β -галактозидазы кишечной палочки, а остаток представлял собой фрагмент, кодирующий собственно соматостатин (фрагмент синтезировали химически). Введенный в бактериальные клетки гибридный ген направлял синтез белка-химеры, состоящего более чем на 90 % из аминокислотной последовательности β -галактозидазы. Остальная часть представляла собой соматостатин. На стыке участка двух исходных генов находился кодон аминокислоты метионина. Последнее позволило обработать гибридный белок бромцианом, разрывающим пептидную связь, образованную метионином; среди продуктов расщепления был обнаружен соматостатин. Данный подход был использован для получения многих пептидных гормонов (А- и В-цепей инсулина, нейропептида лейэнкефалина, брадикинина, ангиотензина и др.).

Генноинженерными методами за короткий срок были созданы микроорганизмы-суперпродуценты, позволяющие получать с высокими выходами ряд белков вирусов и животных. Созданы штаммы, у которых до

20 % клеточного белка составляют генноинженерные продукты, например, коровий антиген вируса гепатита В, главный капсидный антиген вируса ящура, реннин телянка, поверхностный антиген вируса гепатита В и др.

Получение рекомбинантного инсулина

Гормон инсулин построен из двух полипептидных цепей, А и В, длиной 20 и 30 аминокислот соответственно. Последовательность цепей была установлена в 1955 г. Сэнгером. Синтез обеих цепей, включающий 170 химических реакций, в 1963 г. был реализован в США, ФРГ и Китае. Но перенести такой сложный процесс в промышленность оказалось невозможным. Получали инсулин до 1980 г. за счет выделения его из поджелудочной железы (поджелудочная железа коровы весит 200–250 г., а для получения 100 г кристаллического инсулина требуется до 1 кг исходного сырья). Поэтому потребности в нем удовлетворяли не полностью. Так, в 1979 г. из 6 млн. зарегистрированных больных сахарным диабетом инсулин получали только 4 млн. человек. В 1980 г. датская компания «Ново индастри» разработала метод превращения инсулина свиньи в инсулин человека ферментативным замещением остатка аланина, который является 30-й аминокислотой в цепи В, на остаток треонина. В результате был получен однокомпонентный инсулин человека 99 % чистоты. В организме животного две полипептидные цепи исходно являются частями одной белковой молекулы длиной 109 аминокислот – это препроинсулин. При синтезе в клетках поджелудочной железы первые 23 аминокислоты служат сигналом для транспорта молекулы сквозь мембрану клетки. Эти аминокислоты отщепляются, и образуется проинсулин длиной 86 аминокислот.

В 1980 г. Гилберт с коллегами выделили мРНК инсулина из опухоли β -клеток поджелудочной железы крысы (в то время не разрешали манипулировать генами человека) (рис. 4.3). Полученную ДНК-копию мРНК встроили в плазмиду рBR 322, в среднюю часть гена пенициллиназы (фермент в норме выделяется из клетки), которую транспортировали в бактерию. Сконструированная плаزمид, как оказалось, содержала информацию о структуре проинсулина, а не препроинсулина. При трансляции мРНК в клетках *E. coli* синтезировался гибридный белок, содержащий последовательности пенициллиназы и проинсулина. Гормон из этого белка выщепляли трипсином. Было доказано, что полученный таким образом белок влияет на сахарный обмен аналогично гормону поджелудочной железы. В 1979 г. в США в течение трех месяцев синтезировали гены, кодирующие А- и В-цепи инсулина; гены были собраны из 18 и 11 олигонуклеотидов соответственно. Далее гены были встроены, как и при получении соматостатина, в плазмиду в конце гена β -галактозидазы кишечной палочки.

В клетках *E. coli* также осуществлен синтез проинсулина, а не только его отдельных цепей. На выделенной матричной мРНК синтезировали ДНК-копию. Синтез проинсулина имеет определенные преимущества, так как процедуры экстракции и очистки гормона минимальны.

Совершенствование техники получения генноинженерных штаммов-продуцентов с помощью различных приемов (амплификацией плазмид, инкапсулированием вводимых рекомбинантных ДНК, подавлением протеолитической активности реципиентных клеток) позволило получить высокие выходы гормона, до 200 мг/л культуры. Медико-биологические и клинические испытания генноинженерного белка показали пригодность препарата, и в 1982 г. он был допущен к производству во многих странах.

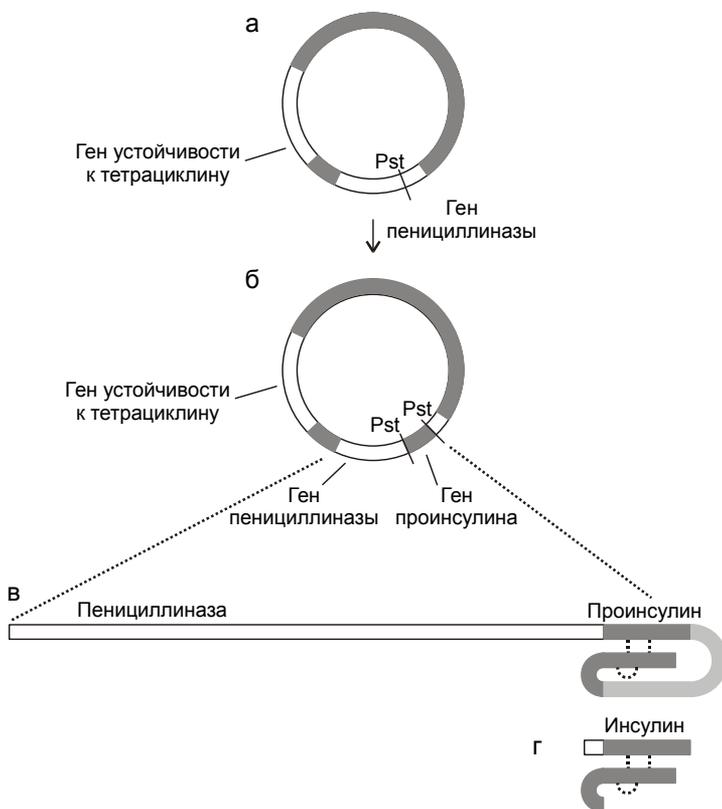


Рис. 4.3. Биосинтез инсулина крысы в сконструированных клетках *E. coli* (по Gilbert e.a., 1980).

- а) карта плазмиды pBR322 с двумя генами – пенициллиназы и устойчивости к тетрациклину;
 б) карта, полученная при определении последовательности кДНК рекомбинантной плазмиды в продуцирующем инсулин клоне *E. coli*; в) гибридный белок; г) биологически активный инсулин после удаления пенициллиназы и сегмента проинсулина.

Биосинтез соматотропина

Соматотропин (гипофизарный гормон роста) впервые был выделен в 1963 г. из трупного материала. Выход гормона из одного гипофиза составлял около 4–6 мг в пересчете на готовый фармацевтический препарат. Для лечения карликовости необходимая доза составляет 6 мг в неделю в течение года. Кроме недостатка по массе, получаемый экстракцией препарат был гетерогенным, против него вырабатывались антитела, которые сводили на нет действие гормона. Более того, существовала опасность,

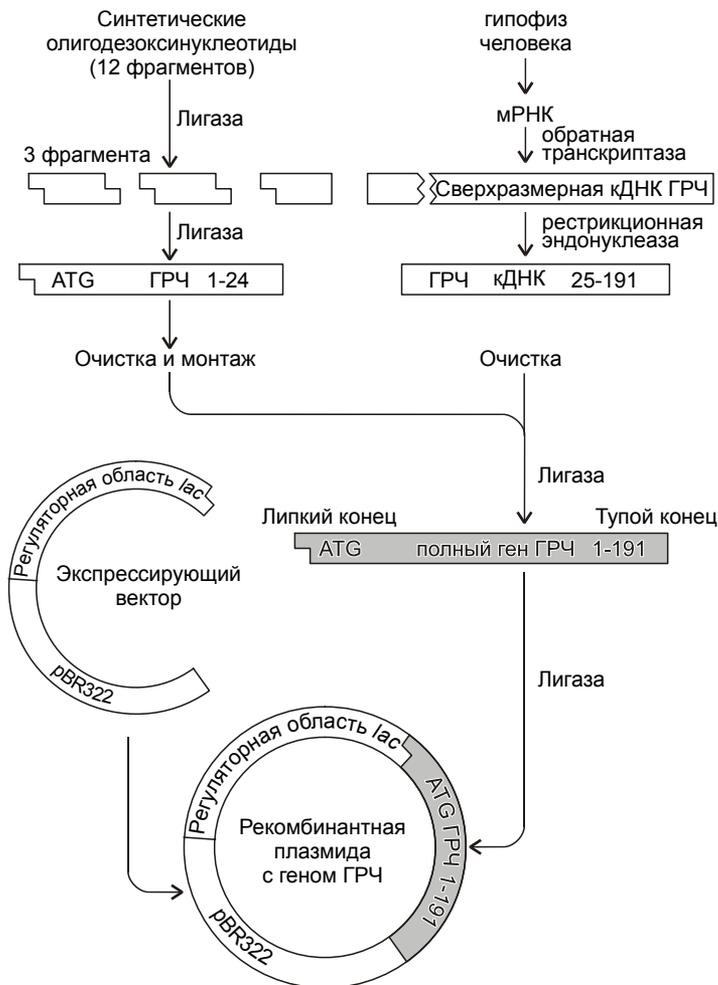


Рис. 4.4. Схема конструирования гена соматотропина комбинацией химического синтеза и выделения природной мРНК (по P. Newmark, 1979).

что при получении препарата могло произойти заражение организма медленно развивающимися вирусами. Поэтому дети, получавшие данный препарат, нуждались в многолетнем медицинском наблюдении.

Генноинженерный препарат имеет несомненные преимущества: доступен в больших количествах, гомогенен, не содержит вирусов. Синтез соматотропина, состоящего из 191 аминокислотного остатка, был осуществлен в США Гедделем с сотрудниками в 1979 г. (компания «Генентек») (рис. 4.4).

При химико-ферментном синтезе ДНК получается ген, кодирующий предшественник соматотропина, поэтому был выбран специальный путь клонирования. На первом этапе клонировали двунитевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестриктазами получали последовательность, кодирующую всю аминокислотную последовательность гормона, кроме первых 23 аминокислот. Далее клонировали синтетический полинуклеотид, соответствующий этим 23 аминокислотам со стартовым ANG кодоном в начале. Два полученных фрагмента соединяли и подстраивали к паре *lac*-промоторов и участку связывания рибосом. Сконструированный ген трансплантировали в *E. coli*. Синтезируемый в бактериях гормон обладал требуемой молекулярной массой, не был связан с каким-либо белком; его выход составлял около 100 000 молекул на клетку. Гормон, однако, содержал на N-конце полипептидной цепи дополнительный остаток метионина; при удалении последнего выход гормона был низким.

В 1980 г. были получены доказательства того, что генноинженерный соматотропин обладает биологической активностью нативного гормона. Клинические испытания препарата также прошли успешно. В 1982 г. гормон был получен также на основе сконструированной кишечной палочки в Институте Пастера в Париже. Стоимость гормона к 1990 г. снизилась до 5 долларов/ед. В настоящее время его начинают применять в животноводстве для стимулирования роста домашнего скота, удоев и др.

Получение интерферонов

Интерфероны – группа белков, способных продуцироваться в ядерных клетках позвоночных. Это мощные индуцибельные белки, являющиеся фактором неспецифической резистентности, поддерживающего гомеостаз организма. Система интерферонов обладает регуляторной функцией в организме, так как способна модифицировать различные биохимические процессы. Интерфероны позвоночных, в том числе человека, разделяют на три группы: α , β , γ , соответственно, лейкоцитарные, фибробластные и иммунные.

В конце 70-х гг. стала очевидной потенциальная значимость интерферонов для медицины, в том числе профилактики онкологических заболеваний. Клинические испытания сдерживались отсутствием достаточных количеств интерферонов и высокой стоимостью препаратов, полученных традиционным способом (выделение из крови). Так, в 1978 г. для получения 0.1 г чистого интерферона в Центральной лаборатории здравоохране-

ния Хельсинки (лаборатория – мировой лидер по производству интерферона из лейкоцитов здоровых людей) получали при переработке 50 000 л крови. Полученное количество препарата оценочно могло обеспечить лечение против вирусной инфекции 10 000 случаев. Перспективы получения интерферонов связывали с генной инженерией.

В 1980 г. Гилберту и Вейсману в США удалось получить интерферон в генетически сконструированной *E. coli*. Исходная трудность, с которой они столкнулись, – низкий уровень мРНК в лейкоцитах, даже стимулированных заражением вирусом. При переработке 17 л крови удалось выделить мРНК и получить ДНК-копию. Последнюю встроили в плазмиду и клонировали в *E. coli*. Было испытано свыше 20 000 клонов. Отдельные клоны были способны к синтезу интерферона, но с низким выходом, 1–2 молекулы на клетку. Аналогичные исследования проводили в Японии, Англии, Франции, России.

В 1980 г. были установлены нуклеотидные последовательности α - и β -интерферонов: мРНК фибробластного интерферона состоит из 836 нуклеотидов; из них 72 и 203 нуклеотида приходятся на 5'- и 3'-нетранслируемые области, 63 кодируют пептид, ответственный за секрецию интерферона из клеток и 498 нуклеотидов кодируют 166 аминокислотных остатков собственно интерферона. После этого химическим синтезом были получены гены α - и β -интерферонов, которые клонировали в *E. coli*. В 1981 г. была расшифрована нуклеотидная последовательность иммунного интерферона, существенно отличающегося от первых двух, но сравнимого по величине молекулы. Существенным моментом был полный синтез гена лейкоцитарного интерферона человека, осуществленный в Великобритании сотрудниками фирмы «Имperial кемикал индастри» и Школы биологических наук Лестерского университета. В течение полутора лет была синтезирована полная последовательность ДНК-копии интерферона, способная кодировать α_1 -интерферон. Синтез олигонуклеотидов был осуществлен новым методом, существенно ускорившим синтез гена. Вначале к полиакриламидной смоле был присоединен нуклеотид; далее проводили присоединение пар нуклеотидов, используя конденсирующий агент в безводном пиридине. Каждый цикл длился полтора часа, поэтому в течение года можно было синтезировать последовательность длиной в 5000 нуклеотидов. Было синтезировано 67 олигонуклеотидов, которые с помощью лигазы соединили в двунитевую ДНК, состоящую из 514 пар нуклеотидов. Полученный ген встраивали в клетки двух бактерий: *E. coli*, *Methylophilus methylotrophus*, и была получена экспрессия.

Усилия, направленные на получение генноинженерных интерферонов, по сравнению с методом культуры клеток позволили снизить затраты более чем в 100 раз. Были получены различные типы интерферонов на основе генноинженерных клеток бактерий и дрожжей. Это позволило развернуть медико-биологические и клинические испытания препаратов. Полу-

чаемые в течение 1980–1981 гг. препараты интерферонов были очищены на 80 % и обладали удельной активностью более 10⁷ международных единиц на 1 мг белка. Расширение клинических испытаний интерферонов, начатых в этот период, зависит от повышения степени его очистки. Прогресс в этом направлении был достигнут применением моноклональных антител, которые можно использовать для аффинной хроматографии (при этом нужные белки задерживаются на колонке с антителами).

4.3. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Традиционно для получения более активных биологических агентов применяли селекцию и мутагенез. **Селекция – это направленный отбор мутантов** – организмов, наследственность которых приобрела скачкообразное изменение в результате структурной модификации в нуклеотидной последовательности ДНК. Генеральный путь селекции – это путь от слепого отбора нужных продуцентов к сознательному конструированию их генома. Традиционные методы отбора в свое время сыграли важную роль в развитии различных технологий с использованием микроорганизмов. Были отобраны штаммы пивных, винных, пекарских, уксуснокислых и др. микроорганизмов. Ограничения метода селекции связано с низкой частотой спонтанных мутаций, приводящих к изменению в геноме. Ген должен удвоиться в среднем 10⁶–10⁸, чтобы возникла мутация.

К существенному ускорению процесса селекции ведет **индуцированный мутагенез** (резкое увеличение частоты мутаций биологического объекта при искусственном повреждении генома). Мутагенным действием обладают ультрафиолетовое и рентгеновское излучение, ряд химических соединений (азотистая кислота, бромурацил, антибиотики и пр.). После обработки популяции мутагеном проводят тотальный скрининг (проверку) полученных клонов и отбирают наиболее продуктивные. Проводят повторную обработку отобранных клонов, и вновь отбирают продуктивные клоны, то есть проводят ступенчатый отбор по интересующему признаку.

Работа эта требует больших трудозатрат и времени. Недостатки ступенчатого отбора могут быть в значительной степени преодолены при сочетании его с методами генетического обмена.

Генетическое конструирование in vivo (клеточная инженерия) включает получение и выделение мутантов и использование различных способов обмена наследственной информацией живых клеток.

Основой клеточной инженерии является слияние неполовых клеток (гибридизация соматических клеток) с образованием единого целого. Слияние клеток может быть полным, или клетка-реципиент может приобрести отдельные части донорской клетки (митохондрии, цитоплазму, ядерный геном, хлоропласты и др.). К рекомбинации ведут различные процессы обмена генетической информацией живых клеток (половой и парасексуальный процесс эукариотических клеток; конъюгация, транс-

формация и трансдукция у прокариот, а также универсальный метод – слияние протопластов).

При гибридизации берут генетически маркированные штаммы микроорганизмов (чаще ауксотрофные мутанты или мутанты, устойчивые к ингибиторам роста). В результате слияния клеток (копуляции) происходит образование гибридов у дрожжей, грибов, водорослей. Если исходные клетки были гаплоидными, в результате слияния ядер появляется диплоидная клетка (зигота), несущая в ядре двойной набор хромосом. У отдельных представителей ядро сразу подвергается мейозу, в ходе которого каждая из хромосом расщепляется. Гомологичные хромосомы образуют пары и обмениваются частями своих хроматид в результате кроссинговера. Далее формируются гаплоидные половые споры, каждая из которых содержит набор генов, которыми различались родительские клетки, в результате рекомбинации генов одной и той же хромосомы, а также разных хромосом при распределении хромосомных пар. Если после слияния ядра не сливаются, образуются формы со смешанной цитоплазмой и ядрами разного происхождения (гетерокарионы). Такие формы свойственны грибам, особенно продуцентам пенициллинов. При размножении полученных гетерозиготных диплоидов или гетерокарионов происходит расщепление – проявление в потомстве, обнаруживающих не только доминантные, но и рецессивные признаки родителей. Половой и парасексуальный процесс широко используют в генетической практике промышленно важных микроорганизмов-продуцентов.

У бактерий обмен генетической информацией происходит в результате взаимодействия **конъюгативных плазмид (конъюгации)**. Впервые конъюгацию наблюдали у *E. coli* K-12. Для конъюгационного скрещивания культуру донора и реципиента смешивают и совместно инкубируют в питательном бульоне или на поверхности агаризованных сред. Клетки при помощи образующегося конъюгационного мостика соединяются между собой; через мостик осуществляется передача определенного сайта плазмидной хромосомы к реципиенту. Так, при 37°C для переноса всей хромосомы требуется около 90 минут. Конъюгация открыла и открывает широкие перспективы для генетического анализа и конструирования штаммов.

Трансдукция – процесс переноса генетической информации от клетки реципиента к клетке-донору с помощью фага. Впервые этот процесс был описан в 1952 г. Циндером и Лидербергом. Трансдукция основана на том, что в процессе размножения фагов в бактериях возможно образование частиц, которые содержат фаговую ДНК и фрагменты бактериальной ДНК. Для осуществления трансдукции нужно размножить фаг в клетках штамма-донора, а затем заразить им клетки-реципиента. Отбор рекомбинантных форм проводят на селективных средах, не поддерживающих роста исходных форм.

В последние годы очень широко применяют **метод слияния протопластов**. Этот метод, видимо, является универсальным способом введения генетической информации в клетки различного происхождения. Простота метода делает его доступным для селекции промышленно важных продуцентов. Метод открывает новые возможности для получения межвидовых и межродовых гибридов и скрещивания филогенетически отдаленных форм живого. Получены положительные результаты слияния бактериальных, дрожжевых и растительных клеток. Получены межвидовые и межродовые гибриды дрожжей. Имеются данные о слиянии клеток различных видов бактерий и грибов. Удалось получить гибридные клетки в результате слияния клеток организмов, относящихся к различным царствам: животного и растительного. Ядерные клетки лягушки были слиты с протопластами моркови; гибридная растительно-животная клетка росла на средах для растительных клеток, однако, достаточно быстро утрачивала ядро и покрывалась клеточной стенкой.

Достаточно успешно в последние годы проводятся работы по созданию ассоциаций клеток различных организмов, то есть получают смешанные культуры клеток двух или более организмов с целью создания искусственных симбиозов. Успешно проведены опыты по введению азотфиксирующего организма *Anabaena variabilis* в растения табака. Попытки введения *A. variabilis* непосредственно в черенки зрелых растений табака не дали положительных результатов. Но при совместном культивировании мезофильной ткани табака и цианобактерий удалось получить растения-регенеранты, содержащие цианобактерии. Получены ассоциации клеток женьшеня и паслена с цианобактерией *Chlorogleae fritschii*.

Перспективно клональное размножение животных клеток для генетических манипуляций. Большие перспективы имеет техника клеточных культур животных клеток для получения биологически активных соединений, хотя делает пока только первые шаги. Культуры опухолевых клеток или нормальные клетки, трансформированные *in vitro*, сохраняют в ряде случаев способность синтезировать специфические продукты. Несмотря на много, пока не преодоленных трудностей, показана возможность получения ряда веществ в культуре животных клеток:

Продукт	Клетки или их источник
Гормон роста	Опухоль гипофиза
Коллаген	Фибробласты
Кортикостероиды	Опухоль надпочечника
Гистамин	Опухоль из тучных клеток
Меланин	Меланома радужной оболочки сетчатки
Мукополисахариды	Фибробласты
Фактор роста нервной ткани	Нейробластома

Важное направление клеточной инженерии связано с ранними эмбриональными стадиями. Так, оплодотворение яйцеклеток в пробирке позволяет

преодолеть бесплодие. С помощью инъекции гормонов можно получить от одного животного десятки яйцеклеток, искусственно их оплодотворить *in vitro* и имплантировать в матку других животных. Эта технология применяется в животноводстве для получения монозиготных близнецов. Разработан новый метод, основанный на способности индивидуальных клеток раннего эмбриона развиваться в нормальный плод. Клетки эмбриона разделяют на несколько равных частей и трансплантируют реципиентам. Это позволяет размножать различных животных ускоренным путем. Манипуляции на эмбрионах используют для создания эмбрионов различных животных. Подход позволяет преодолеть межвидовой барьер и создавать химерных животных. Таким образом получены, например, овце-козлиные химеры.

Наиболее перспективным направлением клеточной инженерии является **гибридная технология**. Гибридные клетки (**гибридомы**) образуются в результате слияния клеток с различными генетическими программами, например, нормальных дифференцированных и трансформированных клеток. Блестящим примером достижения данной технологии являются гибридомы, полученные в результате слияния нормальных лимфоцитов и миеломных клеток. Эти гибридные клетки обладают способностью к синтезу специфических антител, а также к неограниченному росту в процессе культивирования.

В отличие от традиционной техники получения антител, гибридная техника впервые позволила получить моноклональные антитела (антитела, продуцируемые потомками одной-единственной клетки). Моноклональные антитела высокоспецифичны, они направлены против одной антигенной детерминанты. Возможно получение нескольких моноклональных антител на разные антигенные детерминанты, в том числе сложные макромолекулы.

Моноклональные антитела в промышленных масштабах получены сравнительно недавно. Как известно, нормальная иммунная система способна в ответ на чужеродные агенты (антигены) вырабатывать до миллиона различных видов антител, а злокачественная клетка синтезирует только антитела одного типа. Миеломные клетки быстро размножаются. Поэтому культуру, полученную от единственной миеломной клетки, можно поддерживать очень долго. Однако невозможно заставить миеломные клетки вырабатывать антитела к определенному антигену. Эту проблему удалось решить в 1975 г. Цезарю Мильштейну. У сотрудников Медицинской научно-исследовательской лаборатории молекулярной биологии в Кембридже возникла идея слияния клеток мышинной миеломы с В-лимфоцитами из селезенки мыши, иммунизированной каким-либо специфическим антигеном. Образующиеся в результате слияния гибридные клетки приобретают свойства обеих родительских клеток: бессмертие и способность секретировать огромное количество какого-либо одного антитела определенного типа (рис. 4.5). Эти работы имели огромное значение и открыли новую эру в экспериментальной иммунологии.

В 1980 г. Карло М. Кроче с сотрудниками (США) удалось создать стабильную, продуцирующую антигены, внутривидовую человеческую гибридому путем слияния В-лимфоцитов миеломного больного с периферическими лимфоцитами от больного с подострым панэнцефалитом.

Основные этапы получения гибридомной техники следующие. Мышей иммунизируют антигеном, после этого из селезенки выделяют спленоциты, которые в присутствии полиэтиленгликоля сливают с дефектными опухолевыми клетками (обычно дефектными по ферментам запасного пути биосинтеза нуклеотидов – гипоксантина или тиаминина). Далее на селективной среде, позволяющей размножаться только гибридным клеткам, проводят их отбор. Питательную среду с растущими гибридами тести-

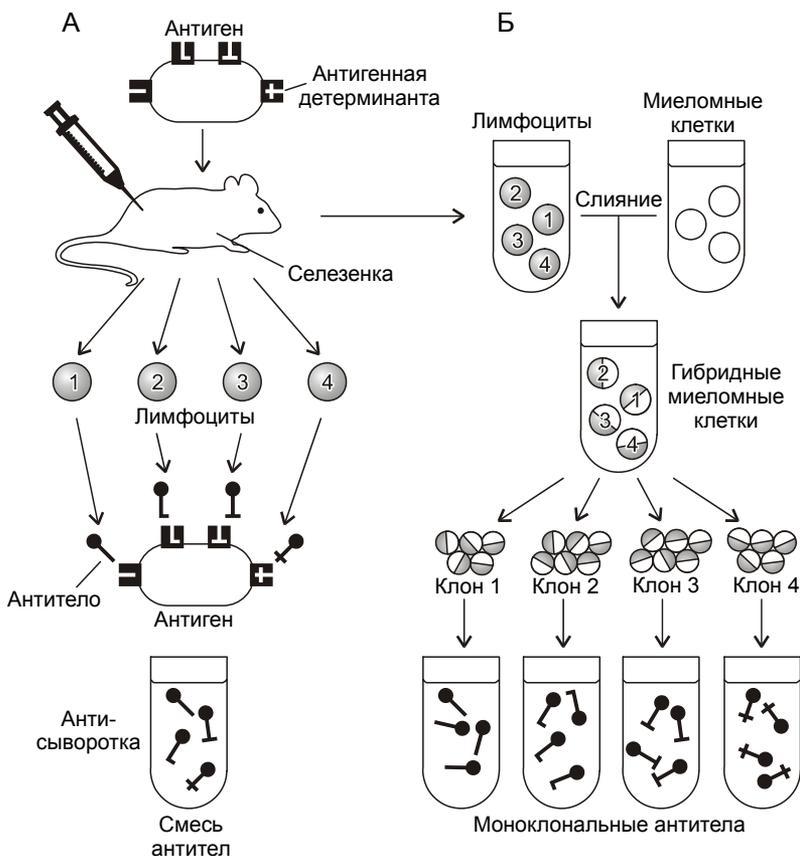


Рис. 4.5. Схема продукции моноклональных антител гибридомой,

образованной лимфоцитами и миеломными клетками (по Г. Фаффу, 1984).

А – антиген с 4 антигенными детерминантами на поверхности; после инъекции антигена лимфоциты мыши продуцируют 4 типа антител; антисыворотка из крови мыши содержит смесь антител; Б – лимфоциты сливаются с миеломными клетками; гибридные клетки (источник чистых антител) клонируют.

Возможные области и способы применения антител (по И. Хиггинсу, 1988)

Область медицины	Способ применения
Анализ	Структурные зонды для идентификации поверхностных особенностей клеток
Диагностика	Наборы реактивов для диагностики беременности Выявление эстрогенных рецепторов для диагностики рака молочной железы
Иммунодиагностика	Точное определение количества специфических антигенов
Иммуноочистка	Очистка антигенов (например, интерферона)
Терапия	Направленный перенос токсинов в раковые клетки, инактивация ядов, пассивная иммунизация, лечение аутоиммунных болезней

руют на присутствие антител. Положительные культуры отбирают и клонируют. Клоны инъецируют животным с целью образования опухоли, продуцирующей антитела, либо наращивают их в культуре. Асцитная жидкость мыши может содержать до 10–30 мг/мл моноклональных антител.

Гибридомы можно хранить в замороженном состоянии, и в любое время вводить дозу такого клона в животное той линии, от которой получены клетки для слияния. В настоящее время созданы банки моноклональных антител. Антитела применяют в разнообразных диагностических и терапевтических целях, включая противораковое лечение (таблица 4.1).

Эффективным способом применения моноклональных антител в терапии является связывание их с цитотоксическими ядами. Антитела, конъюгированные с ядами, отслеживают и уничтожают в макроорганизме раковые клетки определенной специфичности.

Таким образом, клеточная инженерия является эффективным способом модификации биологических объектов и позволяет получать новые ценные продуценты на органном и также клеточном и тканевом уровнях.

Глава 5. ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ БИОЭНЕРГЕТИКА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА МИНЕРАЛЬНОГО СЫРЬЯ

Необходимость разработки новых и эффективных способов производства энергетических носителей и восполнения сырьевых ресурсов стала особенно актуальной в последние два десятилетия из-за острого дефицита сырья и энергии в глобальном масштабе и повышения требований к экологической безопасности технологий. В этой связи стали интенсивно развиваться новые разделы биотехнологии – «**Биоэнергетика**» и «**Биогеотехнология металлов**».

5.1. БИОЭНЕРГЕТИКА

Повышенный интерес к **технологической биоэнергетике** – науке о **пути и механизмах трансформации энергии в биологических системах**, обусловлен рядом причин. Энерговооруженность является фактором, определяющим уровень развития общества. В последнее время для сравнения эффективности тех или иных процессов и технологий все чаще прибегают к энергетическому анализу, который намного раньше используется в экологии. Основной задачей энергетического анализа является планирование таких методов производства, которые обеспечивают наиболее эффективное потребление ископаемых и возобновляемых энергоресурсов, а также охрану окружающей среды.

За историю развития человеческого общества потребление энергии в расчете на одного человека возросло более чем в 100 раз. Через каждые 10–15 лет мировой уровень потребления энергии практически удваивается. В то же время запасы традиционных источников энергии – нефти, угля, газа истощаются. Кроме того, сжигание ископаемых видов топлив приводит к нарастающему загрязнению окружающей среды. Поэтому становится очень важным получать энергию в экологически чистых технологиях. Неиссякаемым источником энергии на Земле является Солнце. Каждый год на поверхность Земли с солнечной энергией поступает $3 \cdot 20^{24}$ Дж энергии. В то же время разведанные запасы нефти, угля, природного газа и урана по оценкам эквиваленты $2,5 \cdot 10^{22}$ Дж, то есть менее чем за одну неделю Земля получает от Солнца такое же количество энергии, какое содержится во всех запасах. Ежегодно в процессах фотосинтеза образуется свыше 170 млрд. т сухого вещества, а количество энергии, связанной в нем, более чем в 20 раз превышает сегодняшнее годовое энергопотребление. Однако возникает вопрос, способна ли энергетика, основанная на использовании солнечного излучения, обеспечить все возрастающие энергетические потребности общества. В глобальном масштабе солнечная



Рис. 5. 1. Взаимосвязи между биомассой и биотехнологией (по Д. Холлу и др., 1988).

энергетика способна обеспечить современный и будущий уровень энергозатрат человечества. Так, величина солнечной энергии, падающей на неосвоенные территории, например пустыни (около $2 \cdot 10^7$ км²), составляет около $5 \cdot 10^{18}$ кВт ч. При освоении этой энергии хотя бы с 5 % к.п.д. уровень мирового производства энергии можно увеличить более чем в 200 раз. Таким образом, при возможном народонаселении в 10 млрд. человек получение энергии только с поверхности зоны пустынь будет в 10–12 раз превышать энергетические потребности человечества. При этом предвидится рост энергопотребления в расчете на душу населения в 5 раз по сравнению с настоящим уровнем.

Принципиально возможно также освоение солнечной энергии, падающей на поверхности морей и океанов. При этом в первичном процессе преобразование солнечной энергии происходит за счет синтеза биомассы фитопланктона; вторичный процесс представляет собой конверсию био-

массы в метан и метанол. Плантации микроводорослей по оценкам специалистов представляют собой наиболее продуктивные системы: 50–100 т/га в год. Растительный покров Земли составляет свыше 1800 млрд. т сухого вещества, образованного в процессах фотосинтеза лесными, травяными и сельскохозяйственными экосистемами. Существенная часть энергетического потенциала биомассы потребляется человеком. Для сухого вещества простейшим способом превращения биомассы в энергию является сгорание, в процессе которого выделяется тепло, преобразуемое далее в механическую или электрическую энергию. Сырая биомасса также может быть преобразована в энергию в процессах биометаногенеза и получения спирта.

Как видно из рис. 5.1, получение топлива по схеме «биомасса – биотехнология» основывается на сочетании фотосинтеза, животноводства, кормопроизводства и ферментации с использованием тех или иных биологических агентов.

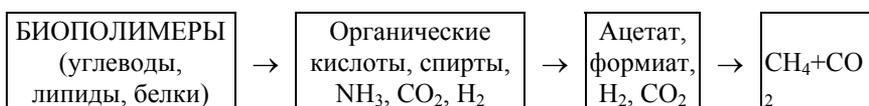
Научные и аналитические исследования последнего десятилетия приводят к выводу, что наиболее эффективными и обнадеживающими для крупномасштабного преобразования солнечной энергии являются методы, основанные на использовании биосистем. Среди этих методов – достаточно хорошо освоенные биологические технологии превращения биомассы в энергоносители в процессах биометаногенеза и производства спирта, а также принципиально новые разработки, ориентированные на модификацию и повышение эффективности самого процесса фотосинтеза, создание биотопливных элементов, получение фотоводорода, биоэлектрокатализ.

Биометаногенез

Биометаногенез или метановое «брожение» – давно известный процесс превращения биомассы в энергию. Открыт данный процесс в 1776 г. Вольтой, который установил наличие метана в болотном газе. Биогаз, получаемый из органического сырья в ходе биометаногенеза в результате разложения сложных органических субстратов различной природы при участии смешанной из разных видов микробной ассоциации, представляет собой смесь из 65–75 % метана и 20–35 % углекислоты, а также незначительных количеств сероводорода, азота, водорода. Теплотворная способность биогаза зависит от соотношения метана и углекислоты и составляет 5–7 ккал/м³; 1 м³ биогаза эквивалентен 4 квт/ч электроэнергии, 0.6 л керосина, 1.5 кг угля и 3.5 кг дров. Неочищенный биогаз используют в быту для обогрева жилищ и приготовления пищи, а также применяют в качестве топлива в стационарных установках, вырабатывающих электроэнергию. Компримированный газ можно транспортировать и использовать (после предварительной очистки) в качестве горючего для двигателей внутреннего сгорания. Очищенный биогаз аналогичен природному газу. В процессах биометаногенеза решается не только проблема воспроизводства энергии, – эти процессы чрезвычайно важны в экологическом плане, так

как позволяют решать проблему утилизации и переработки отходов различных производств и технологий, сельскохозяйственных и промышленных, а также бытовых, включая сточные воды и твердый мусор городских свалок.

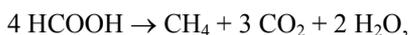
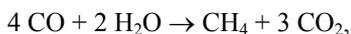
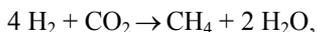
В сложных процессах деструкции органических субстратов и образования метана участвует микробная ассоциация различных микроорганизмов. В ассоциации присутствуют микроорганизмы-деструкторы, вызывающие гидролиз сложной органической массы с образованием органических кислот (масляной, пропионовой, молочной), а также низших спиртов, аммиака, водорода; ацетогены, превращающие эти кислоты в уксусную кислоту, водород и окислы углерода и, наконец, собственно – метаногены – микроорганизмы, восстанавливающие водородом кислоты, спирты и окислы углерода в метан:



С биохимической точки зрения метановое «брожение» – это процесс анаэробного дыхания, в ходе которого электроны с органического вещества переносятся на углекислоту; последняя затем восстанавливается до метана (при истинном брожении конечным акцептором электронов служит молекула органического вещества, являющегося конечным продуктом брожения). Донором электронов для метаногенов является водород, а также уксусная кислота.

Деструкцию органической массы и образование кислот вызывает ассоциация облигатных и факультативных анаэробных организмов, среди которых гидролитики, кислотогены, ацетогены и др.; это представители родов: *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Sterptococcaceae*, *Clostridium*, *Butyrivibrio*. Активную роль в деструкции органической массы играют целлюлозоразрушающие микроорганизмы, так как растительные биомассы, вовлекаемые в процессы биометаногенеза, характеризуются высоким содержанием целлюлозы (лигнинцеллюлозы). В превращении органических кислот в уксусную существенную роль играют ацетогены – специализированная группа анаэробных бактерий.

«Венцом» метанового сообщества являются собственно метаногенные или метанообразующие бактерии (архебактерии), катализирующие восстановительные реакции, приводящие к синтезу метана. Субстратами для реализации этих реакций являются водород и углекислота, а также окись углерода и вода, муравьиная кислота, метанол и др.:





Несмотря на то, что метанообразующие бактерии выделены и описаны совсем недавно, в середине 80-х гг., их возникновение относят к Архею и возраст оценивают в 3.0–3.5 млрд. лет. Эти микроорганизмы достаточно широко распространены в природе в анаэробных зонах, и вместе с другими микроорганизмами активно участвуют в деструкции органических веществ с образованием биогаза, в морских осадках, болотах, речных и озерных илах. Археобактерии отличаются от прокариотических микроорганизмов отсутствием муреина в клеточной стенке; специфическим, не содержащим жирных кислот, составом липидов; наличием специфических компонентов метаболизма в виде кофермента М (2-меркаптоэтансульфоновая кислота) и фактора F₄₂₀ (особый флавин); специфической нуклеотидной последовательностью 16S рРНК.

Внутри данной группы отдельные представители метанообразующих бактерий могут существенно отличаться друг от друга по ряду показателей, включая содержание ГЦ в ДНК, на этом основании их подразделяют на три порядка, которые включают несколько семейств и родов. К настоящему времени выделены в чистой культуре и описаны около 30 метанообразующих бактерий; список этот непрерывно пополняется. Наиболее изученными являются следующие: *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanosarcina barkerii*, *Methanobrevibacter ruminantium*. Все метаногены – строгие анаэробы; среди них встречаются как мезофильные, так и термофильные формы; гетеротрофы и автотрофы. Особенностью метанообразующих бактерий является также способность активно развиваться в тесном симбиозе с другими группами микроорганизмов, обеспечивающими метаногенов условиями и субстратами для образования метана.

В процессах метаногенеза можно переработать самое разнообразное сырье – различную растительную биомассу, включая отходы древесины, несъедобные части сельскохозяйственных растений, отходы перерабатывающей промышленности, специально выращенные культуры (водяной гиацинт, гигантские бурые водоросли), жидкие отходы сельскохозяйственных ферм, промышленные и бытовые стоки, ил очистных сооружений, а также мусор городских свалок. Важно, что сырье с высоким содержанием целлюлозы, трудно поддающееся методам переработки, также эффективно сбраживается и трансформируется в биогаз.

Установки для биометаногенеза с учетом их объемов и производительности можно подразделить на несколько категорий: реакторы для небольших ферм сельской местности (1–20 м³); реакторы для ферм развитых стран (50–500 м³); реакторы для переработки промышленных стоков (спиртовой, сахарной промышленности) (500–10 000 м³) и реакторы для переработки твердого мусора городских свалок (1 – 20·10⁶ м³). Метанотенки, изготовленные из металла или железобетона, могут иметь разнообразную форму, включая кубическую и цилиндрическую. Конструкции и

детали этих установок несколько варьируют, главным образом, это связано с типом перерабатываемого сырья. Существует огромное разнообразие установок для реализации процесса метаногенеза, конструкционные детали и компоновка которых определяется приоритетностью задачи, решаемой в конкретном процессе: либо это утилизация отходов и очистка стоков, либо получение биогаза требуемого качества. Так, среди действующих в развитых странах установок есть как средние, так и большие по объемам аппараты (дайджестеры), снабженные устройствами для очистки и компремирования биогаза, электрогенераторами и очистителями воды. Такие установки могут входить в состав комплексов с промышленными предприятиями (сахароперерабатывающими, спиртовыми, молокозаводами), канализационными станциями или крупными специализированными фермами. Когда главной целью процесса является утилизация отходов, в составе установок должен присутствовать блок для фракционирования и отделения крупных твердых частиц.

Метанотенки могут работать в режиме полного перемешивания, полного вытеснения, как анаэробные биофильтры или реакторы с псевдоожиженным слоем, а также в режиме контактных процессов. Простейшей конструкцией метанотенка является обычная бродная яма в грунте с фиксированным объемом газа. Метанотенк представляет собой герметичную емкость, частично погруженную в землю для теплоизоляции и снабженную устройствами для дозированной подачи и подогрева сырья, а также газгольдером – емкостью переменного объема для сбора газа. Очень важным в конструкции метанотенков является обеспечение требуемого уровня перемешивания весьма гетерогенного содержимого аппарата. Вместе с тем известно, что максимальное выделение метана наблюдается в системах со слабым перемешиванием. Поэтому в отличие от аэробных процессов, требующих интенсивной аэрации и перемешивания, перемешивание при метаногенезе, главным образом, должно обеспечивать гомогенизацию бродящей массы, препятствовать оседанию твердых частиц и образованию твердой плавающей корки.

В зависимости от типа исходного материала, сбраживаемого в метанотенке, интенсивность процесса, включая скорость подачи и полноту переработки, а также состав образуемого биогаза существенно варьируют. При переработке жидких отходов животноводческих ферм соотношение между твердыми компонентами и водой в загружаемой массе должно составлять примерно как 1:1, что соответствует концентрации твердых веществ от 8 до 11 % по весу. Смесь материала обычно засевают ацетогенными и метанообразующими микроорганизмами из отстоя сброженной массы от предыдущего цикла или другого метанотенка. Температура и, следовательно, скорость протекания процесса зависят от вида используемого метанового сообщества. Для термофильных организмов процесс реализуется при 50–60°C, для мезофильных – при 30–40°C и около 20° – для психро-

фильных организмов. При повышенных температурах скорость процесса в 2–3 раза выше по сравнению с мезофильными условиями.

В ходе сбраживания органической массы на первой, так называемой **«кислотной», фазе** в результате образования органических кислот pH среды снижается. При резком сдвиге pH среды в кислую сторону возможно ингибирование метаногенов. Поэтому процесс ведут при pH 7.0–8.5. Против закисления используют известь. Снижение pH среды является своеобразным сигналом, свидетельствующим о том, что процесс деструкции органики с образованием кислот закончен, то есть в аппарат можно подавать новую партию сырья для переработки. Оптимальное соотношение C:N в перерабатываемой органической массе находится в диапазоне 11–16:1. При изменении соотношения C:N в исходном материале в сторону увеличения содержания азота приводит к выделению аммиака в среду и защелачиванию. Поэтому жидкие навозные отходы, богатые азотсодержащими компонентами, разбавляют резаной соломой или различными жомами.

Процессы, протекающие при метановом брожении, эндотермичны и требуют подвода энергии в виде тепла извне. Для подогрева загружаемого сырья и стабилизации температуры процесса на требуемом уровне обычно сжигают часть образуемого биогаза. В зависимости от температуры процесса количество биогаза, идущего на обогрев процесса, может достигать 30 % от объема получаемого.

Скорость поступления сырья на переработку или время удержания сырья в аппарате являются важными и контролируруемыми параметрами. Чем интенсивнее процесс брожения, тем выше скорость загрузки и меньше время удержания. Однако важным условием стабильности процесса биометаногенеза, как и любой проточной культивационной системы, является сбалансированность потоков субстрата со скоростью размножения продуцента. Скорость подачи субстрата в метанотенк должна быть равной скорости роста бактерий метанового сообщества, при этом концентрация субстрата (по органическому веществу) должна быть стабилизирована на уровне не ниже 2 %. При уменьшении концентрации субстрата плотность бактериального сообщества снижается, и процесс метаногенеза замедляется. Наибольший выход продукции обеспечивается более высокой скоростью подачи субстрата, что в свою очередь требует стабилизации в аппарате достаточно высокой концентрации микроорганизмов. При этом возможны осложнения процесса, которые зависят от характера перерабатываемой органики. Если в перерабатываемом материале содержится много труднорастворимых веществ, в реакторе возможно накопление неразрушенных твердых веществ (до 80 % осадка). При больших количествах растворимой и легкодоступной органики образуется большое количество микробной биомассы в виде активного ила (до 90 % осадка), который трудно удержать в реакторе. Для снятия этих вопросов существует несколько решений. Возможно применение химического или ферментатив-

ного гидролиза исходного сырья, помимо его механического измельчения; организация в метанотенке оптимального перемешивания подаваемого сырья с активным илом; перемешивание осадка и т.д.

Нормы загрузки сырья в существующих процессах метаногенеза колеблются в пределах 7–20 % объема субстрата от объема биореактора в сутки. Цикличность процесса – 5–14 суток. Обычно время сбраживания животноводческих отходов составляет около 2-х недель. Растительные отходы перерабатываются дольше (20 суток и более). Наиболее трудны для переработки твердые отходы, поэтому их переработка более длительна.

В результате модификации и усовершенствования процесса можно существенно изменить скорость протока сырья через метанотенк. Цикличность процесса может быть сокращена до 5–15 часов при увеличении скорости загрузки до 150–400 % от общего суточного объема. Интенсифицировать процесс можно в результате использования термофильного сообщества и повышения температуры процесса, но это требует соответствующих дополнительных энергозатрат. Повысить эффективность метанового сообщества в метанотенке можно при использовании так называемых анаэробных биофильтров, или метанотенков второго поколения. В анаэробном биофильтре микроорганизмы находятся в иммобилизованном состоянии. В качестве носителя можно использовать галечник, керамзит, стекловолокно и др. В таких конструкциях становится возможным сбраживание материала при существенно меньшей величине текущей концентрации субстрата (0.5 % сухих веществ) с большими скоростями. Это позволяет повысить интенсивность деструкции отходов при уменьшении объемов реакторов.

Эффективно также пространственное разделение процесса в соответствии с характерной для него, с точки зрения химизма процесса, двухфазностью. Процесс реализуется в двух, соединенных последовательно реакторах. В первом аппарате происходит процесс анаэробного разложения органики с образованием кислот, окислов углерода и водорода (кислотная стадия). Параметры процесса брожения в аппарате задаются на уровне, обеспечивающем требуемый выход кислот и рН культуры не выше 6.5. Полученная бражка поступает во второй аппарат, в котором происходит процесс образования метана. В такой системе можно независимо варьировать условия ферментации (скорость протока, рН, температуру) в каждом аппарате с учетом создания оптимальных условий для развития микроорганизмов деструкторов в первом и метаногенов – во втором. В целом, применение такой биосистемы позволяет интенсифицировать процесс в 2–3 раза.

Интенсифицировать процесс оказалось возможным также в результате применения более активных метаногенных микроорганизмов. Например, исследователями японской фирмы «Мацусита электрик индастриал К^о» получена массовая культура обнаруженной ими бактерии Methano-

bacterium kadomensis St.23, которая завершает процесс сбраживания и метаногенеза не за 15–20, а за 8 суток.

Теоретически метанообразующие бактерии в процессах синтеза метана до 90–95 % используемого углерода превращают в метан и только около 5–10 % – включают в образование биомассы. Благодаря такой высокой степени конверсии углерода в метан у метаногенов, до 80–90 % исходной органической массы, перерабатываемой в процессах сбраживания и метаногенеза, превращается в биогаз. Энергетика процесса существенным образом зависит от типа сбраживаемой органики. Если субстратом является легко утилизируемая глюкоза, теоретический выход по энергии составляет свыше 90 %, а весовой выход газа – только 27 %. Практические энергетические выходы в зависимости от типа и сложности органического сырья составляют от 20 до 50 %, соответственно, выход газа – от 80 до 50 %. Состав газа существенно меняется в зависимости от состава и природы исходного сырья, скорости и условий протекания процесса в биореакторе. Теоретически соотношения углекислоты и метана в биогазе должно быть примерно равным. Однако далеко не вся выделяемая в процессах брожения углекислота содержится в газовой фазе, часть растворяется в жидкой фазе с образованием бикарбонатов. Концентрация бикарбоната, в свою очередь, как и объема образуемой углекислоты в целом, сильно зависит от содержания более или менее окисленных веществ в перерабатываемом сырье: более окисленные субстраты обеспечивают большее образование кислых продуктов и, следовательно, больший выход CO_2 в биогазе; более восстановленные – H_2 и, следовательно, больший выход CH_4 . Реально достигаемые в производственных процессах соотношения CO_2 и CH_4 в биогазе существенно варьируют. Это определяет калорийность получаемого биогаза, которая также варьирует от 5 до 7 ккал/м³. В зависимости от типа сырья и интенсивности процесса биометаногенеза выход биогаза колеблется от 300 до 600 м³/т органической массы при выходе метана от 170 до 400 м³/т. Глубина переработки субстрата при этом может составлять от 20 до 70 %.

Образующийся в процессах метаногенеза жидкий или твердый шлам вывозится на поля и используется в качестве удобрений. Данное применение обусловлено условиями метаногенерации, при которой патогенные энтеробактерии, энтеровирусы, а также паразитарные популяции (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma*) практически полностью погибают. Твердый остаток процесса (или активный ил) может быть использован также в качестве исходного сырья для получения ряда биологически активных соединений в процессах химического гидролиза или микробиологического синтеза.

Экологическая безопасность применения и калорийность биогаза в сочетании с простотой технологии его получения, а также огромное количество отходов, подлежащих переработке – все это является положительным фактором для дальнейшего развития и распространения биогазовой промышленности. Толчком к созданию данного эффективного биотехнологи-

ческого направления послужил энергетический кризис, разразившийся в середине 70-х гг. Производство биогаза стало одним из основных принципов энергетической политики ряда стран Тихоокеанского региона. Правительство Китая уделило больше внимания и вложило много средств в становление биогазовой промышленности, особенно в сельской местности. В рамках национальной программы были созданы условия для появления сети заводов, выпускающих биогазовые установки. Правительство поощряло это направление и пошло даже на создание сети региональных и местных контор, ответственных за биогазовую программу. Государственные банки предоставляли населению льготные ссуды и материалы для строительства установок. И уже в 1978 г., через три года после принятия программы в стране функционировало свыше 7 млн. установок, что в 15 раз превосходило уровень 1975 г. В год вырабатывалось около 2.6 млрд. м³ биогаза, что эквивалентно 1.5 млн. т нефти. В начале 80-х гг. в Китае производилось до 110 млрд. м³ биогаза, что эквивалентно 60–80 млн. т сырой нефти, а в середине – создано до 70 млн. установок, которые примерно у 70 % крестьянских семей покрывали бытовые потребности в энергии. В Индии также большое внимание было уделено получению энергии в процессах биометаногенеза при утилизации сельскохозяйственных отходов. Строительство биогазовых установок началось на Филиппинах, в Израиле, странах Латинской Америки. Интерес к данной технологии в середине 80-х гг. усилился также в странах центральной Европы, особенно ФРГ и Франции. Французским Комиссариатом по солнечной энергии в середине 90-х гг. было выделено 240 млн. франков на создание и распространение биогазовых установок в сельской местности. Французским исследовательским институтом прикладной химии было показано, что при утилизации и переработке навоза сельскохозяйственных ферм можно полностью обеспечить потребности в энергии комплекса из 30 голов крупного рогатого скота или 500 свиней. В середине 90-х гг. в странах Европейского экономического сообщества функционировало около 600 установок по производству биогаза из жидких сельскохозяйственных отходов и около 20, перерабатывающих твердый городской мусор. В пригородах Нью-Йорка установка по переработке содержимого городской свалки производит около 100 млн. м³ биогаза в год. Интегрированные национальные программы многих стран Африки и Латинской Америки, имеющих огромные количества сельскохозяйственных отходов (свыше 90 % мировых отходов цитрусовых, бананов и кофе, около 70 % отходов сахарного тростника и около 40 % отходов мирового поголовья скота), в настоящее время ориентированы на получение биогаза.

Получение спирта

Получение этилового спирта на основе дрожжей известно с древних времен. И хотя производство спирта намного моложе, чем неперегнанных спиртных напитков, но и его корни теряются в веках. В последние годы

все большие масштабы приобретает химический синтез этанола из этилена, который конвертируется в спирт при высокой температуре в присутствии катализатора и воды. Однако микробиологический синтез не теряет актуальности.

Перспективы использования низших спиртов (метанола, этанола), а также ацетона и других растворителей в качестве горючего для двигателей внутреннего сгорания вызвали в последние годы большой интерес к возможности их крупномасштабного получения в микробиологических процессах с использованием различного растительного сырья. Этиловый спирт является прекрасным экологическим чистым горючим для двигателей внутреннего сгорания. Замена дефицитного бензина иными видами топлива является актуальной проблемой современности. Особенно остро вопрос стоит в странах Америки и Западной Европы. Использование чистого этанола или в смеси с бензином (газохол) существенно снижает загрязнение окружающей среды выхлопными газами, так как при сгорании этанола образуются только углекислота и вода. Поэтому в странах с большими запасами природного растительного материала и соответствующими почвенно-климатическими условиями, обеспечивающими большие ежегодные урожаи, становится целесообразным ориентировать производство моторных топлив на процессы микробиологического брожения.

В качестве горючего спирт стали применять в США и Германии в 30–40 гг. Интерес к спиртам в качестве топлива резко возрос в 70-е годы. Например, в Бразилии этанол используют в качестве топлива в двигателях внутреннего сгорания уже несколько десятилетий. В 1982 г. началось интенсивное строительство спиртовых заводов по технологии шведской фирмы «Альфа Ляваль» производительностью до 150 тыс. л 95 % спирта в сутки на основе сахаросодержащего сырья. В России действуют установки по производству гидролизного спирта технологии Вниигидролиз (Ленинград). В Японии к концу 90-х гг. экспорт нефти сокращен с 72 до 49 % за счет получения спирта на основе иммобилизованных микробных клеток.

Сырьем для процессов спиртового брожения могут быть разнообразные биомассы, включая крахмалсодержащие (зерно, картофель), сахаросодержащие материалы (меласса, отходы деревоперерабатывающей промышленности), а также биомасса специально выращенных пресноводных и морских растений и водорослей. Процесс складывается из нескольких стадий, включающих подготовку сырья, процесс брожения, отгонку и очистку спирта, денатурацию, переработку кубовых остатков.

Этиловый спирт обычно получают из гексоз в процессах брожения, вызываемых бактериями (*Zymomonas mobilis*, *Z. anaerobica*, *Sarcina ventriculi*), клостридиями (*Clostridium thermocellum*) и дрожжами (*Saccharomyces cerevisiae*):



Главная задача, которую приходится решать при получении спиртов технического назначения, это замена дорогостоящих крахмалсодержащих субстратов дешевым сырьем непищевого назначения.

Образование этанола дрожжами – это анаэробный процесс, однако для размножения дрожжей в незначительных количествах нужен и кислород. Процессы, происходящие при конверсии сахаросодержащего субстрата в спирт, включают также процессы метаболизма и роста клеток-продуцента, поэтому в целом биологический процесс получения спиртов зависит от ряда параметров (концентрации субстрата, кислорода, а также конечного продукта). При накоплении спирта в культуре до определенных концентраций начинается процесс ингибирования клеток. Поэтому большое значение приобретает получение особых штаммов, резистентных к спирту.

Промышленный процесс брожения может осуществляться по разным схемам: непрерывно, периодически и периодически с возвратом биомассы. При периодическом процессе субстрат сбраживается после внесения свежесбраженного инокулята, который обычно получают в аэробных условиях. После завершения сбраживания субстрата клетки продуцента отделяют, и для нового цикла получают свежую порцию посевного материала. Это достаточно дорогостоящий процесс, так как в аэробном процессе размножения дрожжей расходуется много субстрата. Экономический выход в процессе составляет около 48 % от субстрата по массе (часть субстрата тратится на процессы роста и метаболизма клеток, а также образование других продуктов – уксусной кислоты, глицерола, высших спиртов). Если в качестве продуцента в процессах брожения используют дрожжи, продуктивность составляет 1–2 г этанола/г клеток ч. На лабораторном уровне при использовании в качестве продуцента бактериальной культуры *Zygomonas mobilis* эта величина выше практически в 2 раза. В промышленных процессах продуктивность аппаратов сильно зависит от физиологических особенностей продуцента, плотности биомассы, типа аппарата и режима ферментации; варьирует очень широко, от 1 до 10 г/л ч. Длительность цикла составляет около 36 ч, конечная концентрация спирта – 5 % (вес/объем).

Недостатки процесса (главным образом, длительность и неполное использование субстрата) можно частично устранить, применяя процесс с повторным использованием биомассы. По этой схеме выход спирта можно повысить до 10 г/л ч.

При реализации непрерывного процесса полнота использования субстрата в основном зависит от интенсивности процесса, то есть скорости потока. Однако при этом возникают противоречия между двумя параметрами, по которым обычно оптимизируют брожение: конечный выход спирта и полнота использования сахаров. По завершении процесса брожения концентрация спирта в бражке может составлять от 6 до 12 %. Чем выше конечная концентрация спирта, тем менее энергоемка стадия пере-

гонки. Так, при 5 % концентрации спирта траты пара для получения 96 % спирта составляют свыше 4 кг/л; при содержании спирта в бражке около 10 % – эта величина сокращается до 2.25 кг/л.

Побочными продуктами спиртового брожения являются углекислота, сивушные масла, кубовые остатки, дрожжи. Каждый из этих продуктов имеет определенную стоимость и самостоятельную сферу применения.

Попытки усовершенствования процесса брожения имеют несколько направлений. Это переход на непрерывные процессы, получение более устойчивых к спирту штаммов дрожжей и удешевление исходного сырья. Непрерывные процессы сбраживания позволяют повысить конечную концентрацию спирта до 12 %. Получены новые штаммы, в основном среди бактериальных культур, устойчивые к таким концентрациям спирта. К разработкам последних лет относится направление, основанное на использовании не свободных, а иммобилизованных микробных клеток. Иммобилизованные клетки, обладая повышенной толерантностью к спирту, позволяют решать одновременно задачу оптимизации по двум параметрам: повышать полноту использования субстрата и конечный выход спирта.

Выпуск спиртов в качестве моторных топлив предполагает большие объемы их производства, десятки млн. тонн. В качестве исходного субстрата для получения технического спирта экономически оправдано использование отходов сахарного тростника – багассы, а также маниока, батата, сладкого сорго, тапинмбура. Однако эти культуры характерны для стран с теплым климатом, например, Латинской Америки. Для регионов с умеренным климатом, обладающих большими массивами лесов, приемлемым оказывается использование гидролизатов древесных отходов. Но для этого требуется достаточно энергоемкий и дорогой процесс разрушения лигнина и целлюлозы с образованием водорастворимых сахаров. Процесс гидролиза непрерывно совершенствуется. Для повышения выхода сахаров в процессе гидролиза и снижения энергозатрат разрабатываются новые методы деструкции лигноцеллюлоз с привлечением физических, химических, ферментативных методов, а также в их сочетании. Помимо отходов лесопиления и деревообработки, возможно привлечение также соломы, торфа, тростника.

Экологические преимущества получения и применения этанола в качестве топлива очевидны. Что же касается экономических, – они определяются рядом условий: климатом и продуктивностью зеленой биомассы, себестоимостью сельскохозяйственной продукции и наличием (либо отсутствием) энергоносителей в виде нефти, природного газа или угля.

Жидкие углеводороды

Первые попытки поиска среди фотосинтезирующих организмов потенциальных продуцентов энергоносителей в виде жидких углеводородов относятся к 1978 г., когда исследователи пытались обнаружить в соке некоторых растений, главным образом у представителей семейства моло-

чайных, жидкие углеводороды. Однако попытки не увенчались успехом, так как концентрация углеводородов у высших растений оказалась крайне низкой. Несколько позже удалось установить способность к синтезу жидких углеводородов у водорослей и бактерий.

Было установлено, что у зеленой водоросли *Botryococcus braunii* содержание углеводородов может составлять от 15 до 75 % от суммы липидов. Эта одноклеточная зеленая водоросль обитает в водоемах с пресной и солоноватой водой в умеренных и тропических широтах. Данная водоросль встречается в двух разновидностях: красная и зеленая, потому что хлоропласты этой водоросли имеют различную окраску, обусловленную наличием пигментов в виде хлорофиллов всех типов, а также каротинов и их окисленных производных (ксантофиллов, лютеина, неоксантина, зеоксантина и др.). В составе клеточной оболочки водоросли – помимо жира, белков и углеводов и внутреннего целлюлозного слоя, обнаружен спорополлениновый слой, состоящий из окисленных полимеров каротинов и каротиноидных веществ. В неблагоприятных условиях роста, вызванных, например, дефицитом каких-либо биогенов или повышением солёности среды, соотношение основных групп пигментов изменяется в сторону доминирования каротиноидов, и тогда водоросль приобретает оранжево-красную окраску. При дефиците, например ионов магния в среде, концентрация углеводородов в клеточной стенке достигает 70–75 %. При этом было выявлено, что зеленая водоросль синтезирует линейные углеводороды с нечетным числом углеродных атомов в цепи (C_{25} – C_{31}) и бедна ненасыщенными связями. Красная разновидность синтезирует линейные углеводороды с четным числом углеродных атомов в цепи (C_{34} – C_{38}) и с несколькими ненасыщенными связями. Данные углеводороды, «ботриоккцены», накапливаются водорослью в ростовой фазе в клеточной стенке. Извлечь углеводороды без разрушения клеток можно центрифугированием биомассы водоросли, в ходе которого углеводороды «вытекают» из клеток. Последние можно вновь поместить в среду в условия аккумуляции углеводородов. Варьируя условия роста, освещенность, температуру, концентрацию солей, исследователям из Французского института нефти удалось сократить время удвоения от семи до двух суток, при этом выход углеводородов составил 0.09 г/л в сутки, что соответствует 60 т/га в год. Фракция углеводородов, синтезируемая водорослью, аналогична керосину или дизельному топливу.

Эта водоросль, как оказалось, достаточно широко распространена в природе, встречается в самых разных местах: от солоноватых озер Австралии до водохранилищ в окрестностях Лондона. Обнаруженные в прошлом в Австралии высохшие остатки этой водоросли под названием «корнангит» явились даже поводом для возникновения своеобразной нефтяной «лихорадки». Сходные породы (остатки углеводородпродуцирующей водоросли) время от времени обнаруживают в различных частях света – в

районе оз. Мозамбик в Африке («N¹haugellite»), в Казахстане в районе озера Балхаш («балхашит»).

В настоящее время признано эффективным использование этих углеводородов в фармацевтической промышленности. В США действует ферма для выращивания водоросли *V. braunii* с суммарной площадью водоема 52 тыс. га. Продуктивность процесса получения углеводородов составляет до 4800 м³ в сутки. Для улучшения топливных характеристик водорослевые углеводороды гидрируют.

Прежде чем делать выводы о перспективности данного способа для восполнения ресурсов жидких углеводородов, следует решить комплекс вопросов научного и опытно-конструкторского уровня, в том числе выяснить роль бактерий, развивающихся вместе с водорослью в процессе синтеза углеводородов, оптимизировать условия биосинтеза и экстракции, разработать соответствующую аппаратуру и условия для искусственного разведения водоросли в больших масштабах, а также оценить перспективность применения получаемых углеводородов в той или иной области. Следует отметить, что изучение механизма синтеза углеводородов водорослями, будет способствовать познанию процесса нефтеобразования в природе в целом, так как клеточная стенка водоросли может служить модельным объектом, на котором можно попытаться проследить процесс образования нефти в земной коре, длительность которого исчисляется миллионами лет. Если удастся воспроизвести генезис ископаемых видов топлива, появится возможность определить время трансформации керогена – предшественника жидкой нефти, в нефть. Это позволит вычислить нефтяной потенциал маточной породы, содержащей кероген.

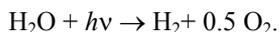
Биологическое получение водорода

Проблема получения водорода является одной из основных проблем технического прогресса ряда важнейших промышленных отраслей, в том числе энергетики. Водород рассматривается в качестве главного энергоносителя будущего, отчасти превосходящего основные современные энергоносители – нефть и природный газ. Теплотворная способность водорода достаточно высока (28.53 ккал/кг), что в 2.8 раза выше бензина. Водород легко транспортируется и аккумулируется в различных фазовых состояниях; в газообразном состоянии не токсичен, имеет высокую теплопроводность и малую вязкость в различных фазовых состояниях. Но главное его достоинство – экологическая чистота, единственным побочным продуктом его сгорания является вода. По прогнозам экспертов, энергетическая система будущего столетия будет «водородной», то есть будет основана на применении двух энергоносителей – электричества и водорода, наиболее удобного для использования на транспорте и в промышленных технологиях. Создание будущего крупномасштабного производства водорода ставит перед наукой задачи поиска наиболее экономичных и экологичных путей получения водорода с использованием таких источников

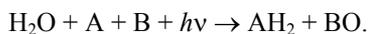
первичной энергии, как энергия деления тяжелых элементов, термоядерного синтеза и солнечная. Проблема эксплуатации солнечной энергии активно исследуется в настоящее время. Это связано как с угрозой истощения запасов топлива, так и с все более остро стоящими вопросами защиты окружающей среды, так как топливная энергетика играет не последнюю роль в тепловом и химическом загрязнении воздушного и водного бассейнов. Количество солнечной энергии, падающей на Землю, на много порядков превосходит количество всех видов вторичной энергии. Только 0.1–0.2 % солнечной энергии поглощается зелеными растениями и только 1 % образованных в процессе фотосинтеза продуктов используется человеком в пищу. Поэтому все более требовательно встает задача более эффективного использования энергии Солнца. Современная наука ищет решения данной задачи во многих, в том числе и биологических направлениях. Особо перспективным представляется получение водорода с использованием солнечной энергии, в том числе из воды, которая является наиболее дешевым и доступным субстратом. Запасы воды в мировом океане составляют $1.3 \cdot 10^{18}$ т, то есть весьма значительные.

Получение водорода возможно в результате электролиза воды, а также термохимического разложения воды с использованием отходящего тепла атомных станций.

Вода может подвергаться **прямому фоторазложению** под воздействием солнечных лучей:



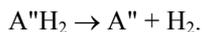
Разрабатываются также способы получения водорода в результате **фотохимического разложения воды**. В основе способа лежат реакции, в которых участвует фотосенсибилизатор (А) и нечувствительное к свету соединение (В); процесс протекает в водной среде:



Цикл замыкается реакциями:



При недостатке энергии видимого излучения для разложения соединения AH_2 , процесс можно реализовать в две стадии с введением в систему промежуточного окислителя A'' :



Примером такой системы образования водорода является система с рибофлавином в качестве фотосенсибилизатора (А), триэтанолламин играет роль восстановителя (В), а метилвиологен – окислителя (A'').

Сравнительно недавно показана принципиальная возможность получения водорода разложением воды с участием биокаталитических агентов.

Так, в начале 60-х гг. было установлено, что хлоропласты, выделенные из шпината, в присутствии искусственного донора электронов и бактериального экстракта, содержащего фермент гидрогеназу, способны продуцировать водород. Донором электронов в системе является ферредоксин; гидрогеназа получает электроны от ферредоксина, то есть задействована только фотосистема I. Спустя десятилетие исследователи в США установили, что хлоропласты шпината и бактериальные структуры, содержащие гидрогеназы и ферредоксин в качестве переносчика электронов, после облучения видимым светом способны образовывать водород. В данном варианте системы задействованы обе фотосистемы, I и II. В связи с тем, что применили оксичувствительную гидрогеназу клостридий, реакцию проводили в атмосфере азота при строгом отсутствии кислорода. Реакция протекает с образованием водорода, при этом вода – субстрат фотолиза, присутствует в избытке, то есть является не лимитированным исходным сырьем; источник энергии, в данном случае солнечный свет, также не ограничен.

С целью повышения выхода водорода в такой системе, нужен источник стабильных и высокоактивных гидрогеназ. Такие гидрогеназы найдены, в том числе термостабильные; продуцируются они различными представителями хемоавтотрофных водородокисляющих бактерий. В смеси с хлоропластами и метилвиологеном (переносчик электронов) такие гидрогеназы катализируют протекание процесса образования водорода длительное время, при этом стабильность процесса зависит, главным образом, от состояния хлоропластов.

Работы по созданию систем биофотолиза воды проводятся достаточно активно во многих странах. Это привело к созданию различных типов сис-

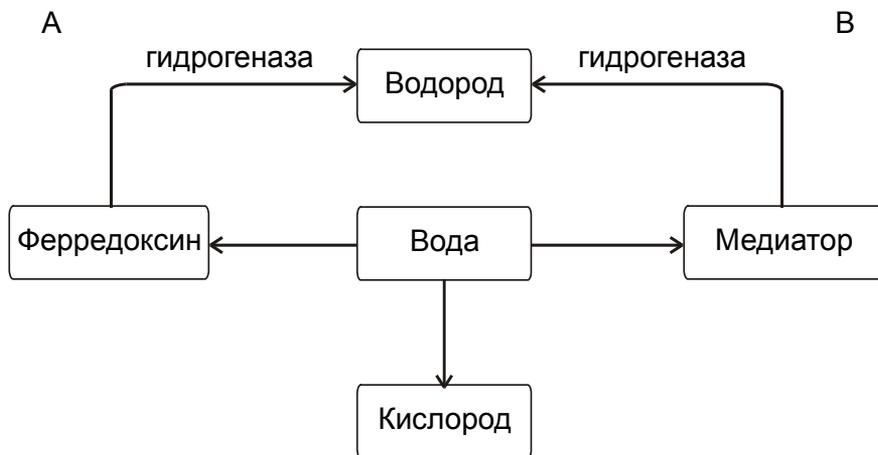
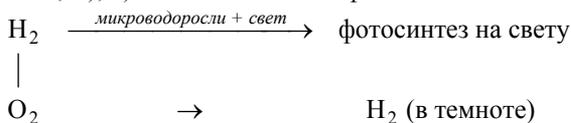
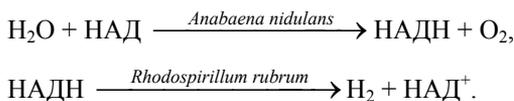


Рис. 5.2. Схема биофотолиза воды с использованием фермента гидрогеназы в качестве катализатора.

тем. Эти системы, независимо от природы составляющих ее компонентов, должна иметь два элемента: 1) электрон-транспортную систему фотосинтеза, включающую систему разложения воды; 2) катализаторы образования водорода. В качестве катализаторов образования водорода можно использовать как неорганические катализаторы (металлическая платина), так и ферментативные (гидрогеназы). Последние могут функционировать как в растворимом, так в иммобилизованном состоянии. Принципиальная схема системы дана на рис. 5.2. Разработки последних лет представлены различными системами: 1) включающие хлоропласты растений, ферредоксин и бактериальные гидрогеназы (рис. 5.2, А); 2) содержащие хлоропласты, медиатор (низкомолекулярный переносчик электронов) и бактериальные гидрогеназы (рис. 5.2, В); 3) с использованием фотосинтетических водорослей:



а также с бактериальными иммобилизованными клетками:



Опыт лабораторного функционирования таких систем биофотолитического позволяет провести некоторую предварительную оценку эффективности процесса. Так, при расходовании в сутки 106 Дж/м^2 солнечной энергии (100 Вт/м^2) система способна производить до $90 \text{ л H}_2/\text{м}^2$ в сутки, что соответствует количеству энергии в 400 Дж .

На основе гидрогеназ, в принципе, любая растительная фотосистема способна продуцировать водород. Целью этих исследований является разработка полностью искусственных систем, действующих по схеме естественных водорослевых или бактериально-растительных систем. В принципе в такой системе станет возможным применение вместо гидрогеназы катализатора типа FeS , а вместо хлоропластов – препарата хлорофилла, а также марганцевый катализатор для извлечения кислорода из воды и высвобождения протонов и электронов.

Система биокаталитического получения водорода пока является единственным примером одностадийной системы, способной работать в видимых лучах света. Эта система чрезвычайно ценна, так как работает на неисчерпаемых источниках – энергии (солнечный свет) и сырья (вода) и выделяет при этом экологически чистый и высококалорийный энергоноситель – водород. Интенсивное совершенствование таких систем будет важным этапом в процессах превращения солнечной энергии в водород.

Перспективные и разрабатываемые направления – это получение водорода на основе растущих микробных популяций хемосинтезирующих и фотосинтезирующих организмов.

Среди хемотрофных микроорганизмов в качестве продуцентов водорода привлекают внимание виды, способные расти на достаточно доступных и дешевых субстратах. Например, культура клостридий *C. perfringens*, сбраживая различную органику, способна продуцировать в 10-литровом аппарате до 23 л H_2 /ч. Создание крупномасштабной системы на такой основе не представляется трудным, так как уже разработаны и внедрены в промышленность процессы получения ацето-бутилового брожения с использованием клостридий. Некоторые энтеробактерии в процессах брожения способны продуцировать водород, однако эффективность процесса при этом не превышает 33 % от энергии используемого субстрата. Таким образом, применение хемотрофов для сбраживания органики с получением водорода менее выгодно по сравнению с процессами биометаногенеза.

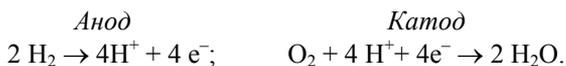
Более перспективными продуцентами являются фототрофные микроорганизмы, так как образование ими водорода связано с процессами поглощения энергии света и, следовательно, может повысить эффективность использования солнечной радиации. С наибольшей скоростью водород выделяют некоторые пурпурные бактерии, например некоторые штаммы *Rh. capsulata*, до 150–400 мл H_2 /ч г сухого вещества. В качестве субстратов пурпурные бактерии используют различные органические соединения, которые они разлагают с образованием углекислоты и водорода. Например, при разложении 1 г лактата пурпурные бактерии образуют до 1350 л водорода. При этом эффективность конверсии света достигает 2.8 % (бактерии поглощают свет в области 800–900 нм, некоторые виды – до 1100 нм, то есть инфракрасные лучи, которые не используются никакими другими фотосинтезирующими организмами). Важным моментом является способность пурпурных бактерий продуцировать водород при использовании, помимо органических соединений, также тиосульфата и других восстановленных соединений серы. В качестве субстрата возможно применение также некоторых отходов, включая навоз. Эффективность продукции водорода при этом составляет до 50 кг H_2 /м²·г.

Наиболее выгодным для микробиологического получения водорода является использование фототрофных организмов, способных к биофотолизу воды, то есть использующих при фотосинтезе в качестве доноров электронов воду. Интересны в этом плане азотфиксирующие цианобактерии, способные выделять водород на свету в аэробных условиях с одновременным образованием кислорода. В культуре цианобактерий получено устойчивое выделение водорода со скоростью 30–40 мл H_2 /ч·г АСБ. Эффективность использования энергии при искусственном освещении составила 1.5–2.7 % и 0.1–0.2 % – при естественном освещении. То есть эти результаты достаточно обнадеживающие. Для получения фотоводорода

разрабатываются различные, в том числе многокомпонентные биосистемы, содержащие, в том числе, лиофилизированные клетки цианобактерий и пурпурных бактерий; цианобактерии и водоросли и т.д. Как двухкомпонентную водородобразующую систему можно рассматривать систему бобовых растений, имеющих клубеньки с азотфиксирующими бактериями *Rhizobium*. К аналогичному симбиотическому сообществу можно отнести комплекс из водного папоротника *Azolla* и цианобактерий. Однако до практического применения таких биосистем еще достаточно далеко. Полагают, что это может произойти не ранее 2000 г.

Биотопливные элементы и биоэлектродкатализ

Перспективным подходом для превращения химической энергии топлив в электрическую является направление создания так называемых **топливных элементов**, представляющих собой электрохимические генераторы тока. В основе процесса лежит происходящее на электродах электрохимическое окисление топлива и восстановление окислителя (кислорода), при этом генерируется электрохимический потенциал, соответствующий свободной энергии процесса окисления водорода до воды:



Степень преобразования химической энергии в электрическую в топливных элементах достаточно высока, так современные водород-кислородные топливные элементы имеют к.п.д. до 80 %.

Определенные перспективы обещает применение в конструкциях топливных элементов биологических систем – ферментов или микробных клеток. Уровень реализации этого подхода пока исключительно лабораторный. В конструировании биотопливных элементов в настоящее время намечилось несколько подходов:

- превращение водорода в электрохимически активные соединения, эффективно окисляющиеся на электродах. В такой системе микроорганизмы на основе ряда субстратов (углеводы, метан, спирты и пр.) непрерывно генерируют водород, который далее окисляется в элементе «водород-кислород» с образованием электроэнергии;
- генерация электрохимического потенциала на электродах, находящихся непосредственно в культуральной среде: образующиеся в ходе конверсии субстрата продукты обмена могут обладать определенной электрохимической активностью;
- перенос электронов с топлива на электрод катализируют ферменты, в том числе иммобилизованные.

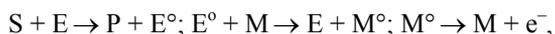
Весьма эффективны биотопливные элементы на основе анаэробных микроорганизмов, способных сбраживать огромное разнообразие соединений. В таком биотопливном элементе функционируют катод и биоанод; последний содержит микробные клетки. Субстрат, играющий роль топли-

ва, перерабатывается микроорганизмом в отсутствие кислорода. Достигнутые мощности энергии на единицу объема топливного элемента пока не велики. Вместе с тем в этих системах возможно применение различных, в том числе доступных и недорогих субстратов, включая промышленные и сельскохозяйственные отходы. Применение изолированных ферментов вместо микробных клеток обещает сделать процессы трансформации энергии химических связей в электрическую более выгодными. Примером таких биотопливных элементов могут служить системы на основе окисления метанола в уксусную кислоту с участием алкагольдегидрогеназы; муравьиной кислоты в углекислоту с участием формиатдегидрогеназы; глюкозы в глюконовую кислоту с участием глюкозооксидазы.

Новой областью технологической биоэнергетики и частью инженерной энзимологии является **биоэлектрокатализ**. Цель данного направления – создание высокоэффективных преобразователей энергии на основе иммобилизованных ферментов. Важнейшей проблемой при этом является сопряжение ферментативной и электрохимической реакций, то есть обеспечение активного транспорта электронов с активного центра фермента на электрод. Исследования недавних лет показали, что этого можно достичь несколькими путями:

- при использовании медиаторов (низкомолекулярных диффузионно подвижных переносчиков, способных акцептировать электроны с электрода и отдавать их активному центру фермента);
- при прямом электрохимическом окислении-восстановлении активных центров фермента, то есть в прямом переносе электронов с активного центра фермента – на электрод (или обратно);
- при использовании ферментов, включенных в матрицу органического полупроводника.

Перенос электронов с участием медиатора можно представить в следующем виде:



где E и E[°] – окисленная и восстановленная формы активного центра фермента; M и M[°] – окисленная и восстановленная формы медиатора.

Примером биоэлектрокаталитической системы с участием медиатора является система «гидрогеназа–метилвиологен–угольный электрод»; в такой системе возможно электрохимическое окисление водорода без перенапряжения, практически в равновесных условиях.

В прямом переносе электронов между активным центром фермента и электродом устанавливается потенциал, близкий к термодинамическому потенциалу кислорода. Этот механизм переноса реализован в реакции электрохимического восстановления кислорода до воды при участии медьсодержащей оксидазы, а также в реакциях электровосстановления водорода с помощью гидрогеназы.

Третий путь переноса электронов базируется на использовании иммобилизованных ферментов, а именно, включенных в матрицу полупроводника. Для этих целей используют полимерные материалы с системой сопряженных связей, обладающие длинной цепью сопряжения, а также полимеры с комплексами переноса заряда (высокодисперсная сажа). По этому принципу реализованы некоторые электрохимические реакции, в том числе электрохимическое окисление глюкозы при участии глюкозооксидазы.

Разработка электрохимических путей преобразования энергии идет двумя путями: с использованием способности ферментов катализировать окисление различных субстратов, а также на базе создания электрохимических преобразователей с высокими удельными характеристиками.

5. 2. БИОГЕОТЕХНОЛОГИЯ МЕТАЛЛОВ

Биогеотехнология металлов – это процессы извлечения металлов из руд, концентратов, горных пород и растворов вод воздействием микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности при нормальном давлении и физиологической температуре (от 5 до 90°C). Составными частями биогеотехнологии являются:

- 1) биогидрометаллургия, или бактериальное выщелачивание;**
- 2) биосорбция металлов из растворов, 3) обогащение руд.**

Бактериальное выщелачивание

Как пишет биотехнолог К. Брайерли: «Вероятно, из всех аспектов микробиологической технологии меньше всего рекламируется и больше всего недооценивается применение микроорганизмов для экстракции металлов из минералов...». Важность применения биогеотехнологии металлов связана с исчерпаемостью доступных природных ресурсов минерального сырья и с необходимостью разработки сравнительно небогатых и трудноперерабатываемых месторождений. При этом биологические технологии не обезображивают поверхность Земли, не отравляют воздух и не загрязняют водоемы стоками в отличие от добычи ископаемых открытым способом, при котором значительное количество земельных площадей разрушается. Биогеотехнологические методы, микробиологическая адсорбция и бактериальное выщелачивание, позволяют получить дополнительное количество цветных металлов за счет утилизации «хвостов» обогатительных фабрик, шламов и отходов металлургических производств, а также переработки так называемых забалансовых руд, извлечением из морской воды и стоков. Применение биологических методов интенсифицирует процессы добычи минерального сырья, удешевляет их, при этом исключает необходимость применения трудоемких горных технологий; позволяет автоматизировать процесс. Еще за тысячелетие до нашей эры римляне, финикийцы и люди иных ранних цивилизаций извлекали медь из рудничных вод. В средние века в Испании и Англии применяли процесс «выщелачивания» для получения меди из медьсодержащих минералов. Безусловно, древние горняки не мог-

ли предположить, что активным элементом данного процесса являются микроорганизмы. В настоящее время процесс бактериального выщелачивания для получения меди достаточно широко применяют повсеместно; меньшие масштабы имеет бактериальное выщелачивание урана. На основании многочисленных исследований принято считать бактериальное выщелачивание перспективным процессом для внедрения в горнодобывающую промышленность. В меньших масштабах применяется в горнодобывающей промышленности другой биотехнологический процесс – извлечение металлов из водных растворов. Это направление обещает существенные перспективы, так как предполагает достаточно дешевые процессы очистки стоков от металлов и экономичное получение при этом сырья.

Несмотря на давность существования биотехнологических процессов извлечения металлов из руд и горных пород, только в 50-е гг. была доказана активная роль микроорганизмов в этом процессе. В 1947 г. в США Колмер и Хинкли выделили из шахтных дренажных вод микроорганизмы, окисляющие двухвалентное железо и восстанавливающие серу. Микроорганизмы были идентифицированы как *Thiobacillus ferrooxidans*. Вскоре было доказано, что эти железooksисляющие бактерии в процессе окисления переводят медь из рудных минералов в раствор. Затем были выделены и описаны многие другие микроорганизмы, участвующие в процессах окисления сульфидных минералов. Спустя несколько лет, в 1958 г., в США был зарегистрирован первый патент на получение металлов из концентратов с помощью железooksисляющих микроорганизмов.

Бактерии *Thiobacillus ferrooxidans* очень широко распространены в природе, они встречаются там, где имеют место процессы окисления железа или минералов. Они являются в настоящее время наиболее изученными. Помимо *Thiobacillus ferrooxidans*, широко известны также *Leptospirillum ferrooxidans*. Первые окисляют сульфидный и сульфитный ионы, двухвалентное железо, сульфидные минералы меди, урана. Спириллы не окисляют сульфидную серу и сульфидные минералы, но эффективно окисляют двухвалентное железо в трехвалентное, а некоторые штаммы окисляют пирит. Сравнительно недавно выделены и описаны бактерии *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *T. acidophilus*. Окислять S^0 , Fe^{2+} и сульфидные минералы способны также некоторые представители родов *Sulfolobus* и *Acidianus*. Среди этих микроорганизмов – мезофильные и умеренно термотолерантные формы, крайние ацидофилы и ацидотермофилы.

Для всех этих микроорганизмов процессы окисления неорганических субстратов являются источником энергии. Данные литотрофные организмы углерод используют в форме углекислоты, фиксация которой реализуется через восстановительный пентозофосфатный цикл Кальвина.

Несколько позднее было установлено, что нитрифицирующие бактерии способны выщелачивать марганец из карбонатных руд и разрушать

алюмосиликаты. Среди микроорганизмов, окисляющих $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$, это представители родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrosococcus* и др.

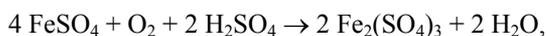
Определенный интерес для биосорбции металлов из растворов представляют денитрифицирующие бактерии; наиболее активные среди них – представители родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*. Эти микроорганизмы, являясь факультативными анаэробами, используют в качестве акцептора электронов окислы азота (NO_3^- , NO_2^- , N_2O) или кислород, а донорами электронов могут служить различные органические соединения, водород, восстановленные соединения серы.

Сульфатвосстанавливающие бактерии, которые используют в качестве доноров электронов молекулярный водород и органические соединения, в анаэробных условиях восстанавливают сульфаты, $\text{SO}_4^{3-} \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{3-}$, иногда S^0 .

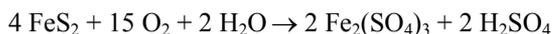
Оказалось, что некоторые гетеротрофные микроорганизмы способны разрушать горные породы в результате выделения органических продуктов обмена – органических кислот, полисахаридов; источником энергии и углерода для организмов служат различные органические вещества. Так, силикатные породы разрушают представители рода *Bacillus* в результате разрушения силоксанной связи Si-O-Si; активными деструкторами силикатов являются также грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и др.

Все названные выщелачивающие бактерии переводят в ходе окисления металлы в раствор, но не по одному пути. Различают «**прямые**» и «**непрямые**» методы бактериального окисления металлов.

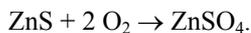
Процесс окисления железа и серы бактериями является прямым окислительным процессом:



В результате прямого бактериального окисления окисляются пирит:



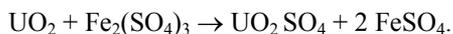
и сфалерит:



Ион трехвалентного железа, образующийся в результате окисления бактериями двухвалентного железа, служит сильным окисляющим агентом, переводящим в раствор многие минералы, например халькоцит:



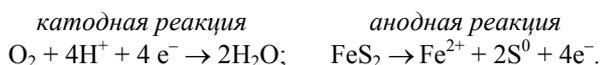
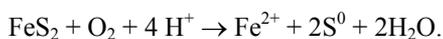
и уранит:



Выщелачивание, происходящее при участии иона Fe^{3+} , который образуется в результате жизнедеятельности бактерий, называется непрямой окислением. Часто в ходе непрямого окисления минералов

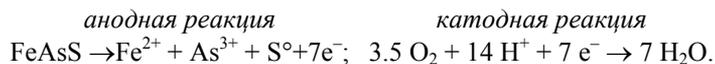
образуется элементарная сера, которая может непосредственно окисляться бактериями до серной кислоты.

Бактериальное окисление сульфидов минералов является сложным процессом, включающим адсорбцию микроорганизмов на поверхности минерала или горной породы, деструкцию кристаллической решетки, транспорт в клетку минеральных элементов и их внутриклеточное окисление. Этот процесс реализуется по законам электрохимической коррозии, поэтому зависит от состава, структуры и свойств породы. Прикрепляясь к поверхности минералов, бактерии увеличивают ее гидрофильность, при этом электродный потенциал породы (ЭП) снижается, а окислительно-восстановительный потенциал среды (Eh) возрастает. Чем выше разница между Eh среды и ЭП породы, тем быстрее протекают электрохимические реакции на катоде и аноде:



При отсутствии бактерий Eh среды и ЭП пирита близки, поэтому окисления не происходит. Бактерии, прежде всего, окисляют минералы с более низким ЭП, то есть анодные минералы, находящиеся на самом низком энергетическом уровне.

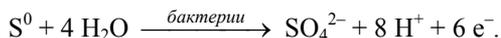
При бактериальном окислении арсенопирита (пример непрямого окисления сульфидного минерала) происходит следующее (рис. 5.3). В диффузионном слое на поверхности минерала происходят реакции:



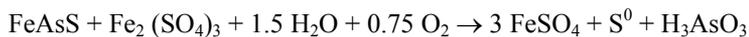
Бактерии окисляют Fe^{2+} и S^0 до конечных продуктов:



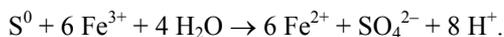
$$G = -74.4 \text{ кДж моль}^{-1}.$$



Окисление ионов двухвалентного железа и серы до конечных продуктов происходит непосредственно в диффузионном слое, что способствует быстрому взаимодействию иона трехвалентного железа с минералами:



и серой:



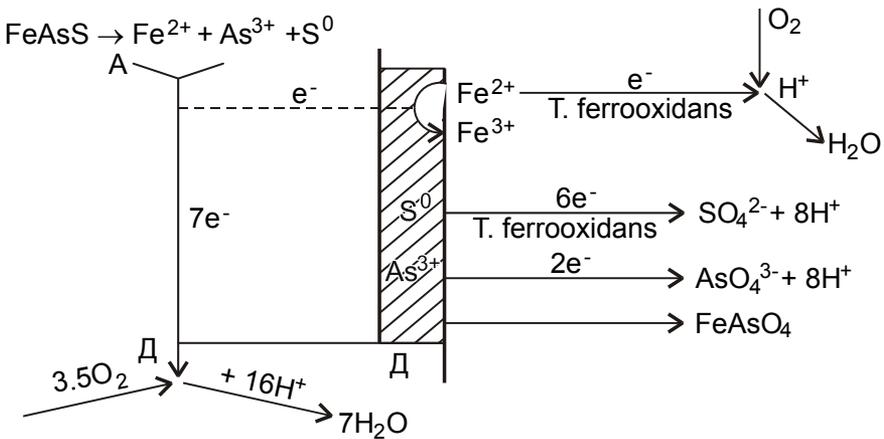
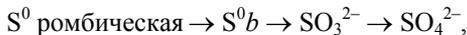


Рис. 5.3. Модель бактериально-химического окисления арсенопирита *Thiobacillus ferrooxidans* (по Г. И. Каравайко, 1984).
 А – анод; К – катод; Д – диффузионный слой

Механизмы бактериального окисления продуктов электрохимических реакций (Fe^{2+} , S^{2-} , S^0) пока не считаются выясненными. Более изученным является вопрос о механизме окисления железа. Полагают, что при бактериальном окислении Fe^{2+} оно поступает в периплазматическое пространство. Электроны акцептируются медьсодержащим белком рустисианином и переносятся через мембрану по цитохромной цепи. Перенос двух электронов обеспечивает возникновение на мембране потенциала в 120 мВ, а двух протонов – 210 мВ. Суммарный потенциал в 330 мВ достаточен для образования молекулы АТФ. Вторая часть реакции окисления железа, приводящая к образованию воды, реализуется на внутренней стороне цитоплазматической мембраны и в цитоплазме.

Четких представлений по механизму окисления сульфидной серы пока нет. Возможно, медьсодержащий белок является первичным акцептором сульфида, поступающего в периплазму; а далее процесс идет с участием цепи переноса электронов. Есть данные о том, что элементарная сера окисляется железоокисляющими бактериями до серной кислоты по реакции:



где $\text{S}^0 \text{ b}$ – редкий тип серы, напоминающий b модификацию селена.

Серя в коллоидном состоянии поступает в периплазматическое пространство клетки и, возможно, окисляется на поверхности цитоплазматической мембраны и во внутриклеточной мембранной системе. Механизм генерирования АТФ при этом, возможно, аналогичен процессу при окислении двухвалентного железа.

Сульфидные минералы эффективно окисляются бактериями при следующих условиях: микроорганизмы должны быть адаптированными к условиям конкретной породы, их концентрация в среде должна быть дос-

таточно высокой (1–5 г/л). Выщелачивание проходит активнее, если руда предварительно тонко измельчена до частиц, размером около 40 мкм, (обычно пульпы содержат твердого вещества до 20 %) при непрерывном перемешивании и аэрации, а также стабилизации pH и температуры среды на уровне, оптимальном для применяемых микроорганизмов.

Бактериальное выщелачивание, называемое также биогидрометаллургией или биоэкстрактивной металлургией, в промышленных масштабах довольно широко применяют для перевода меди и урана в растворимую форму. Существует несколько способов проведения бактериального выщелачивания металлов. Все они основаны на стимуляции роста железобактерий, способных окислять двухвалентное железо и серу. Эти методы весьма экономичны и чисты в экологическом плане; отличаются достаточной простотой и способны к самоподдерживанию благодаря образованию агента-растворителя металлов в виде раствора Fe^{3+} . Все полученные при бактериальном выщелачивании продукты реакции находятся в растворах, которые легко можно нейтрализовать; какие-либо вредные побочные газообразные продукты отсутствуют; процесс не зависит от масштабов его проведения. К трудностям реализации биологической методик относятся необходимость поддержания активной микробной культуры в строго контролируемых и заданных условиях, низкие в сравнении с химическими процессами скорости реакций, взаимосвязанность процессов выщелачивания со скоростями роста микроорганизмов.

Поверхностное выщелачивание куч и отвалов, в основном, сводится к извлечению металлов из отходов горнодобывающей промышленности или побочных бедных руд, переработка которых обычными способами не экономична. Методы поверхностного выщелачивания куч и отвалов, применяемые в настоящее время, мало чем отличаются от процесса, который использовали в XVIII веке в Испании на месторождении Рио-Тинто для извлечения меди из руд выветрившейся породы. Этот метод применяют обычно при извлечении меди из пород с низким ее содержанием (менее 0,4 % по весу). Такие отвалы накапливаются в больших количествах при крупномасштабной открытой разработке руды и могут занимать огромные площади и достигать в высоту нескольких сот метров. Самый большой отвал Бингхэм-Каньон находится в Америке и вмещает около $3,6 \cdot 10^8$ т породы.

Выщелачивание куч несколько отличается от выщелачивания отвалов. Кучи содержат повышенное по сравнению с отвалами содержание металла, извлечение которого в принципе возможно за достаточно короткий срок – несколько месяцев. В то же время выщелачивание отвалов может длиться годами. В кучах и отвалах измельченная руда уложена на наклонное водонепроницаемое основание. Поверхности куч и отвалов орошаются выщелачивающей жидкостью, представляющей собой слабый раствор кислоты и ионов трехвалентного железа. Сбор раствора с извлеченным металлом, профильтровавшегося через слой породы, собирают снизу. Поскольку при выщелачивании отвалов в среде, как правило, развиваются

природные микроорганизмы, засева не производят. Кислая среда и наличие кислорода способствует повышению каталитической активности *Thiobacillus ferrooxidans*. Выщелачивающая жидкость с помощью насосов подается наверх кучи руды, распыляется по ее поверхности и затем, самоотеком стекая вниз, фильтруется через нее. Обогащенные металлом растворы, стекающие из отвалов и куч, направляются в специальные пруды и водоемы для сбора и извлечения металла. Извлечение проводят методом простого осаждения или электролизом, а также более сложными методами. Оработанные выщелачивающие растворы, содержащие в основном растворенное железо, регенирируются в окислительных прудах и вновь подаются в отвалы. Типичная схема бактериального выщелачивания меди из куч и отвалов представлена на рис. 5.4.

Скорость извлечения металла при промышленном выщелачивании куч и отвалов зависит от многих факторов – активности культуры, качества руды и степени ее дисперсности, скорости фильтрации выщелачивающего раствора, аэрации. Так, при введении сжатого воздуха в толщу выщелачи-

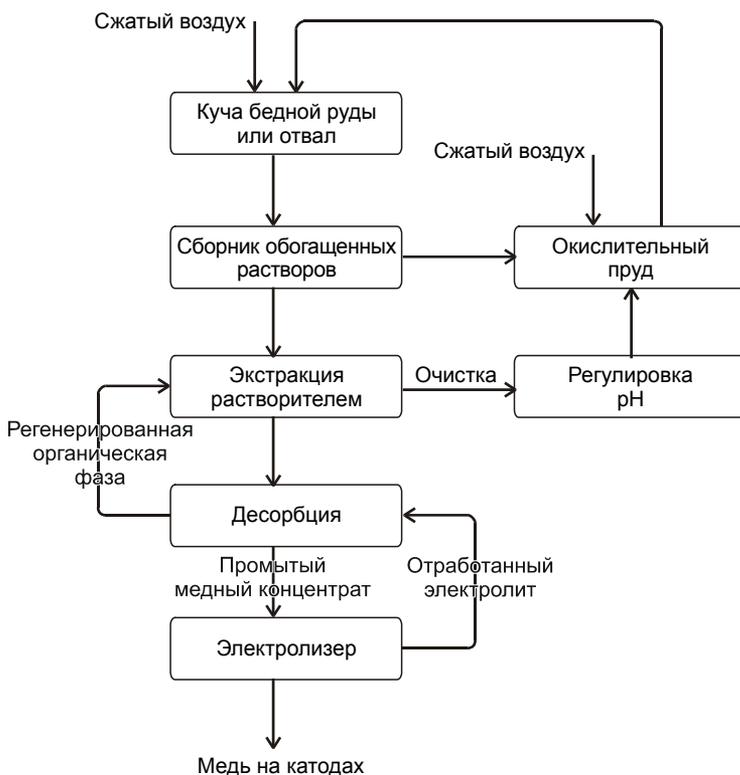


Рис.5.4. Схема бактериального выщелачивания меди из куч или отвалов руды (по Ф. Д. Пули, 1990).

ваемой медной руды скорость извлечения меди возрастает на 25 %.

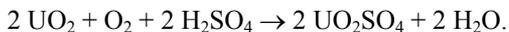
Применяемое, например, в штате Нью-Мексико (США) выщелачивание отвалов дает суточную добычу меди около 45–50 т; себестоимость меди, получаемой таким способом, в 1.5–2.0 раза ниже, по сравнению с обычными методами гидро- и пирометаллургии. В целом в США 15 % меди получают в процессах бактериального выщелачивания куч и отвалов.

Существенно реже микроорганизмы применяют для выщелачивания в промышленных масштабах урана. Для этого порода или руда должны быть богаты сульфидными минералами и не слишком интенсивно поглощать кислород.

В восточных районах Канады подземное бактериальное выщелачивание применяют для извлечения остаточного урана на выработанных площадках для этого стенки и крыши забоев промывают подкисленной водой. Развивающиеся естественные железобактерии *Thiobacillus ferrooxidans* окисляют двухвалентное железо до трехвалентного, которое окисляет четырехвалентный уран до шестивалентного, переводя его в раствор:



Возможно также прямое окисление урана бактериями:



Спустя 3–4 месяца забой снова промывают. Промывные воды, содержащие уран, собирают; уран извлекают растворителями либо с помощью ионного обмена. Схема добычи урана, обеспечивающая степень его извлечения до 90 %, дана на рис. 5.5.

Возможно применение бактериального выщелачивания в качестве первичной технологии для получения урана, – технология *in situ*. При этом рудное тело разрушают взрывом для увеличения проницаемости и поверхностной площади. Через скважины руда инжeksiруется слабым раствором серной кислоты и насыщается воздухом, через них же возможен отвод рудничных вод с извлеченным ураном. Преимуществом данного



Рис. 5.5. Схема выщелачивания урановой руды (по J. Johnson, 1985).

метода является его независимость от погодных условий, при этом также не обезображивается поверхность месторождения и не остаются груды отвалов. Однако процесс выщелачивания *in situ* – более трудоемкий процесс по сравнению с поверхностным выщелачиванием. Чтобы контролировать течение процесса и состояние микроорганизмов приходится создавать специальные инженерные схемы, так как в условиях глубоких залегающих пластов из-за высокого давления, гипербарии кислорода и пр. возможно изменение физиологического состояния железоокисляющих бактерий и как следствие – нарушение технологического цикла.

Наиболее сложным является процесс бактериального выщелачивания в аппаратах – так называемое **чановое выщелачивание**. Этот тип выщелачивания применяют в горнорудной промышленности для извлечения урана, золота, серебра, меди и других металлов из окисных руд или упорных сульфидных концентратов.

Обычное производство большинства металлов на начальной стадии предусматривает концентрирование металлосодержащего минерала из руды. В концентратах содержание металлов может на порядок превосходить их концентрации в исходных рудах и породах. Бактериальное выщелачивание сульфидных концентратов имеет несомненные достоинства, так как может быть реализовано непосредственно в месте получения концентрата в районе разрабатываемого месторождения без больших и дорогостоящих затрат на транспортировку. Однако лимитирующим моментом бактериального выщелачивания являются довольно низкие скорости протекания этих процессов, а также неполная растворимость некоторых металлов.

Работами последних лет показано, что экономически выгодно получать медь из халькопиритного концентрата, так как скорость выщелачивания может достигнуть до 700 мг/л·ч, образуемый при этом выщелачивающий раствор содержит 30–50 г/л меди. Разработаны бактериальные технологии получения цинка, меди и кадмия из смешанных сульфидных концентратов с 94 % степенью экстракции названных металлов.

Чановое выщелачивание упорных сульфидных концентратов проводят в проточном режиме в серии последовательно соединенных аппаратах большого объема (30×50×6 м) с перемешиванием, аэрацией при стабилизации рН, температуры и концентрации микроорганизмов в пульпе (рис. 5.6.). Перед загрузкой в аппараты концентраты измельчают и смешивают со слабым раствором серной кислоты.

На ход процесса влияют многие параметры: рН, температура, скорость протока пульпы, а также плотность пульпы и размер частиц концентрата. Важным моментом чанового выщелачивания является наличие систем, контролирующих и стабилизирующих многие из перечисленных параметров. Результатом этого является эффективное протекание процесса. Схема чанового выщелачивания сульфидных концентратов замкнутая. Обрат-

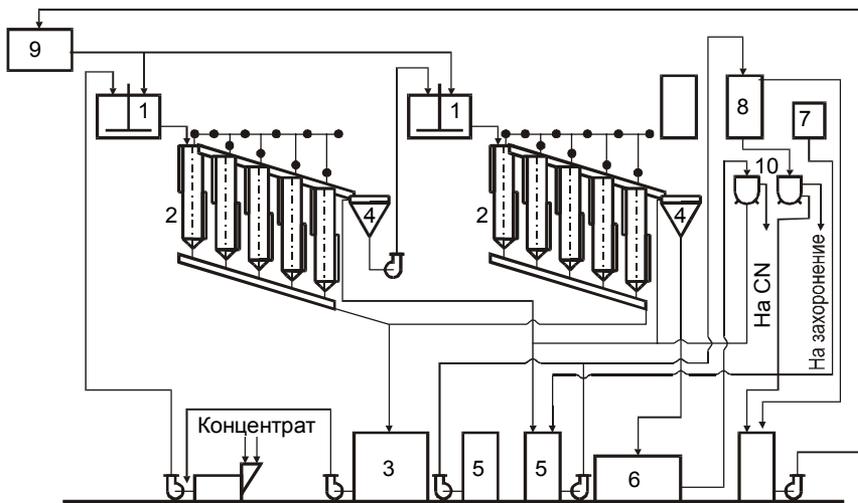
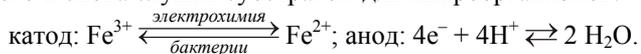


Рис. 5.6. Схема установки чанового выщелачивания металлов (по Г. И. Каравайко, 1984).

1 – контактный чан, 2 – пачка, 3 – чан для сбора оборотных растворов, 4 – обезвоживающий конус, 5 – чан для сбора остатка после выщелачивания, 6 – отстойник конечного продукта, 7 – подача известкового молока, 8 – чан-отстойник, 9 – чан для сбора оборотных растворов, 10 – нутч-фильтр.

ные воды после регенерации используются в качестве питательной среды для бактерий и выщелачивающего раствора.

Определенную проблему при чановом выщелачивании представляет обеспечение процесса инокулятом. При чановом выщелачивании работают с плотными пульпами при концентрации клеток в культуре до 1.0–1.5 г/л АСБ. Для получения активной микробной культуры существует несколько способов. Наиболее эффективен способ культивирования железокисляющих бактерий в проточном электрохимическом культиваторе сопряженно с электровосстановлением субстрата. В процессе роста микроорганизмы окисляют двухвалентное железо до трехвалентного, а в ходе электрохимических превращений железо восстанавливается до двухвалентного и снова служит субстратом для микроорганизмов:



В промышленных масштабах чановое выщелачивание применяется при переработке комплексных медно-цинковых концентратов. В составе этих комплексных концентратов присутствует несколько минералов – халькопирит (CuFeS_2), пирит (FeS_2), сфалерит (ZnS). Сфалерит имеет более низкий ЭП, поэтому из концентрата селективно выщелачивается цинк. Другие металлы выщелачиваются слабее. Так, если за 72–96 ч выщелачивания извлекается около 90 % Zn, то Cu и Fe, соответственно, 25 и 5 %. Оловосодержащие концентраты включают пирит, халькопирит, арсенопирит и оловянные минералы в виде окислов олова. Из этого комплекса ми-

нералов бактерии окисляют, прежде всего, низкопотенциальный арсениопирит (FeAsS). Мышьяк представляет собой вредную примесь и чрезвычайно затрудняет извлечение олова или золота из таких концентратов. Селективное бактериальное выщелачивание мышьяка позволяет получить оловянный и медный концентраты. Этот подход также делает перерабатываемыми трудно доступные золотосодержащие концентраты, содержащие пирит и арсениопирит. Золото в таких концентратах тонко вкраплено в кристаллическую решетку и извлечь его методом цианирования можно только после вскрытия или разрушения кристаллической решетки. Пирометаллургический обжиг таких мышьяково-содержащих концентратов сильно загрязняет окружающую среду вредными арсинами (AsH_3) и дает низкую степень извлечения благородных металлов, поэтому мало пригоден. Применение бактериального выщелачивания позволяет в экологически безопасном процессе селективно извлечь мышьяк из концентратов и перевести его в раствор. После извлечения мышьяка из таких концентратов удается извлечь методом цианирования до 90 % золота и серебра.

Биосорбция металлов из растворов

Ужесточение законов по охране окружающей среды и требования к качеству воды делают необходимым совершенствование существующих и разработку новых, более эффективных методов очистки вод от металлов. Биологические методы в последние годы находят все большее применение для извлечения металлов из промышленных, а также бытовых сточных вод. Эти методы, в отличие от дорогостоящих физико-химических, характеризуются достаточной простотой и эффективностью. Обычно для этих целей загрязненные металлами воды собирают в отстойниках или прудах со слабым течением, где происходит развитие микроорганизмов и водорослей. Эти организмы накапливают растворенные металлы внутриклеточно или, выделяя специфические продукты обмена, переводят их в нерастворимую форму и вызывают осаждение. Многие микроорганизмы способны накапливать металлы в больших количествах. В ходе эволюции в них сформировались системы поглощения отдельных металлов и их концентрирования в клетках. Микроорганизмы, помимо включения в цитоплазму, способны также сорбировать металлы на поверхности клеточных стенок, связывать метаболитами в нерастворимые формы, а также переводить в летучую форму (рис. 5.7.). Селекция в этом направлении и применение новых генноинженерных методов позволяют получать формы, активно аккумулирующие металлы и на их основе создавать системы биочистки. Идея использования микроорганизмов для извлечения металлов из растворов, помимо огромного экологического значения, важна также и как способ получения экономически важных металлов.

Основными процессами извлечения металлов из растворов с участием микроорганизмов являются: **биосорбция, осаждение металлов в виде сульфидов, восстановление шестивалентного хрома.**

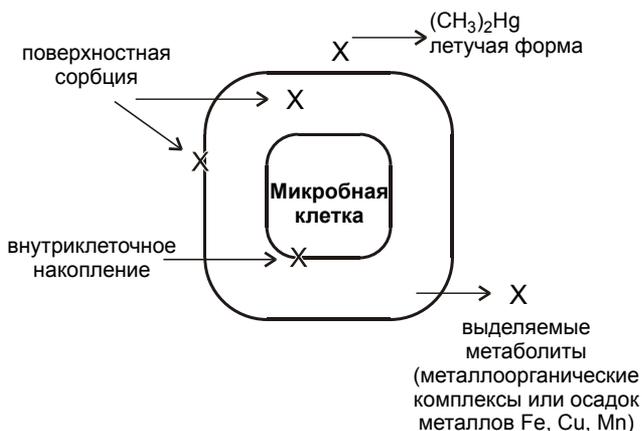


Рис. 5.7. Возможные типы взаимодействий между металлами (X) и микробной клеткой (по К. Браейерли и др., 1988).

С помощью биосорбции даже из разбавленных растворов возможно 100 % извлечение свинца, ртути, меди, никеля, хрома, урана и 90 % золота, серебра, платины, селена.

Внутриклеточное содержание металлов, как установлено, может быть очень значительным – для урана и тория до 14–18 % от АСБ денитрифицирующих микроорганизмов, для серебра – до 30 % АСБ. Недавно установлена способность водорослей, дрожжей и бактерий (*Pseudomonas*) эффективно сорбировать уран из морской воды.

Способы проведения биосорбции различны: возможно пропускание раствора металлов через микробный биофильтр, представляющий собой живые клетки, сорбированные на угле. Промышленно выпускаются также специальные биосорбенты, например «биосорбент М» чешского производства, изготовленный в виде зерен из микробных клеток и носителя размером 0.3–0.8 мм. Сорбент используют в установках, работающих на ионообменных смолах; его емкость составляет 5 мг урана на 1 г АСБ клеток (максимальная емкость – до 120 мг). Возможно также производство сорбентов на основе микробных полисахаридов. Такие сорбенты можно широко применять в различных, включая природные, условиях, они просты в употреблении. После концентрирования металлов микроорганизмами на следующей стадии металлы следует извлечь из микробной биомассы. Для этого существуют различные способы – как неструктурные, так и основанные на экстракции путем разрушения (например, пирометаллургическая обработка биомассы или применение кислот и щелочей).

Извлечение металлов из растворов на основе осаждения сульфидов известно давно. Сульфатредуцирующие микроорганизмы выделяют сероводород, который практически полностью связывает растворенные металлы, вызывая их осаждение. На основе данного метода возможно, например,

извлечение меди и растворов, содержащих до 8.5 г/л меди в форме цианида; полнота извлечения достигает 98.5 %.

Представляет практический интерес также метод восстановления шестивалентного хрома в растворах. Известны бактерии, способные в анаэробных условиях восстанавливать шестивалентный хром, содержащийся в бытовых сточных водах, до трехвалентного, который далее осаждается в виде $\text{Cr}(\text{OH})_3$.

Обогащение руд

К перспективным направлениям биогеотехнологии металлов относится направление, ориентированное на обогащение руд и концентратов. Весьма эффективным представляется применение для этих целей сульфатредуцирующих бактерий, с помощью которых можно разработать принципиально новые процессы и существенно улучшить существующие.

При проведении процессов флотации окисленных минералов свинца и сурьмы применение сульфатредуцирующих бактерий повышает на 6–8 % извлечение минералов в результате сульфидизации окислов; в процессах флотации церуссита (PbCO_3) извлечение свинца возрастает на 20–25 %. Применение сульфатредуцирующих бактерий для десорбции ксантогената с поверхности некоторых минералов после флотации позволяет селективно разделить некоторые минералы (CuFeS_2 и MoS_2 , PbS и ZnS).

Таким образом, биологические методы активно дополняют и частично позволяют заменить традиционные методы горнодобывающей отрасли. Многие вопросы биогеотехнологии в настоящее время успешно решены. Это получение меди, никеля, кобальта, марганца, мышьяка и ряда других металлов. Медь и уран получают в больших масштабах в процессах кучного и подземного выщелачивания. С помощью чанового выщелачивания удастся перерабатывать многие концентраты и получать цинк, медь, олово, серебро, золото и др. Разрабатываются и находят все большее применения процессы биосорбции металлов из растворов и сточных вод; намечены подходы и начинают применяться биологические методы в процессах обогащения руд и концентратов. Применение биотехнологических методов позволяет увеличивать сырьевые ресурсы, обеспечивает комплексное извлечение металлов, не требует сложной горной техники; процессы легко поддаются регулированию и автоматизации и позволяют решать многие природоохранные задачи.

Глава 6. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АЛЬТЕРНАТИВЫ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Эффективность сельскохозяйственных технологий в производстве продуктов питания зависит от многих факторов, включая эколого-географические, экономические, а также от возобновляемых биологических ресурсов, таких, как культурные растения, домашние животные, микроорганизмы. Повышение биологической продуктивности в сельском хозяйстве является предметом активных исследований комплекса различных биологических наук. Биотехнологические методы традиционно используются в сельском хозяйстве для повышения плодородия почв, борьбы с вредителями и возбудителями болезней культурных растений и животных, приготовления продовольственных продуктов, их консервирования и улучшения питательных свойств. При этом удельный вес биотехнологии для развития и повышения эффективности традиционных сельскохозяйственных технологий постоянно возрастает. В настоящее время особые перспективы в создании и распространении новых культивируемых сортов растений обещает применение новейших методов биотехнологии – клеточной и генетической инженерии. Усилия биотехнологов направлены на увеличение выхода продукции и повышение ее питательности, усиление устойчивости культивируемых биологических видов к неблагоприятным условиям внешней среды, патогенам и вредителям. При этом остается актуальной проблема поддержания разнообразия среди культивируемых видов и сохранения генетических ресурсов в целом.

6.1. БИОПЕСТИЦИДЫ

Практически одновременно с развитием животноводства и растениеводства возникла проблема защиты культурных растений и домашних животных от вредителей и болезней. Сначала человек использовал примитивные средства истребления и отлова вредных животных, затем для уничтожения стал применять хищных животных (собак, кошек, птиц). Постепенно, с развитием сельскохозяйственных технологий способы борьбы совершенствовались; появились первые примитивные химические средства уничтожения насекомых и грызунов с использованием отваров, настоев, древесной золы и пр. Бурное развитие химии и переход сельского хозяйства на интенсивные технологии привело к появлению и применению огромного разнообразия химических веществ для борьбы с вредителями и болезнями культивируемых видов. Первоочередное место заняли пестициды – ядовитые химические вещества, используемые для борьбы с вредителями, болезнями и сорняками. Однако только небольшая часть

(около 10 %) применяемых и вносимых в окружающую среду пестицидов достигает цели; основная же масса этих веществ вызывает гибель полезных организмов, аккумулируется в биологических объектах, нарушает равновесие в природных экосистемах и биоценозах, загрязняет почвы, водоемы, воздух. Химические пестициды не обеспечили при этом полную защиту сельскохозяйственных культур; большое число насекомых и сорняков остались неконтролируемыми и продолжают наносить огромный вред сельскому хозяйству. Более того, вредители начинают приобретать резистентность к пестицидам. Появились данные о том, что для уничтожения некоторых вредителей приходится применять сверхвысокие дозы пестицидов, в тысячи раз превосходящие начальные дозы токсикантов в первые годы их применения. В настоящее время в литературе описаны сотни видов членистоногих, резистентных к различным пестицидам (ДДТ, карбаматам, пиретроидам, фосфорорганическим соединениям). Таким образом, применение пестицидов вступило в явное противоречие с глобальной проблемой защиты окружающей среды.

Это вызывает необходимость поиска других, более эффективных средств и методов защиты, не оказывающих отрицательного воздействия на человека и окружающую среду в целом. Большие перспективы среди разрабатываемых подходов имеют биологические методы.

Биологические агенты применяли для уничтожения вредителей с древнейших времен. Например, китайцы использовали фараоновых муравьев для уничтожения вредителей в зернохранилищах. Во времена Аристотеля в период интенсивного одомашнивания пчел и тутового шелкопряда человек сталкивался с массовыми заболеваниями этих насекомых. Этот период можно считать началом зарождения микробиологических методов борьбы с вредителями. Но только в конце XIX века работами Л. Пастера и И.И. Мечникова была заложена научная основа этого направления. Мечникову удалось выделить возбудителя болезни хлебного жука – мускаринный гриб (*Metarrisium anisopliae*), и он рекомендовал использовать данную культуру для борьбы с жуком – вредителем злаковых. Пастер предложил применять бактерию – возбудитель куриной холеры для борьбы с дикими кроликами; Мечников этого же возбудителя – для уничтожения сусликов. С тех пор направление, основанное на использовании микроорганизмов – природных патогенов, для борьбы с возбудителями болезней и вредителями культурных биологических видов в природных условиях, непрерывно совершенствуется. Выделено и описано множество микроорганизмов, патогенных для грызунов и насекомых, и на их основе созданы и продолжают разрабатываться эффективные препараты.

Использование микроорганизмов в качестве биопестицидов – сравнительно новое направление биотехнологии, но уже имеющее существенные достижения. В настоящее время бактерии, грибы, вирусы находят все более широкое применение в качестве промышленных биопестицидов. Тех-

нология производства этих препаратов весьма различна, как различна природа и физиологические особенности микроорганизмов-продуцентов. Однако имеется ряд универсальных требований, предъявляемых к биопестицидам, основными среди них являются: селективность и высокая эффективность действия, безопасность для человека и полезных представителей флоры и фауны, длительная сохранность и удобство применения, хорошая смачиваемость и прилипаемость. В настоящее время для защиты растений и животных от насекомых и грызунов применяются, помимо антибиотиков, около 50 микробных препаратов, относящихся к трем группам: это бактериальные, грибные и вирусные препараты.

Бактериальные препараты

К настоящему времени описано свыше 90 видов бактерий, инфицирующих насекомых. Большая их часть принадлежит к семействам Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Micrococcaceae, Bacillaceae (табл. 6.1). Большинство промышленных штаммов принадлежит к роду *Bacillus*, и основная масса препаратов (свыше 90 %) изготовлена на основе ***Bacillus thuringiensis* (Bt)**, имеющих свыше 22 серотипов. Штаммы Bt используют для борьбы с различными вредителями – гусеницами, комарами, мошкой.

Впервые Bt была выделена в 1915 г. Берлинером из больных гусениц мельничной огневки. Штаммы *Bacillus thuringiensis*, помимо образования спор, которые при попадании внутрь насекомого вызывают септицемию, синтезируют также ряд экзо- и эндотоксинов. Первый токсин, идентифицированный у Bt, – α -экзотоксин (фосфолипаза C), является продуктом растущих клеток; предполагают, что эффект данного токсина, летальный для насекомых, связан с распадом в тканях незаменимых фосфолипидов. Второй токсин – β -экзотоксин, состоящий из аденина, рибозы и фосфора. Предполагают, что его молекула представляет собой нуклеотид, сложно связанный через рибозу и глюкозу с аллосилициевой кислотой, а его токсическое воздействие состоит в прекращении синтеза насекомыми РНК. Третий токсин – γ -экзотоксин. Его структура и действие мало изучены; предполагают, что он относится к фосфолипидам. Четвертый токсин – кристаллический δ -эндотоксин, образуется одновременно со спорой и выделяется в среду. Интактные кристаллы нетоксичны, но при попадании в пищеварительный тракт насекомых под воздействием щелочных протеаз разрушаются с образованием действующего токсина. Кристаллические эндотоксины полипептидной структуры классифицированы в четыре группы: токсины, активные в отношении чешуекрылых (молекулярная масса 130–160 кД); активные в отношении чешуекрылых и двукрылых (70); активные в отношении жесткокрылых (72 кД) и активные по отношению к личинкам двукрылых (состоят из нескольких активных белков молекулярной массы от 27 до 130 кД). Специфичность протеаз насекомых

**Наиболее распространенные инсектопатогенные бактерии
и инфицируемые ими насекомые (по G. A. Hardy, 1986).**

Бактерии	Насекомые
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Саранчи
<i>Pseudomonas septica</i>	Жук-навозник, жук-древесинник
<i>Vibrio leonardia</i>	Огневка пчелиная большая, мотылек кукурузный
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Бабочка-голубянка, бабочка-толстоголовка
<i>Proteus vulgaris</i>	Саранчи
<i>Salmonella enteritidis</i>	Огневка пчелиная большая
<i>Diplococcus</i> spp.	Майский хрущ, шелкопряд тутовый, шелкопряд непарный, шелкопряд дубовый походный
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Различные бабочки, моли
<i>B. popilliae</i>	Жук-навозник
<i>B. sphaericus</i>	Комары
<i>B. moritai</i>	Мухи

различных видов определяет разницу воздействия токсина. Не все насекомые обладают протеазами, способными разрушать данный токсин, чем и определяется его избирательность.

Препараты на основе *Bt* относятся к токсинам кишечного действия. Типичными последствиями их воздействия являются паралич кишечника, прекращение питания, развитие общего паралича и гибель насекомого. Кристаллы варьируют между различными серотипами и изолятами *Bt* и обладают широким спектром активности против различных насекомых.

Бактерии группы *Bacillus thuringiensis* эффективны в отношении 400 видов насекомых, включая вредителей полей, леса, садов и виноградников; наибольший эффект от применения данных препаратов получают при борьбе с листогрызущими вредителями. Известно более 100 штаммов *Bt*, объединенных в 30 групп по серологическим и биохимическим признакам. Микробиологическая промышленность многих стран выпускает различные препараты на основе *Bt*, способных образовывать споры, кристаллы и токсические вещества в процессе роста.

Технология получения биопестицидов на основе энтомопатогенных бактерий представляет собой типичный пример периодической гомогенной аэробной глубинной культуры, реализующейся в строго стерильных и контролируемых условиях. Цель процесса – получение максимального урожая бактерий и накопление токсина. Основу питательной среды составляет дрожжеполисахаридная смесь и пеногаситель (кашалотовый жир). Длительность ферментации при 28–30°C в режиме перемешивания и аэрации (0.2 л O₂/л среды·мин.) составляет 35–40 часов до накопления в культуральной жидкости 5–10 % свободных спор и кристаллов от общего их количества (при титре культуры не менее 1 млрд. спор в 1 мл). Далее

споры и кристаллы отделяются в процессе сепарирования и обезвоживаются. Товарная форма препарата – сухой порошок, а также стабилизированная паста. Выход пасты при влажности 85 % и титре около 20 млрд. спор/г – около 100 г/м³ культуральной жидкости. Стабилизация пасты осуществляется смешиванием ее с карбоксиметилцеллюлозой, обладающей высокой сорбционной емкостью. Споры и кристаллы в результате стабилизации образуют трехмерную сетчатую структуру, в которую равномерно проникает консервант, обеспечивая длительную сохранность препарата. На основе пасты в процессе высушивания в распылительной сушилке получают сухой продукт с остаточной влажностью не выше 10 % и с титром 100–150 млрд. спор/г. Препарат усредняется и стабилизируется каолином. Готовый сухой продукт содержит до 30 млрд. спор/г.

Узким местом при производстве энтомопатогенных бактериальных препаратов является борьба с фаголизисом. Есть предположение, что вирулентность и фагустойчивость бактериальных штаммов находятся в обратной зависимости, поэтому невозможно сочетать эти свойства в одном штамме. Для избавления от фаголизиса ведется селекция на фагустойчивость среди производственных штаммов; рекомендована смена культивируемых штаммов, а также строгая регламентированность и стерильность на стадии ферментации.

Первый отечественный препарат получен на основе *Bac. thuringiensis* var. *dallieriae* – **энтобактерин**. Препарат выпускается в виде сухого порошка с содержанием спор и кристаллов эндотоксина по 30 млрд./г, пасты с наполнителем, а также жидкости в смеси с прилипателем. Эффективен против чешуекрылых насекомых (капустной белянки, капустной моли, лугового мотылька, пяденицы, шелкопряда, боярышницы и др.). Применяют препарат путем опрыскивания растений суспензией из расчета 1–3 кг/га для овощных и 3–5 кг/га – для садовых культур с использованием наземных и авиационных опрыскивателей. Оптимальные условия внешней среды для применения энтобактерина – отсутствие осадков и диапазон температур 18–32°C. Препарат – кишечного действия, при поедании гусеницами вместе с листовой зеленью после попадания в желудочно-кишечный тракт насекомого вызывает общую интоксикацию и затем полный паралич. Основная масса насекомых гибнет в течение 2–10 дней; при необходимости проводят повторную обработку при сокращении дозы в 2 раза. Применение энтобактерина повышает урожайность овощных культур и садовых культур на 50 и 5 ц/га соответственно.

Дендробациллин является препаратом для защиты леса от сибирского шелкопряда на основе *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus*. Бактерия была выделена из гусениц сибирского шелкопряда – вредителя хвойных лесов. Этот препарат также эффективен для защиты овощных, плодовых и технических культур от разных насекомых (совок, белянок, молей, пядениц и др.). Препарат не токсичен для полезной энтомофауны, исключение со-

ставляют тутовый и дубовый шелкопряд, применяется и действует аналогично энтобактерину.

Инсектин – по действию аналогичен дендробациллину, предназначен для борьбы, главным образом, с сибирским шелкопрядом. Получен на основе *Bac. thuringiensis* var. *insectus*.

БИП – биологический инсектицидный препарат, изготавливается в виде сухого порошка и пасты на основе *Bac. thuringiensis* var. *darmsladiensis*; эффективен против вредителей плодовых (от яблочной и плодовой молей, пядениц, листоверток, шелкопрядов) и овощных культур (беянок, молей).

Бактулоцид – бактерия, на основе которой выпускается данный препарат, выделена из водоема и отнесена к группе *Bt* H₁₄, так как ей присвоен 14-й серотип. Бактулоцид выпускается в виде сухого порошка с титром спор около 90 млрд./г и содержит такое же количество кристаллов. Применяется в жидком виде разбрызгиванием по поверхности водоема. Доза в зависимости от характера водоема и вида комаров варьирует от 0.5 до 3.0 кг/га водной поверхности. Кристаллический эндотоксин бактулоцида высоко токсичен для личинок комаров и мошек, но совершенно безопасен для других насекомых и гидробионтов, обитающих в одном водоеме с комарами. Продуцент данного эндотоксина привлек внимание ученых многих стран. За рубежом аналогичные препараты («Текнар», «Скитал», «Виктобак», «Бактимос») для борьбы с комарами и мошкой выпускают на основе бактерии *Bacillus israelensis* штамм *Bt* H₁₄, которая продуцирует данный эндотоксин. Наиболее эффективными являются отечественный «Бактулоцид» и французский «Бактимос».

Вторая группа препаратов, выпускаемых за рубежом, базируется на бактериальном серотипе *Bac. thuringiensis* 3A3B (HD-1). Первый препарат был получен во Франции в 1938 г. на основе штамма, выделяющего опасный для человека токсин – β. Были разработаны специальные методы очистки культуральной жидкости для удаления токсина из товарной формы продукта. Впоследствии был выделен штамм *Bt* HD-1, свободный от данного эндотоксина, который в настоящее время является основой многих промышленных препаратов, предназначенных для борьбы с различными садовыми и огородными вредителями. Серия препаратов, по действию аналогичная энтобактерину, («Дипел», «Виобит», «Бактоспейн») изготавливается на основе 3A3B в виде порошков и жидкостей и применяется с помощью распылительных и разбрызгивающих устройств, вызывая массовую гибель гусениц. В Чехии производят препарат «Батурин-82» с использованием глубинной культуры *Bt. var. kurstaki*, эффективный против различных вредителей овощных, зерновых культур и лесов. В США начат выпуск препарата «Фоил» на основе конъюгатов двух штаммов *Bt*, для борьбы с гусеницами овощных культур и ряд других эффективных препаратов.

Широкая разработка новых препаратов на основе *Bt* интенсивно проводится во многих странах. Поиск осложняется нестабильностью и лизогенией штаммов-продуцентов. До настоящего времени мало изучены вопросы контагиозности энтомопатогенных бактерий и возможности эпизодического способа их использования.

Методы геной и клеточной инженерии в настоящее время позволяют проводить работы, направленные на улучшение существующих продуцентов и продуктов *Bt*. Сегодня известно, что гены, контролирующие синтез кристаллов, локализованы на небольшом числе плазмид значительной молекулярной массы. Токсический белок, синтезируемый *Bt*, клонирован в *E. coli* и *B. subtilis*, его экспрессия получена даже в течение вегетативной фазы роста. Есть сведения о клонировании белка, токсичного для бабочек, в клетках табака. В выросшем целом растении табака каждая клетка вырабатывала токсин. Таким образом, растение, приобретающее токсин, само становится устойчивым к насекомым: поедая листья, гусеница погибает, не причинив существенного вреда растению. Американскими компаниями «Монсанто» и «Агроцетус» проводятся полевые испытания хлопчатника с внедренным в хромосому геном *Bt*. Резистентность к гусеницам передается семенам и последующим поколениям растений. Начато получение рассады трансгенного картофеля и томатов с внедренным геном *Bt*, токсичного для чешуекрылых. Создан трансгенный инсектоустойчивый тополь с внедренным геном антитрипсиназы в клетки тканей. Фермент снижает усвоение белка насекомыми, что приводит к сокращению популяции.

Соединение и клонирование белков из различных энтомопатогенных штаммов позволило получить рекомбинантные штаммы с расширенным спектром активности. Описаны новые штаммы с активностью против дополнительных насекомых (например, жесткокрылых). Фирма «Сандоз» успешно провела полевые испытания нового продукта «Джавелин», полученного на основе NRD-12, штамма 3A3B, исходно активного против непарного шелкопряда. Препарат эффективен также против вредителей овощных культур, а также культур хлопчатника. Генноинженерными методами в США создан эндофит *Calvibacter xylicynodontis*, модифицированный экспрессией гена токсина *Bt*. Препарат «Инсайд» вводится в семена кукурузы, после их прорастания бактерии размножаются в сосудистой системе растения, продуцируя биоинсектицид; эффективен против мотылька кукурузного. Компания «Микоген» выпускает на рынок генноинженерный препарат на основе токсина *Bt. var. san diego*, экспрессированного в бактерии *Ps. fluorescens*, препарат может применяться для защиты от колорадского жука и долгоносика картофеля, баклажан, томатов; его стоимость близка к стоимости химических пестицидов, эффективность действия – свыше 90 %.

Новейшие биотехнологические методы могут способствовать повышению эффективности бактериальных препаратов в результате изменения

плазмид в бактериях, контролирующих синтез белка. Производство аспорогенных штаммов может упростить технологию ферментации и снизить стоимость препаратов. Возможно получение биоинсектицидов с более специфичными мишенями.

Грибные препараты

Многочисленные виды энтомопатогенных грибов широко распространены в природе; они поражают широкий круг насекомых, обладая для этого различными механизмами, включая контактный, что облегчает их применение. Грибы хорошо сохраняются в виде спор и продуцируют разнообразные биологически активные вещества, усиливающие их патогенность. Однако грибные препараты не применяются пока достаточно широко. Это связано, во-первых, с определенными технологическими трудностями, возникающими при их культивировании и, во-вторых, – обусловлено жесткими требованиями к факторам окружающей среды (высокая активность грибных препаратов проявляется только в условиях высокой и стабильной влажности).

Известны сотни видов энтомопатогенных грибов, но наиболее перспективными считаются две группы грибов – мускаринидные грибы из *Euascomycetes* и энтомотрофные из семейства *Entomophthoraceae*. Основное внимание привлекают следующие грибные патогены: возбудитель белой мускардины (род *Beauveria*), возбудитель зеленой мускардины (род *Metarhizium*) и *Entomophthora*, (поражающий сосущих насекомых). И. И. Мечников, открыв возбудителя зеленой мускардины у хлебного жука и применив препарат из гриба *Metarhizium anisopliae*, заложил основу новому направлению защиты растений. У большинства грибов возбудителем инфекции являются конидии. Грибы в отличие от бактерий и вирусов, проникают в тело насекомого не через пищеварительный тракт, а непосредственно через кутикулу. При прорастании конидий на кутикуле насекомого ростовые трубки могут развиваться на поверхности или сразу начинают прорастать в тело; часто этот процесс сопровождается образованием токсина. Если штамм слабо продуцирует токсин, мицелий достаточно быстро заполняет все тело насекомого. Заражение насекомых грибными патогенами в отличие от других микроорганизмов может происходить на различных стадиях развития (в фазе куколки или имаго). Грибы быстро растут и обладают большой репродуктивной способностью. Для того чтобы применение грибных препаратов было эффективным, надо применять их в определенное время сезона и в оптимальной концентрации. Для этого необходимо знание этиологии грибных повреждений и как они взаимодействуют с насекомыми. Это обеспечит получение на основе грибов эффективных и достаточно экономичных пестицидов. В настоящее время, несмотря на имеющиеся ограничения, грибные препараты широко исследуются и начинают применяться для борьбы с вредителями.

Metarhizium anisopliae – наиболее известный энтомопатогенный гриб, описанный более 100 лет назад как зеленый мускаринидный гриб. На его

основе были получены первые препараты биопестицидов в промышленных масштабах. Этот гриб поражает многие группы насекомых, включая слюнного пастбищного клопа и вредителя сахарного тростника. В сочетании с вирусом препарат данного гриба используют для контроля численности жука-носорога, являющегося главным вредителем пальм на островах в южной части Тихого океана. Есть данные о том, что с его помощью можно бороться с коричневой цикадой – вредителем риса.

Verticilium lecanii является единственным грибным энтомопатогеном, на основе которого на западе успешно выпускают препараты в промышленных масштабах. Его изучение началось в начале 80-х годов. Этот организм способен контролировать в оранжереях численность тлей и алейроцид в течение нескольких месяцев.

Hirsutella thompsonii использовали некоторое время в США для производства препарата «Микар» с целью контроля численности цитрусовых клещей. Выпуск препарата, однако, был прекращен, так как он не оправдал надежд.

В США, Чехии, Австралии и на Кубе разработаны эффективные препараты на основе мускаринного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill для борьбы с вредителями различных сельскохозяйственных растений, для контроля популяции насекомых в почве. Для инфицирования саранчи в США используют австралийский микроскопический гриб *Entomophthora graxibuli*. Саранча погибает в течение 7–10 дней после применения препарата. Споры гриба после зимовки в почве способны поражать следующие поколения насекомых. В Японии выпущен в продажу инсектицид на основе гриба *Aspergillus* для защиты лесов от вредителей; препарат вносят в почву, он поглощается корнями деревьев, распространяясь по сосудистой системе дерева, защищает его от насекомых.

Боверин является отечественным грибным препаратом, который изготавливают на основе конидиоспор *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Препарат выпускают в виде порошка с титром 2–6 млрд. конидиоспор/г. Применяют также в комплексе с химическими препаратами (хлорофосом, фозалоном, севином) при уменьшении дозы последних в 10 раз от принятой нормы для индивидуального химического пестицида. Боверин почти также эффективен, как лучшие из доступных химических пестицидов. После заражения насекомого *B. bassiana* выделяет боверицин, циклодепептид-токсин. Боверин безопасен для человека и теплокровных, не вызывает ожогов у растений.

Получение боверина возможно как экстенсивным поверхностным, так и более экономичным глубинным способом ферментации. Последний, однако, является достаточно трудной технико-технологической задачей. При глубинной ферментации гриб размножается вегетативно, образуя гифальные тельца (гонидии), которые по действию близки воздушным конидиям, но уступают им в устойчивости (в процессе распылительного вы-

сушивания до 90 % гонидиоспор погибает). Конидиоспоры удается получать в глубинной культуре на основе оптимизированной питательной среды. При этом до 90 % выращенных клеток переходит в конидиоспоры достаточно высокой вирулентности. Культивирование гриба реализуется в строго стерильных условиях в глубинной культуре при 25–28°C в течение 3–4 суток. Питательная среда содержит (%): кормовые нелизированные дрожжи – 2, крахмал – 1, хлорид натрия – 0,2, хлорид марганца – 0,01, хлорид кальция – 0,05. Существенное значение имеет концентрация азота, так как его дефицит снижает скорость роста, а избыток – стимулирует образование гонидий. Оптимальная концентрация аминного азота составляет 10–15 мг %. Титр конидиоспор в культуре достигает 0,3–1,3 млрд./мл. Культуральную жидкость сепарируют с образованием пасты остаточной влажности 70–80 % и титром спор 8 млрд./г. Пасту высушивают распылительным способом до влажности 10 % и титра $8 \cdot 10^9$ клеток/г. В готовый препарат часто добавляют вещество-прилипатель и стабилизируют каолином.

Поверхностное культивирование гриба требует больших производственных площадей и более трудоемко, поэтому имеет меньшие масштабы. Способ реализуется в разных вариантах: на жидкой среде без соблюдения правил стерильности, аэрации и перемешивания; на твердой среде или жидкой среде в условиях асептики и комбинированным способом пленки. При твердофазной ферментации с использованием сусло-агара, картофеля, зерна пшеницы или кукурузы образование конидиоспор завершается на 12–15 сутки. На жидких средах образование спор наблюдается через 7–10 суток, а на 18–25 сутки сформированную спороносную пленку снимают. Полученный материал высушивают, размалывают и смешивают с тальком или торфом. Производительность метода – до 800 кг в месяц, титр – $1,5 \cdot 10^9$ /г. Готовая форма препарата представляет собой сухой мелкодисперсный порошок конидиоспор, смешанный с каолином; титр – 1,5 млрд. конидий/г. Препарат эффективен против листогрызущих садовых вредителей, яблоневой плодовой жорки, вредителей леса; а также вредителя картофеля – личинок колорадского жука. Используют боверин путем опрыскивания растений, норма расхода – 1–2 кг/га. В сочетании с небольшими добавками химических пестицидов препарат вызывает гибель 100 % личинок всех возрастов.

Перспективы грибных препаратов очевидны. Однако необходимы серьезные исследования для понимания этиологии вредителей. Это позволит предвидеть последствия взаимодействия между растением, вредителем и биопестицидом. Достижения последних лет свидетельствуют о принципиальной применимости методов геномной инженерии для изучения физиологии, генетики и биохимии грибов. Это может привести к большому интересу к грибам как возможным продуцентам биопестицидов и, следовательно, к созданию более стойких и эффективных препаратов на их основе.

Вирусные препараты

Весьма перспективны для защиты растений энтомопатогенные вирусы. Вирусы чрезвычайно контагиозны и вирулентны, узко специфичны по действию, хорошо сохраняются в природе вне организма-хозяина. Эти препараты вследствие высочайшей специфичности практически полностью безопасны для человека и всей биоты. Заражаются насекомые вирусами при питании. Попавшие в кишечник тельца-включения разрушаются в щелочной среде. Освободившиеся вирионы проникают через стенку кишечника в клетки и реплицируются в ядрах. Вирусы способны размножаться только в живой ткани организма-хозяина. Это обстоятельство делает очень трудоемкой процедуру получения вирусного материала в значительных количествах. Получают вирусный материал при размножении вирусов в насекомых. После гибели насекомых их массу измельчают, затем выделяют вирусный материал и подвергают очистке. В соответствии с рекомендациями Всемирной Организации Здравоохранения 1973 г. особое внимание при изучении вирусов было обращено на одну группу вирусов – бакуловирусы. В этой группе отсутствуют вирусы, патогенные для позвоночных. Однако другие группы – вирусы цитоплазматического полигедроза, энтомопатогенные вирусы и иридовирусы – содержат потенциальные биопестициды против насекомых, поэтому сейчас рассматриваются как перспективные биопестициды.

Новые биотехнологические методы можно применять для проверки безопасности вирусов, чтобы увереннее судить об их поведении в млекопитающих. Для этого используют нуклеотидные зонды и генетическое маркирование, что было невозможно несколько лет назад.

Бакуловирусы – это двуцепочечные ДНК-вирусы, в трех их группах имеются биопестициды: вирусы ядерного полиэдроза (ВЯП), вирусы гранулеза (ВГ), фильтрующиеся вирусы.

Первый вирусный инсектицид был выпущен компанией «Сандоз» в 70-е годы. Препарат предназначен для борьбы с коробочным червем хлопчатника.

Производство вирусных препаратов основано на массовом размножении насекомого-хозяина на искусственных средах. На определенной стадии развития насекомое заражают, добавляя суспензию вирусов в корм. Спустя 7–9 суток погибших гусениц собирают, высушивают и измельчают. В измельченную массу добавляют физиологический раствор (1 мл на 1 гусеницу), взвесь фильтруют. Осадок суспендируют в небольшом количестве физиологического раствора и заливают глицерином. Препарат стандартизируют (титр 1 млрд. полиэдров/мл) и разливают во флаконы. Одна зрелая гусеница способна дать до 36 млрд. телец-включений, что составляет до 30 % ее массы. Препараты готовят в виде дустов, суспензий и масляных форм. При получении сухого препарата вирусный материал смешивают с каолином; для получения масляной формы осадок смешивают с 50 % раствором глицерина до титра 2 млрд. полиэдров/г.

Существует два метода применения вирусных препаратов: интродукция вирусов в плотные популяции насекомых на сравнительно небольших площадях и обработка зараженных участков путем опрыскивания или опыления на ранних стадиях развития личинок.

Видовое название энтомопатогенных вирусов состоит из группового названия и поражаемого хозяина (например, «полиэдроз непарного шелкопряда» или «полиэдроз американской бабочки»). Отечественной промышленностью выпускается несколько вирусных препаратов; в том числе «**вирин-ГЯП**» (против гусеницы яблоневой плодожорки), «**вирин-КШ**» (против кольчатого шелкопряда), «**вирин-ЭНШ**» (против непарного шелкопряда), «**вирин-ЭКС**» (против капустной совки). В США усовершенствован процесс производства нескольких вирусных препаратов для защиты лесов («ТМ-Биоконтроль» и «Циптек»).

Вследствие достаточной трудоемкости производства эти препараты пока не нашли массового применения. Специалисты считают, что потребуются годы, чтобы вирусные препараты смогли занять значительное место на рынке биопестицидов.

Для оптимизации процесса применения вирусных препаратов необходимо выяснить распространенность вирусов в природе и характеристики их выживания. Новые методы, например, использование конкретных олигонуклеотидных последовательностей для маркировки вирусного генома, обещаают существенный прогресс в этой области. Начинается применение техники рекомбинатных ДНК для введения новых последовательностей в ген оболочечных белков, который далее используется для синтеза новых белков. Эти новые белки могут включать белковые токсины *Bacillus thuringiensis*, потенциально усиливая токсические эффекты вируса.

Новые методы биотехнологии могут повлиять на цену вирусных препаратов. В настоящее время большинство вирусов способно размножаться только в тканях насекомых, и только немногие могут расти в культуре клеток насекомых. Разработка техники клеточных культур насекомых для размножения вирусов весьма перспективна. Для этого необходимо получение высокопродуктивных линий клеток, оптимизация питательных сред, выбор эффективных систем вирус-клетка. По этой технологии в США начато получение коммерческого препарата «Элькар». Успешно проводятся разработки по рекомбинантным бакуловirusам с генами, кодирующими водный обмен насекомых. После применения такого препарата насекомые погибают в течение 5 дней от обезвоживания либо перенасыщения водой. Обнаружен новый вирусный белок, на два порядка усиливающий эффективность вирусных пестицидов. Белок выделен из белковой оболочки гранулеза *Trichoplusia* – бакуловirusа, поражающего непарный шелкопряд, совку, волокнянку; препарат назван вирусным усиливающим фактором (VEF).

Усовершенствование и развитие технологии клеточных культур насекомых, а также отбор и даже создание новых вирусов, включая производство эукариотических вирусов в прокариотах, может повлиять на конкурентоспособность вирусных пестицидов по сравнению с химическими препаратами.

6.2. БИОГЕРБИЦИДЫ

Гербициды – химические препараты для борьбы с сорняками, составляют около 50 % суммарного рынка химикатов для сельского хозяйства. Химическим гербицидам свойственны те же недостатки, что и аналогичным пестицидам. Поэтому потребность в создании биогербицидов очевидна. К последним относятся микроорганизмы-патогены растений, ферменты, а также полупродукты, получаемые биоконверсией.

Для борьбы с отдельными видами сорняков, устойчивых к химическим препаратам, применяют специфические и токсичные для них микроорганизмы. Наиболее часто используют грибные фитопатогены и грибные фитотоксины. Для расширения их сферы применения необходимо получение грибных форм, более устойчивых по отношению к изменяющимся условиям внешней среды. Бактериальные фитопатогены, менее чувствительные к факторам внешней среды, в меньшей степени поражают растения. Последние разработки в данном направлении обещают существенные перспективы. США и Япония совместно разрабатывают получение биогербицидов на основе природных микроорганизмов для борьбы с сорняками сои, арахиса, риса. В США на рынок поступил препарат на основе штамма *Phytophthora palmivora* для борьбы с повиликой. Япония начала производство биогербицида на основе билафоса, продуцируемого штаммом *Streptomyces hydroscopicus*. Препарат обладает широким спектром действия, нарушает азотный обмен в листьях и стеблях сорняков.

Наряду с биогербицидами, для защиты растений все шире применяют биологические препараты для борьбы с возбудителями заболеваний. На основе бактерий *Pseudomonas fluorescens* получен препарат «P-2-79», подавляющий развитие свыше 40 видов микроорганизмов, поражающих пшеницу, ячмень, рожь. На основе *Pseudomonas* проводят защиту семян сорго и кукурузы от антрактоза и ризоктониоза; хлопчатника и сои – от вилта и ряда других заболеваний. Для борьбы с фитопфторозом яблонь предложен способ применения почвенной бактерии *Enterobacter aerogenes*. Защита многих овощных культур от заболеваний, вызываемых некоторыми видами микроскопических грибов, обеспечивается применением препарата на основе культур *Trichoderma polysporum*, *T. viride*.

В целом масштабы применения различных препаратов для борьбы с вредителями и возбудителями болезней сельскохозяйственных культур непрерывно возрастают. По разным экспертным оценкам рынок этих препаратов к 2000 году может составить от 8 до 20 млрд. долл./год.

6.3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ УДОБРЕНИЯ

Микроорганизмы играют большую роль в повышении плодородия почвы, так как в процессе роста и развития улучшают ее структуру, обогащают питательными веществами, способствуют более полному использованию удобрений.

Интенсивное растениеводство обедняет почву азотом, так как значительная его доля ежегодно выносится из почвы вместе с урожаем. С древних времен для восстановления и улучшения почв существует практика использования бобовых растений, способных в симбиозе с азотфиксирующими микроорганизмами восполнять почвенные запасы азота в результате **диазотрофности** (усвоения атмосферного азота). Большой положительный эффект от возделывания бобовых вызвал постановку исследований явления диазотрофности.

Впервые наличие бактерий в клубеньках на корнях бобовых растений описали Лахман в 1858 и Воронин в 1866 г. Чистая культура азотфиксаторов была получена Бейеринком в 1888 г. Вскоре были выделены и описаны другие азотфиксирующие микроорганизмы; Виноградский в 1893 г. впервые выделил анаэробную спороносную бактерию, фиксирующую молекулярный азот, назвав ее в честь великого Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*; в 1901 г. Бейеринк открыл вторую свободноживущую азотфиксирующую бактерию *Azotobacter*. Высокая продуктивность азотфиксации у *Azotobacter* стала использоваться для интродуцирования этих бактерий в почву с целью восполнения ресурсов азота. Практическое применение нашли также симбиотические бактерии рода *Rhizobium*, развивающиеся в клубеньках бобовых растений.

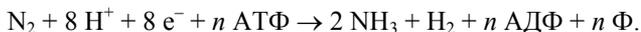
Как только была выяснена роль симбиотических бактерий рода *Rhizobium* в азотфиксации, стали разрабатывать способы внесения этих микроорганизмов в почву и также для инокуляции семян. Затраты на применение этих способов невелики, техника применения весьма проста, а эффект от их применения значителен. Культивирование бобовых, положительно влияя на азотный баланс почв, также облегчает борьбу с эрозией и помогает восстанавливать истощенные земли.

Технология получения азотных биоудобрений

Наиболее простой способ инокуляции основан на использовании почвы после выращивания на ней бобовых растений. Этот метод разработан в конце XIX века и применяется до настоящего времени. Недостаток метода – необходимость перемещения достаточно больших объемов почвы (100–1000 кг/га), а также возможность распространения болезней. Более эффективным оказалось применение для инокуляции семян специальных препаратов азотфиксирующих бактерий.

Клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, развиваясь в корневой системе бобовых растений, в симбиозе с ними фиксируют атмосферный азот,

обеспечивая этим азотное питание растений. Согласно современным представлениям азотфиксация является восстановительным процессом превращения газообразного азота в аммиак, который в дальнейшем ассимилируется растениями с образованием аминокислот. Азотфиксирующие микроорганизмы обладают специфическим ферментом нитрогеназой, в активном центре которой происходит активирование инертной молекулы N_2 и восстановление до NH_3 :



Клубеньковые бактерии обладают избирательной способностью по отношению к растению-хозяину. Эта особенность азотфиксаторов положена в основу их классификации внутри рода *Rhizobium*. Так, для бактерий *Rh. leguminosarum* растением-хозяином являются горох, вика, кормовые бобы, чина, чечевица; для *Rh. phaseoli* – фасоль; *Rh. japonicum* – соя; *Rh. trifolii* – клевер; *Rh. vigna* – вigna, маис, арахис и др. Процесс азотфиксации протекает только в клубеньках на корнях бобовых растений, которые образуются в результате проникновения бактерий через корневые волоски в корень. Взаимоотношение бактерий с растениями зависит от комплекса условий, включая физиологическое состояние и условия роста растений, а также физиологическую активность и вирулентность бактерий. Под вирулентностью понимают способность бактерий проникать внутрь корня растений и вызывать образование клубенька. Существенное влияние на процесс образования клубеньков, следовательно, эффективность последующего процесса азотфиксации, оказывают температура и влажность почвы, наличие в ней необходимых для развития бактерий и растений биогенных элементов.

Первая коммерческая разновидность культуры для инокуляции семян (товарное название «**Nitragin**») была запатентована в Великобритании Ноббе и Хилтнером в 1896 г. Для разных бобовых в то время выпускали 17 вариантов культуры. В 20-е годы выпускалось много разновидностей инокулятов, среди них были чистые культуры азотфиксирующих микроорганизмов, смеси бактерий с песком или торфом, а также культуры, выращенные на агаре или в жидкой среде.

Бактерии выращивали на агаризованных средах, далее соскабливали с поверхности плотной среды и суспендировали в молоке. Суспензию бактерий выливали на кучу семян, перемешивали и далее семена высушивали в тени. Вскоре семена высевали. Данный метод пригоден для инокуляции сравнительно небольших объемов семян и применялся во многих странах с конца тридцатых до начала семидесятых годов. Затем с сокращением площадей, засеваемых люцерной в ряде европейских стран объемы использования метода сократились. Кроме этого, такие препараты азотфиксирующих бактерий после высушивания быстро погибают, то есть не могут использоваться в течение длительного времени. Этого недостатка лишены препараты инокулята на торфяной основе. Бактерии выращивают

обычным способом в глубинной культуре в стерильных условиях до достижения достаточно высокой плотности культуры (10^8 – 10^9 клеток/мл); в качестве основы среды используют дрожжевой экстракт или маннитол. Далее просушенный (остаточная влажность около 10 %), измельченный (200 меш) торф доводят до pH 6.5–7.0, добавляя CaCO_3 , и смешивают с жидкой культурой (40 % по массе). Препарат бактерий на торфяной основе в течение нескольких суток созревает. Затем его вновь перемешивают и фасуют в полиэтиленовые мешочки, которые герметизируют. При хранении препарата в условиях пониженной температуры жизнеспособность инокулята сохраняется достаточно долго, до 90 недель. При благоприятных условиях культуру можно хранить в течение года.

В качестве носителя для бактерий были опробованы различные композиции: смеси торфа с почвой, добавки люцерны и соломы, перегнившие опилки, бентонит и активированный уголь. В настоящее время для поддержания жизнеспособности симбиотических азотфиксирующих бактерий используют разнообразные носители, но лучшим считается торф. Сухие препараты азотфиксаторов, приготовленные на основе клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и предназначенные для повышения урожайности бобовых растений (гороха, фасоли, сои, клевера, люцерны, люпина и др.) в настоящее время выпускаются под товарным названием «**Нитрагин**». Помимо почвенного нитрагина, выпускают также сухой нитрагин – препарат бактерий с содержанием в 1 г не менее 9 млрд. жизнеспособных клеток, в качестве наполнителя используют мел, каолин, бентонит. Препараты сухого нитрагина с остаточной влажностью 5–7 % фасуют по 0.2–1.0 кг и хранят при 15°C в течение 6 месяцев. Вносят нитрагин путем опудривания семян сухим препаратом непосредственно перед посевом. Препараты нитрагина вносят в почву на фоне минеральных и органических удобрений. При инокуляции почв нитрагином урожайность бобовых культур возрастает на 15–20 %.

Аналогом азотных удобрений является другой препарат азотфиксирующих бактерий – «**Азотобактерин**», который выпускается промышленностью в нескольких вариантах. Бактерии рода *Azotobacter* являются свободноживущими азотфиксирующими микроорганизмами и обладают высокой продуктивностью азотфиксации (до 20 мг/г использованного сахара). Помимо связывания атмосферного азота, эти бактерии продуцируют биологически активные соединения (витамины, гиббериллин, гетероауксин и др.). В результате этого инокуляция азотобактерином стимулирует прорастание семян и ускоряет рост и развитие растений. Более того, *Azotobacter* способен экскретировать фунгицидные вещества. Этим угнетается развитие в ризосфере растений микроскопических грибов, многие из которых тормозят развитие растений. Однако бактерии рода *Azotobacter* весьма требовательны к условиям среды, особенно концентрации в почве фосфатов и микроэлементов, и активно развиваются в плодородных почвах.

Технология получения сухого препарата азотобактерина аналогична получению сухого нитрагина и включает получение посевного материала и культивирование бактерий в контролируемых условиях в глубокой стерильной культуре до начала стационарной фазы. Готовый препарат с содержанием не менее 5 млрд. жизнеспособных клеток на 1 кг при остаточной влажности 5–7 % фасуют в полиэтиленовые мешки 0.4–2.0 кг, которые герметизируют и далее хранят при температуре до 15°C. Промышленностью выпускаются также торфяной и почвенный препараты азотобактерина. Для этого в качестве наполнителя используют разлагающийся торф с нейтральной реакцией среды или богатую перегноем почву. В просеянную почву или торф вносят суперфосфат (0.1 %) и известь (1–2 %). Смесь фасуют в бутылки объемом 0.5 л, увлажняют водой до 40–60 % и стерилизуют. В стерильный наполнитель вносят выросшую культуру бактерий. Длительность хранения препаратов – 2–3 месяцев. При обработке семян препарат вносят из расчета 3–6 кг на 1 га пашни.

Способ применения азотобактерина определяется посевным материалом: семена зерновых культур опудривают сухим препаратом механическим способом; клубни картофеля и корневую систему рассады овощных культур равномерно обрабатывают водной суспензией препарата.

В последние годы для изучения биологической азотфиксации стали применять методы молекулярной биологии и новейшие методы генетики. Установлена возможность с помощью колифага P₁ размножать свободноживущую азотфиксирующую бактерию *Klebsiella pneumoniae* M5 и с ее помощью трансдуцировать nif-гены (гены азотфиксации). Также доказано, что перенос nif-генов возможен с помощью плазмид от штамма-азотфиксатора к штамму, не обладающему diazотрофностью. Обнаружены конъюгативные плазмиды, несущие гены азотфиксации, относительно легко передающиеся при конъюгации от штамма к штамму. После этого появились надежды на получение методами клеточной и генной инженерии растений, способных фиксировать атмосферный азот. Однако перенос генов азотфиксации и их экспрессия является чрезвычайно сложной задачей.

Активные исследования в этом направлении, начатые в середине 70-х годов, пока не принесли желаемых плодов. После установления в начале 90-х гг. структуры и организации nif-генов усилия исследователей были сосредоточены на изучении функционирования этих генов и природы их продуктов. Вслед за открытием крупных плазмид в ряде азотфиксирующих микроорганизмов было установлено, что эти плазмиды содержат не только структурные гены нитрогеназы, но и гены, ответственные за развитие корневых клубеньков в определенных видах бобовых растений. Биохимические характеристики нитрогеназы разных азотфиксаторов сходны. Это свидетельствует о гомологичности генов, кодирующих их синтез. Гомология структуры ДНК явилась предпосылкой для клонирования nif-

генов с целью локализации их у новых diaзотрофов. Конструирование самопереносимых плазмид, несущих гены азотфиксации, позволило передать diaзотрофность нефиксирующим азот видам: *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Erwinia herbicola*, *Ps. fluorescens*; без получения экспрессии *nif*-гены были клонированы также в дрожжах (рис.6.1).

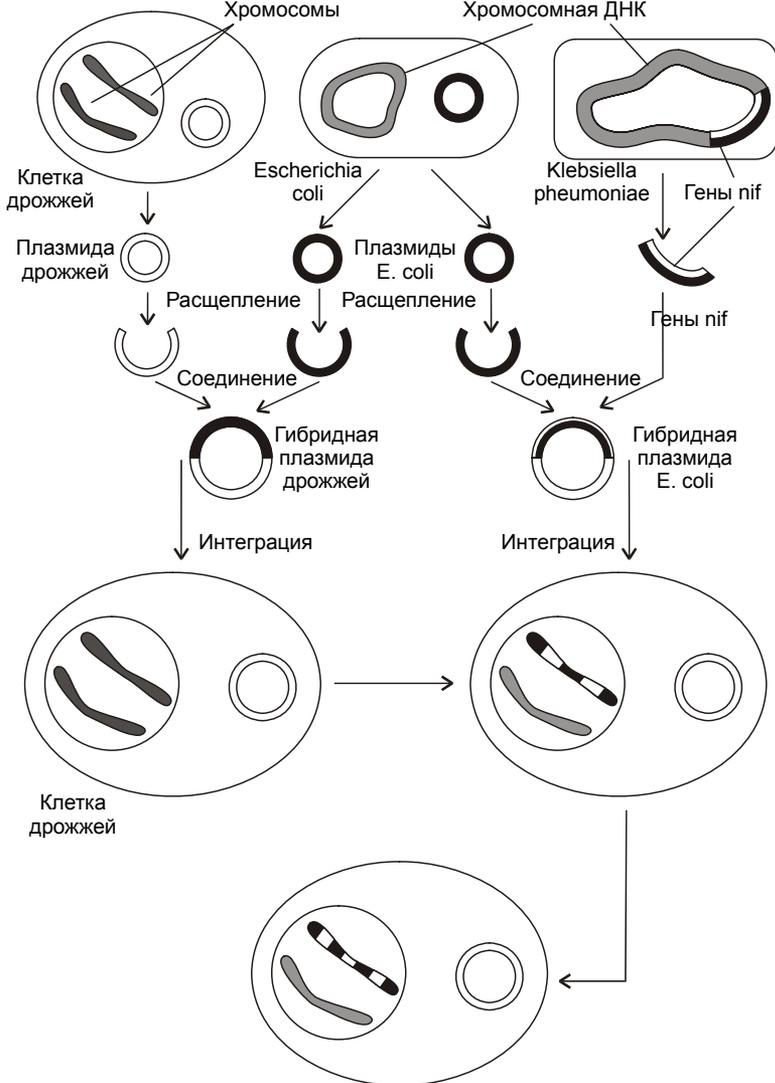


Рис. 6.1. Гены азотфиксации были встроены в геном дрожжей: на первом этапе получают гибридные плазмиды слиянием плазмидиз *E.coli* и дрожжевой клетки, на втором – выделяют *nif*-гены из *Klebsiella pneumoniae* и встраивают их во вторую плазмиды из *E.coli*, которую внедряют в хромосому дрожжей (по У. Бриллиу, 1991).

Перенос более простых группировок генов, по сравнению с целой *nit*-областью, осуществим на основе вирусных векторов, например, вируса мозаики цветной капусты. При переносе *nit*-генов в растения возникают огромные, пока непреодолимые трудности, связанные не только с собственно переносом генов, но регуляцией их экспрессии. Однако разработанные к настоящему времени методы клонирования и рекомбинации нуклеиновых кислот создали предпосылки для переноса генов азотфиксации в клетки растений и получения их экспрессии. При переносе генов азотфиксации в высшие растения, помимо трудностей генетического характера, имеются и другие. Не изучена регуляция взаимосвязи генов фиксации азота с генами, ответственными за синтез переносчиков электронов и кофакторов, необходимых для функционирования нитрогеназы. Последняя должна быть защищена от ингибирующего воздействия кислорода.

Необходимы также интенсивные исследования генетики растений для подбора эффективных растений – хозяев, а также исследования, направленные на модификацию генома микроорганизмов для получения организмов, способных существовать в симбиозе не только с бобовыми растениями (например, хлебными злаками).

Фундаментальные исследования по переносу генов азотфиксации в высшие растения, по-видимому, приведут к многообещающим открытиям и коренному перевороту практики азотного питания растений.

Снабжение растений фосфатами

Фосфатные ионы в почве, как известно, не очень подвижны, поэтому вокруг корневой зоны растений часто возникает дефицит фосфора. **Везикулярно-арбускулярная микориза (ВА)** играет существенную роль в плодородии почвы, так как способствует поглощению растениями фосфатов из почвы. Эндо- и экзомикоризы представляют собой особые структуры, формирующиеся внутри или вокруг мелких корешков растений в результате заражения почвенными непатогенными грибами.

Возникающие симбиотические отношения между грибами и растениями, выгодные растению-хозяину. Микориза ВА, образуемая грибом-фикомицетом из семейства *Endogonaceae*, встречается довольно часто в большинстве почв практически всех климатических зон. Эта микориза присуща большей части покрытосемянных, многим голосемянным, а также некоторым папоротникам и печеночникам. Микориза ВА найдена у большинства важнейших видов культурных растений. Гифы микоризы, вырастающие из мицелия и распространяющиеся далеко за пределы корневой системы, переносят фосфат-ионы из зон их присутствия в клетки хозяина. Наибольший эффект ВА приносит растениям со слабой корневой системой. Благодаря этой микоризе рост растений на бедных фосфатами почвах улучшается. Одновременно с поступлением фосфатов растения также обогащаются микроэлементами. Доказано, что в растениях с микро-

ризой концентрация гормонов роста выше, чем в ее отсутствие. Если ВА-микориза формируется в присутствии азотфиксирующих бактерий, у бобовых усиливается процесс образования клубеньков и азотфиксация.

Для размножения эндофитов в почве нужна их инокуляция. Однако размножение грибов происходит только в присутствии растения-хозяина. Единственный эффективный способ получения больших количеств эндофита – выращивание на соответствующей линии растений. Инокулятом при этом служит смесь корней мицелия и спор. Выделенные споры, инфицированную почву или корни растения с ВА используют для инокуляции растения-хозяина, свободного от болезней, в так называемой горшечной культуре. Полученный таким образом инокулят используют для инокуляции растений. Несколько граммов неочищенного инокулята, полученного из горшечной культуры растения-хозяина, добавляют в среду или размещают поблизости от молодых корней, так, чтобы до пересадки растения в грунт, успела образоваться довольно мощная микориза. Метод эффективен при разведении лесов, цитрусовых, но не находит применения для инокуляции в полевых условиях, так как препарата нужно много (2–3 т неочищенного инокулята на 1 га). Получать такие количества инокулята ВА пока не представляется возможным.

Для улучшения питания сельскохозяйственных культур фосфатами эффективен метод применения **фосфоробактерина**. Препарат получают на основе спор культуры *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*. Эти бактерии превращают трудно усвояемые минеральные фосфаты и фосфорорганические соединения (нуклеиновые кислоты, нуклеопротеиды) в доступную для растений форму. Следует отметить, что фосфоробактерин не заменяет фосфорные удобрения и не действует без них. Положительный эффект от применения фосфоробактерина связан не только с доставкой усвояемых фосфатов к растениям, но обусловлен также действием биологически активных веществ (тиамина, биотина, никотиновой и пантотеновой кислот, витамина В₁₂ и др.). Данные биологически активные вещества, попадая на поверхность семян при инокуляции, а затем в ткани растения, стимулируют фосфорное и азотное питание, то есть благоприятно действуют на развитие растений на первых этапах.

Технология получения препарата фосфоробактерина во многом сходна с технологией получения сухого нитрагина и азотобактерина. Выращивание *Bac. megaterium* проводят в контролируемой глубинной культуре до стадии образования спор. Процесс проводят в строго стерильных условиях, так как многие производственные штаммы чувствительны к действию бактериофагов. Высушенную в распылительной сушилке при 65–75°C биомассу с остаточной влажностью 2–3 % смешивают с каолином, фасуют по 50–500 г в водонепроницаемые герметичные мешки. В 1 г препарата содержание жизнеспособных клеток – не менее 8 млрд. Препарат, в отличие от нитрагина и азотобактерина, стабилен. Поэтому он хорошо хранит-

ся при комнатной температуре длительное время. При хранении в течение года потеря жизнеспособности составляет около 20 %. Фосфоробактерин особенно эффективен при применении на черноземах, богатых фосфорорганическими соединениями. Семенной материал обрабатывают сухим фосфоробактерином механизированным способом непосредственно перед посадкой. Нормы расхода препарата составляют около 5 г и 200 г наполнителя (глина, почва, зола) на 1 га. При обработке клубней картофеля используют 0.1 % водную суспензию спор. Обработку проводят, равномерно увлажняя посевной материал. Применение фосфоробактерина повышает урожайность сельскохозяйственных культур на 10 %.

6.4. НОВЕЙШИЕ МЕТОДЫ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ.

Наибольший вклад биотехнологии в сельское хозяйство, по общему мнению, следует ожидать за счет улучшения свойств культурных растений с использованием новейших методов клеточной и генетической инженерии.

Культура растительных клеток и тканей

Первым применением новейших методов биотехнологии для высших растений стало их клональное размножение. Этому в значительной степени исследования в области фитогармонов, проведенные в конце 50-х годов. Способность регенерации большого числа растений из массы неорганизованных тканей (каллусов), пролиферирующих *in vitro*, и из культур органов и пазушных почек чрезвычайно эффективной. После того, как было выяснено, что клеточная дифференцировка и развитие растений, в основном, контролируются уровнями растительных гормонов, была продемонстрирована возможность создания условий *in vitro*, вызывающих клеточный рост, морфогенез и регенерацию растений из отдельных клеток или недифференцированных каллусов. Растительные клетки и культура тканей – основные объекты клеточной биологии, которая предоставляет возможности регенерации растений из протопластов, клеток и тканей, которые, в свою очередь, могут быть трансформированы или отобраны по специфическим генетическим признакам (рис.6.2). Культура растительных клеток позволяет сравнительно быстро получать многочисленные популяции в управляемых и контролируемых условиях среды на ограниченном пространстве и идентифицировать линии растений с повышенной биологической продуктивностью. Растительные клетки могут культивироваться как на жидких, так и твердых средах. Используемые при этом приемы аналогичны культивированию микроорганизмов. Процесс начинают со взятия в асептических условиях кусочков ткани от молодого здорового растения, как правило, используют листья или ствол. Ткань помещают в подобранную питательную среду при соответствующих физико-химических факторах среды. После получения каллуса возможно продолжение его выращивания

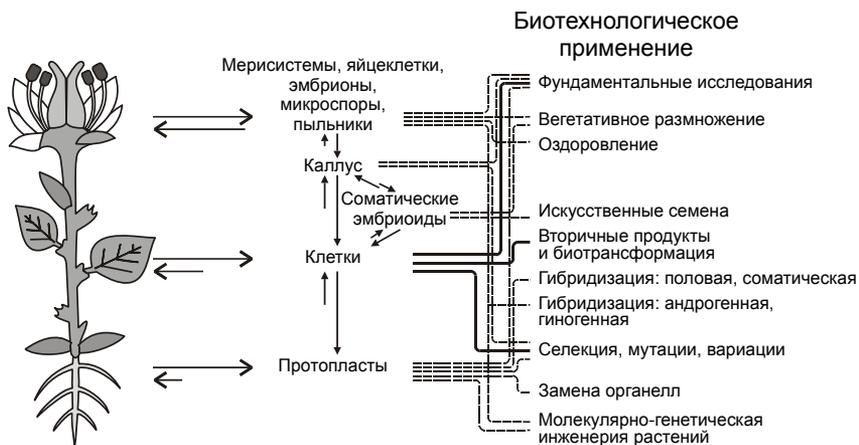


Рис. 6.2. Биотехнологическое использование культуры клеток и тканей растений. Длина стрелок указывает относительную легкость или трудность взаимных переходов (по Х. Борман, 1991).

на твердой среде или получение суспензии клеток. Суспендированные растительные клетки по сравнению с клетками каллуса более гомогенны, быстрее растут и имеют более высокие адаптивные возможности.

Культуры растительных клеток могут быть использованы для биотрансформации химических соединений и для эффективного синтеза биологически активных соединений *de novo*. В культуре клеток не только сохраняется способность продуцировать биологически активные соединения, свойственные исходному растению, но и возникает способность синтезировать новые ценные продукты, не обнаруженные в соответствующих интактных растениях (перицин, перикалин, хинокиол, ферригинол, акуамалин и др.). При этом в ряде случаев в клеточных культурах целевой продукт накапливается в более значительных количествах, чем в целых растениях. Возможно также получение мутантов с повышенными продукционными качествами. В крупных масштабах культивирование растительных клеток стали применять с середины 70-х годов. В настоящее время реализованы крупномасштабные культивационные системы растительных клеток объемом до 20 м³ для получения различных ценных веществ – ментола, женьшеня, убихинона-10, бетанина, камптотецина (антиканцероген), полипептидов – ингибиторов фитовирусов, агар-агара и др. Список этот пополняется. Общими недостатками метода являются: низкие скорости роста растительных клеток, высокая частота инфекции, генетическая нестабильность. Кроме этого, в суспензии клеток наблюдается их агрегация, дифференцировка, в результате чего снижается активность.

Этих недостатков лишены процессы с использованием иммобилизованных растительных клеток. Такие биологические системы более устойчивы к механическим повреждениям, при этом фаза роста клеток совпадает

ет с фазой образования продукта; клетки легко переносятся в новую среду или иные культивационные условия. Основные трудности данной технологии связаны с недостаточной изученностью регуляции метаболизма у эукариотических растительных клеток.

Особенностью клеточных культур растений является их способность к тотипотенции, – в определенной среде и определенных условиях можно регенерировать целое растение из одной клетки. Подобное свойство отсутствует у животных. Таким образом, в любой растительной клетке заложена генетическая информация, необходимая для дифференцировки клеток в процессе деления. Этот феномен используют при микроразмножении растений. Данная технология имеет существенные преимущества, так как позволяет быстро получать материал для размножения растений, включая системы, не содержащие возбудителей болезней, круглогодично иметь рассадочный материал и повышать его однородность, длительно хранить генетический материал и создавать новые генотипы.

С тех пор, как впервые удалось индуцировать из одной клетки регенерацию целого растения, техника культуры клеток стала широко применяться для клонирования. Тотипотенция была продемонстрирована на культурах тканей ряда растительных видов, а позднее – на соматических и половых клетках, изолированных из различных растений.

На рис.6.3 представлена схема клонального размножения растений *Catharanthus roseus* из верхушечных меристем. После проращивания стерильных семян *C. roseus* через 7 дней кончики побегов проростков срезали и проращивали в темноте, затем кончики проростков помещали на поверхность агаризованной среды Нича и культивировали на свету. Спустя 8 недель из апикальных меристем формировались проростки с развитой корневой системой. Эти проростки использовали для второго этапа размножения, в ходе которого эксплантаты, состоящие из одного узла и одной пары листьев формировали проростки с корнями и 4–5 парами листьев. После третьего пассажа развивались проростки с тем же числом узлов. Укоренившиеся проростки пересаживали в горшки со стерильной почвой. После 14-дневного периода акклиматизации проростки высаживали в почву; выживаемость проростков при этом составила 90 %.

В 1971 г. Табеке с сотрудниками, обрабатывая листья табака с целью растворения клеточных стенок сочетанием целлюлозы и пектиназы, добились успеха в получении протопластов. Протопласты при культивировании в жидкой среде в процессе деления формировали каллус, способный к регенерации целого растения. При этом свыше 90 % протоклонов (клонов, полученных из протопластов) были удивительно сходны с родительскими видами как по фенотипу, так и по генотипу. Протопласты позволили преодолеть обычную изменчивость, свойственную другим способам получе-

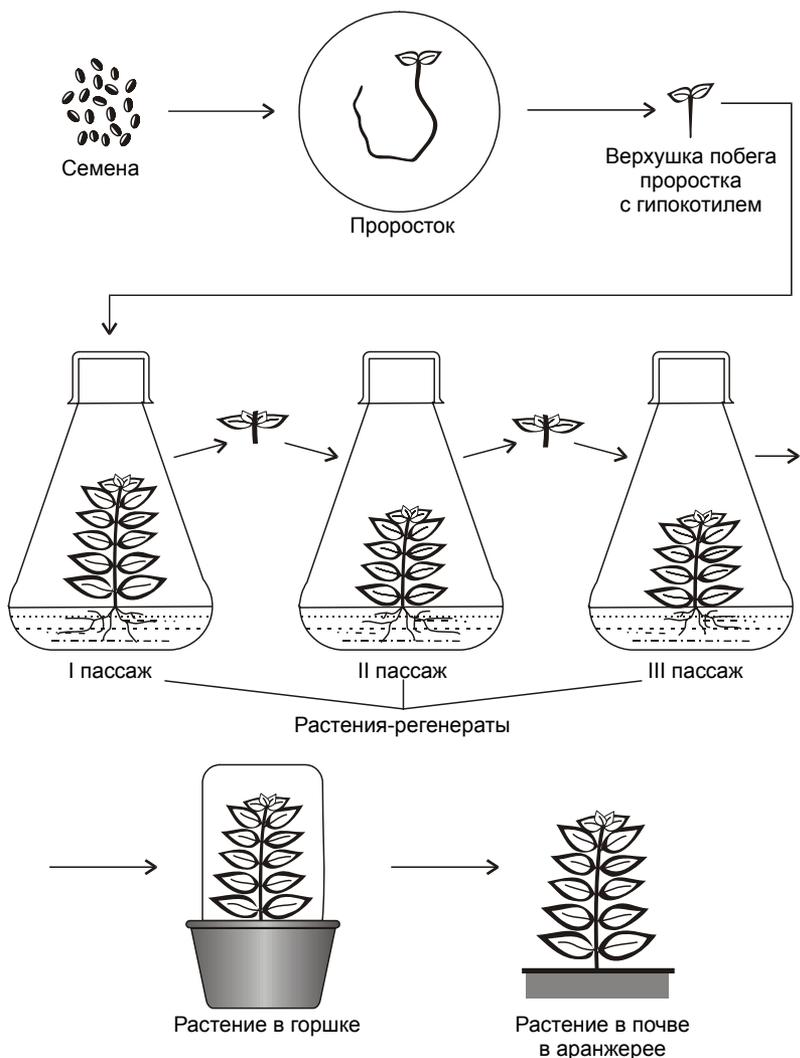


Рис. 6.3. Схема клонального микроразмножения *Catharanthus roseus* (по Н. Оледзка и др., 1991).

ния клонов. В конце 80-х годов в США была разработана техника регенерации растения картофеля из протопластов сорта Рассет Бербанк. В течение 12–14 дней протопласты формировали клеточные стенки, начинали деление и образовывали каллус. После этого их переносили в культуральную среду, делая три пассажа; в последней культуре были получены целые растения. Полученное огромное количество клонов (около 60 000) было проанализировано, при этом установили их неоднородность. Техника открывает огром-



Рис. 6.4. Меристемные регенеранты гороха посевного (слева) и клевера лугового (справа) на разных средах.
 а – с добавлением биологически активных веществ; б – без экзогенных регуляторов роста
 (по Х. Каллаку и А. Кыйвезу, 1991).

ные перспективы для эффективной селекции растений в лабораторных условиях. Такая работа проведена на протопластах табака, петунии и ряде других видов с целью получения форм, устойчивых к пестицидам. Появилась реальная возможность использовать технику регенерации целых растений их клеточных культур и каллусов для выведения новых сортов ряда важных культур (сои, маниока), для изменения сортов хлебных злаков, которые ранее не удавалось регенерировать из тканевых культур.

Культура растительных тканей, аналогично культуре клеток, позволяет достаточно быстро получать здоровые растительные клоны и на этой основе – перспективный рассадочный материал. После того, как было установлено, что апикальная меристема (небольшой участок недифференцированных клеток на кончике стебля) способна к росту с образованием целого растения, эта техника стала применяться для клонирования линий растений (рис. 6.4–6.5).

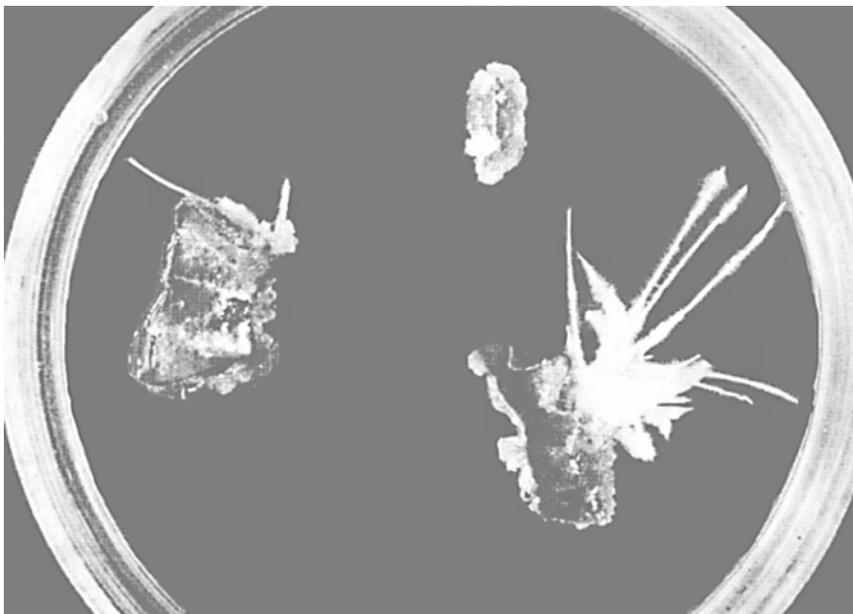
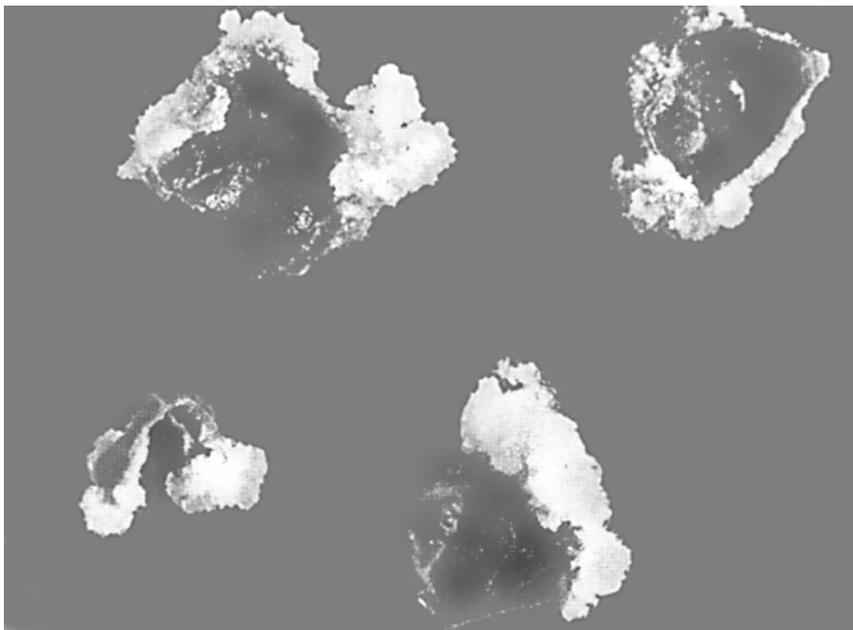


Рис. 6.5. Регенерация растений *in vitro*.
Регенерация *Citrullus vulgaris* из листовых дисков и сегментов hypocотыля.
Сверху – инициация каллусообразования, снизу – регенерация корней.

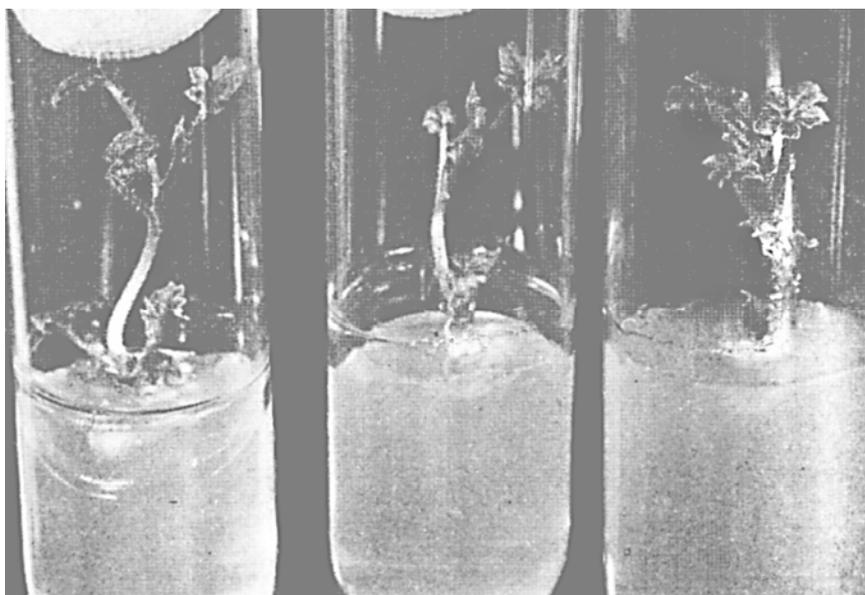
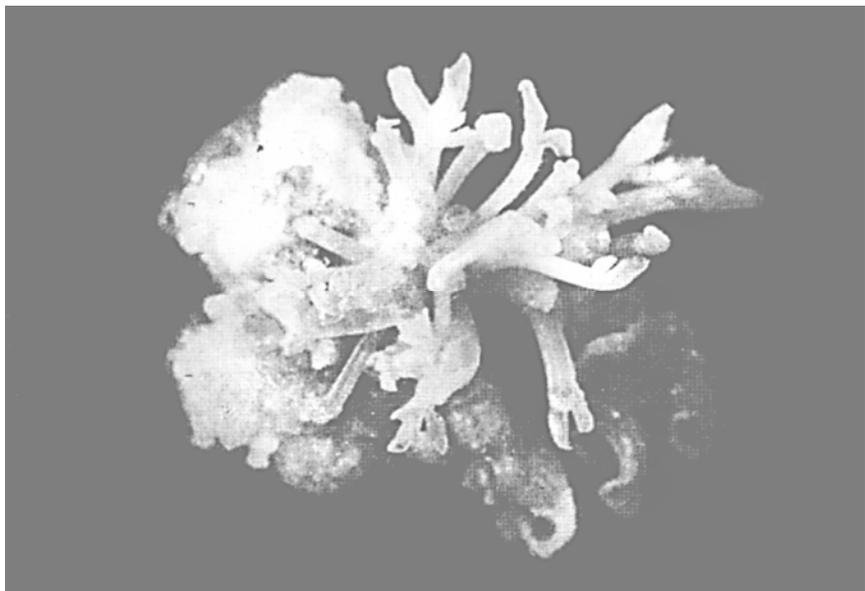


Рис. 6.5 – продолжение.
Сверху – регенерация побегов *Citrullus vulgaris*, снизу – регенерация полноценного растения арбуза
(по Э. С. Пирузян, 1988).

Клетки меристемы при перенесении в питательную среду делятся, образуя маленькое растение с пятью-шестью листиками. Через несколько недель выросший стебель разрезают на пять-шесть микрочеренков, которые в благоприятных условиях вырастают в целые растения. При культивировании растительных меристем за сравнительно короткий срок удается получить большое здоровое потомство (миллионы растений в год). Технология эффективна при использовании для размножения однолетних культур, так как позволяет получать молодые растения. Апикальная меристема свободна от вирусов. Растения, полученные при ее размножении, также не заражены вирусами. В результате применения этой техники сначала были получены безвирусные сорта георгинов, а затем восстановлен сорт картофеля (бель-де-фонтоне), практически исчезнувший из-за вирусного заражения, затем и сорта многих других растений.

Особые успехи применения данной технологии были достигнуты при размножении масличной пальмы методами культуры ткани *in vitro*. Гвинейская масличная пальма является вторым после сои источником получения масла. Специфика эксплуатации масличной пальмы такова, что эффективное ее применение возможно в течение 25–30 лет; после этого периода плантации приходится обновлять. Для этого требуются миллионы молодых проростков. Усовершенствование и размножение растений методом скрещивания сопряжено с огромными затратами труда и времени. В связи с тем, что масличная пальма не образует побегов и боковых ветвей в природных условиях, пришлось обратиться к культуре ткани *in vitro*. В ходе исследований от культивирования меристемы отказались; каллус получали из частей молодых листьев с верхушки дерева. Далее культивировали каллусы до получения целого растения. Каллусы формировались в течение трех месяцев, при переносе во вторую и третью культуры из них формировались «эмбриониды», аналогичные эмбрионам, получаемым при половом процессе. Эмбрионы быстро размножаются в четвертой культуре, в течение месяца их количество может утроиться. В течение одного года из 10 эмбрионов можно получить до 500 000 растений. В пятой культуре эмбрионы развиваются в молодые проростки с листочками; а в шестой – седьмой – происходит образование корней. Полный цикл развития растений от «эмбрионидной» стадии до проростка с высотой надземной части около 12 см происходит в течение трех месяцев. Этот метод на островах Новой Гвинеи в полупромышленных масштабах применяют с начала девяностых годов. В настоящее время проводятся испытания клонированного материала в полевых условиях. Благодаря применению техники клонирования страны Западной Африки смогут интенсифицировать процесс создания новых пальмовых плантаций, что позволит увеличить объемы производства масла и со временем устранить имеющийся дефицит жиров.

Техника слияния протопластов: гаплоидные растения

Гибридные формы высших растений можно получать с использованием приема клеточной инженерии, на основе парасексуальной гибридизации в результате слияния протопластов. Техника слияния протопластов позволит генетикам расширить разнообразие гибридных растений. Это перспективная техника гибридизации не зависит от обычного полового размножения, посредством которого с достаточно большим трудом удалось получить гибриды пшеницы и ржи (тритикале), репы и капусты (рафанобрасика).

Метод заключается в том, что в качестве родительских используют не половые клетки (гаметы), а клетки тела (сомы) растения. Изолированные протопласты, выделенные из родительских организмов, в определенных условиях сливаются. Из полученных гибридных клеток в дальнейшем развиваются целые растения – гибриды. Применение этой технологии стало возможным в результате разработки двух новых экспериментальных методов – метода культуры клеток и тканей и метода изолированных протопластов. Метод изолированных протопластов позволяет с помощью ферментативного гидролиза разрушать клеточные стенки и получать растительные клетки, лишенные клеточной оболочки, покрытые только плазмолеммой. Протопласты могут сливаться друг с другом с образованием единого целого, способного регенерировать в целое гибридное растение, с помощью полиэтиленгликоля или под воздействием электрического поля (рис. 6.6).

Применение протопластов для генетических экспериментов стало возможным после того, как было обнаружено, что эффективным индуктором их слияния является полиэтиленгликоль (ПЭГ). Поверхности растительных клеток и протопластов окружены водным слоем и имеют отрицательный заряд. Эти обстоятельства препятствуют слиянию. Действие ПЭГ, видимо, заключается в снижении поверхностных зарядов и отнятии воды. После обработки клеток ПЭГ создаются условия для контакта клеточных мембран. В местах контакта происходит разрыв мембран, и содержимое двух протопластов объединяется. Образующиеся гибридные структуры сохраняют способность к восстановлению клеточной стенки, в результате появляются гибридные клетки. Универсальность и простота метода делают его доступным для селекции промышленно важных продуцентов. Генетическая рекомбинация в сочетании с индуцированным мутагенезом создает огромное разнообразие форм, увеличивая материал для отбора. Техника дает возможность для получения межвидовых и межродовых гибридов и открывает пути для скрещивания филогенетически отдаленных форм.

Первое сообщение о гибридизации растений табака путем слияния соматических клеток появилось в 1972 г. С тех пор появились сотни успешных работ по парасексуальной гибридизации. Среди полученных форм – внутривидовые, межвидовые, межродовые, межтрибные и межсемейст-

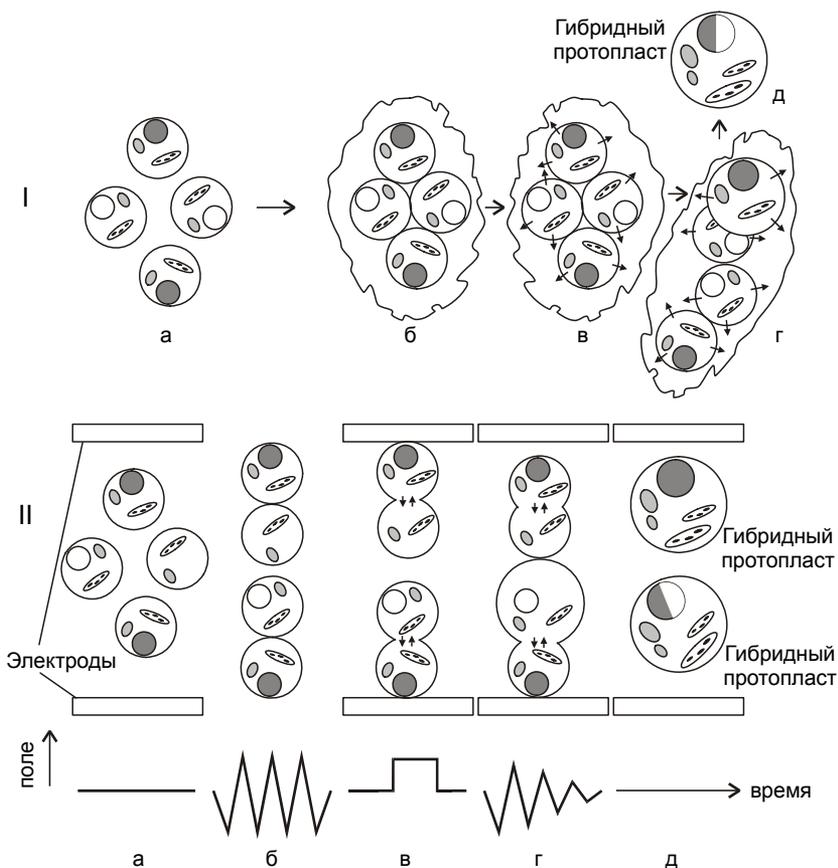


Рис. 6.6. Схема и этапы слияния протопластов растений под действием полиэтиленгликоля (I) и электрического поля (II) (по Х. Борман, 1991).

венные гибриды. Методика наиболее отработана применительно к видам семейства пасленовых. Получены парасексуальные гибридные растения в родах *Nicotiana* (в том числе табака), *Solanum* (картофель), *Lycopersicum* (томат); крестоцветных, зонтичных. Получены плодовые, фенотипически нормальные межвидовые гибриды табака, картофеля, капусты с турнепсом. Имеются стерильные межвидовые гибриды картофеля и томатов (поматы), табака и картофеля, табака и беладонны, образующие нормальные стебли и корни. Удаётся получать растения, гетерозиготные по внеядерным генам; гибриды, в которых от одного родителя получено ядро, а от другого – цитоплазма.

В настоящее время исследования и уровень данной технологии достигли такого состояния, при котором становится возможным практическое применение метода для улучшения ряда культурных видов растений.

Основными направлениями работ по соматической гибридизации высших растений являются: гибридизация клеток как средство расширения рамок скрещивания; слияние клеток и перенос или реконструкция генов цитоплазмы; слияние клеток с целью переноса отдельных небольших фрагментов генома. При гибридизации соматических клеток возможно получение асимметричных гибридов, что может способствовать получению более устойчивых и функционально совершенных растений.

Генетическая инженерия растений

Исследования в области генетической инженерии растений только начинаются. При использовании новейших генетических методов применительно к высшим растениям возникают не только технические трудности; процедура также осложняется необходимостью решать дополнительные проблемы, связанные с нарушением структуры генома культивируемых растительных клеток (изменение ploидности, хромосомные перестройки). Имеются определенные успехи в разработке систем клонирования некоторых важных сельскохозяйственных культур по схеме «протопласт – суспензионная культура – каллус – целое растение». Интенсивно исследуются структура и функции плазмидных ДНК растений и возможности их использования в качестве векторов.

Проблема создания векторов для введения чужеродной ДНК в протопласты растений является наиболее сложной. Здесь наметились следующие подходы: 1) использование плазмид бактерий, заражающих растения в естественных условиях; при этом часть плазмиды встраивается в ядерный геном растения-хозяина и функционирует в составе его генома; 2) использование бактериальных плазмид, «сшитых» с фрагментами ДНК хлоропластов или митохондрий растений, для создания челночных векторов, способных к репликации в клетках прокариот и экспрессии в эукариотических клетках; 3) использование ДНК-содержащих вирусов растений; в такой системе ДНК функционирует автономно от генома растения-хозяина.

Для защиты чужеродного генетического материала, вводимого в протопласты растений, от разрушающего действия нуклеаз также разрабатываются новые методы. Применяются ингибирование нуклеаз и создание механической защиты рекомбинантных ДНК. Для такой защиты используют липосомы. С помощью липосом в клетки или протопласты эукариот введены крупная РНК вируса табачной мозаики (размером около $2 \cdot 10^6$), еще более крупные ДНК вируса ОВ40 и Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*. надежная защита липосомами нуклеиновых кислот особенно важна при манипуляции с протопластами растений. Примером реализованного генноинженерного проекта является синтез фазеолина (запасного белка фасоли) в регенерированных растениях табака. Трансплантация гена, кодирующего синтез фазеолина, проведена с использованием в качестве вектора Ti-плазмиды. С помощью этой плазмиды в растения табака внедрен ген устойчивости в неомизину. С помощью CMV-вируса в расте-

ния репы транспортирован ген устойчивости к ингибитору дигидрофолат-редуктазы метотрексату.

Важная проблема генетической инженерии растений – тканевая специфичность трансплантируемого гена. Содержание фазеолина у модифицированного растения табака было одинаковым во всех частях растения при его низком выходе (около 1 % от общего белка табака). У самой же фасоли данный белок накапливается только в семенах, где его концентрация составляет около 50 %. Сравнительно недавно удалось выделить и ввести в состав встраиваемого вектора регуляторные последовательности. Это позволило поставить введенный в растение табака ген под контроль промотора, функционирующего только в прорастающих семенах. Ген малой субъединицы рибулозодифосфаткарбоксилазы гороха, перенесенный в табак и петунию, удалось ввести в состав оперона, работающего под действием света лишь в тканях листа. Генноинженерные манипуляции с растениями породили некоторые опасения, аналогичные тем, которые возникли при начале генетических манипуляций с микроорганизмами. Опасения связаны с возможностью выхода генетических векторов и трансгенных растений из-под контроля биотехнологов. В этой связи высказываются опасения превращения генноинженерных растений в сорняки. Однако комплекс «сорняковости» (комплекс признаков, обеспечивающих быстрое распространение в ущерб культурным растениям, устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов, эффективные механизмы рассеивания семян и пр.) едва ли может сформироваться в результате трансплантации одного или немногих генов. Однако устойчивость к гербицидам, кодируемая одним геном, может вызвать существенные проблемы в практике севооборотов. Так, устойчивое к определенному препарату растение, культивируемое на определенной площади, на следующий год при смене на этом поле культуры будет выступать по отношению к ней как сорняк, устойчивый к данному гербициду. Биохимические изменения растений в результате генноинженерных перестроек могут привести к утрате способности синтеза биологически полезных соединений и приобретению токсичности. Однако данная проблема существует и при традиционных методах селекции. Это предусматривает необходимость тщательного тестирования всех генноинженерных растений перед их переносом в полевые условия.

Основные пути развития генетики высших растений включают несколько направлений: 1) придание растениям способности синтезировать дополнительные ценные продукты (зеин, секалин, альбумин и др.) с помощью трансплантируемых генов; 2) повышение фотосинтетической эффективности растений в результате клонирования генов рибулозодифосфаткарбоксилазы, хлорофилл а/в-связывающих белков; 3) придание растениям diaзотрофности; 4) придание устойчивости к неблагоприятным факторам среды (засухе, засоленности почв, заморозкам, гербицидам и пр.).

Глава 7. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

С момента своего зарождения человеческое общество в процессе хозяйственной деятельности нарушало равновесие в природе: уничтожало крупных животных, выжигало леса для охоты, пастбищ, земледелия, а также загрязняло почвы и водоемы в местах поселения и пр. Поэтому перед ним всегда стояла проблема окружающей среды. В результате промышленной, сельскохозяйственной и бытовой деятельности человека возникают различные изменения состояния и свойств окружающей среды, в том числе очень неблагоприятные. С развитием и интенсификацией промышленной и сельскохозяйственной деятельности в XX веке стали ощущаться пределы естественной продуктивности биосферы, – истощаются природные ресурсы, источники энергии, все более ощущается дефицит пищи, чистой воды и воздуха. Загрязнение окружающей среды во многих регионах достигло критического предела. Во многом все эти проблемы порождены научно-техническим прогрессом общества и должны решаться также с использованием новейших достижений.

Проблему экологии нельзя решать в масштабах одной страны или группы стран. Вредные антропогенные загрязнения, вырабатываемые в индустриально развитых регионах и странах, в результате естественной циркуляции водных и воздушных масс распространяются по всей территории Земли, вплоть до обоих полюсов, проникают в глубины океанов, достигают стратосферы. Глобальность данной проблемы еще в 1899 г. подчеркивал К. А. Тимирязев. Опровергая мнение крупных ученых Англии, предрекающих близкую гибель человечества от голода и удушья, он писал: «В первый раз человечество столкнется с бедствием всеобщим. Перед ним будут все равны, и мысль о всеобщей солидарности людей не будет уже пустым звуком... и тогда, конечно, найдутся меры борьбы со злом и средства его предупреждения».

Важнейшая роль в вопросах защиты и охраны окружающей среды принадлежит биологии. Сама экология в традиционном понимании является биологической дисциплиной и изучает взаимоотношения организмов, включая человека, между собой и окружающей средой. Дальнейшее развитие биологии и внедрение ее достижений в практику – один из главных путей выхода из надвигающегося экологического кризиса. Большую роль играет при этом биотехнология. Биотехнология позволяет решать ряд экологических проблем, включая защиту окружающей среды от промышленных, сельскохозяйственных и бытовых отходов, деградацию токсикантов, попавших в среду, а также сама создает малоотходные промышленные процессы получения пищевых и лекарственных веществ, кормов, минерального сырья, энергии. Масштабы биологических процессов для решения природоохранных задач могут быть, по выражению Д. Беста, «оше-

ломляющими». Экология и биотехнология взаимодействуют как через продукты, так и через технологии. В целом это способствует экологизации антропогенной деятельности и возникновению более гармоничных отношений между обществом и природой.

7.1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЧИСТКИ СТОКОВ

Использование и получение огромного количества продуктов в различных сферах человеческой деятельности сопровождается образованием сточных вод, загрязненных разнообразными органическими и неорганическими, в том числе токсичными, соединениями. Физико-химические показатели состава сточных вод определяются профилем промышленного предприятия, вида перерабатываемого сырья, эколого-географическими условиями места размещения предприятия. Сбрасываемые в природные водоемы стоки существенным образом влияют на качество воды, нарушают биологическое равновесие в водоемах, тем самым затрудняют рациональное водопользование, а в отдельных случаях полностью выводят водоемы из строя. Сброс неочищенных сточных вод отрицательно сказывается на содержании в воде растворенного кислорода, ее pH, прозрачности и цветности и т.д. Все это отрицательно влияет на состояние компонентов водной экосистемы, снижает продуктивность и способность водоемов к самоочищению.

Существуют специальные «Правила охраны поверхностных вод от загрязнений сточными водами». Данные правила нормируют показатели загрязнения в водоеме после смешивания сточных вод с естественными водами. Важнейшими из них являются следующие показатели: количество растворенного в воде кислорода после смешивания – не менее 4 мг/л; содержание взвешенных частиц после спуска стоков не может возрасти более чем на 0.25–0.75 мг/л (для водоемов разной категории); минеральный осадок не более 1000 мг/л; вода не должна иметь запахов и привкусов, pH – в пределах 6.5–8.5; на поверхности не должно быть пленок, плавающих пятен; содержание ядовитых веществ – в пределах предельно допустимых концентрациях (ПДК) для людей и животных. Запрещается сбрасывать в водоемы радиоактивные вещества.

Органические вещества, попавшие в водоемы, окисляются до CO_2 и H_2O в пределах способности водоемов к самоочищению. Количество кислорода, расходуемое в этих процессах (БПК), определяется концентрацией и спектром присутствующих в воде примесей. Различают БПК₅ (пятидневный), БПК₂₀ (двадцатидневный) и БПК_{полн} (полный). БПК_{полн} обозначает время, в течение которого все вещества стоков окисляются в водоеме полностью до конечных продуктов. Сточные воды представляют сложные системы с комплексом веществ, их БПК составляет от 200 до 3000 мг O_2 /л. При сбросе в водоем таких сточных вод в неочищенном виде возможно полное расходование запасов кислорода. Поэтому перед сбросом сточных вод в природные

водоемы их необходимо очищать до такой степени, при которой после сброса БПК остается в пределах санитарных норм.

Очистка сточных вод – это система методов, вызывающих разрушение или удаление из них присутствующих веществ, а также патогенных микроорганизмов. В процессах естественного самоочищения водоемов в большинстве случаев поступающие со стоками вещества подвергаются разрушению. В ходе этого процесса структура, свойства и концентрации веществ изменяются во времени и пространстве. В результате вода приобретает исходные свойства. Таким образом, водоемы в определенных пределах играют роль природного очистного сооружения.

Схема проведения очистки сточных вод зависит от многих факторов. Она должна предусматривать максимальное использование очищенных сточных вод в системах повторного и оборотного водоснабжения предприятий и минимальный сброс сточных вод в естественные водоемы. Для очистки стоков применяют несколько типов сооружений: локальные (цеховые), общие (заводские) и районные (городские). Локальные очистные сооружения предназначены для очистки стоков непосредственно после технологических процессов. На локальных очистных сооружениях очищают воды перед направлением их в систему оборотного водоснабжения или в общерайонные очистные сооружения. На таких установках обычно применяют физико-химические методы очистки (отстаивание, ректификацию, экстракцию, адсорбцию, ионный обмен, огневой метод).

Общие очистные сооружения включают несколько ступеней очистки: первичную (механическую), вторичную (биологическую), третичную (доочистку). Районные или общегородские сооружения очищают в основном бытовые стоки методами механической и биологической очистки.

Биологический метод очистки основан на способности микроорганизмов использовать в качестве ростовых субстратов различные соединения, входящие в состав сточных вод. Достоинства данного метода заключаются в возможности удаления из стоков широкого спектра органических и неорганических веществ, простоте аппаратного оформления и протекания процесса, относительно невысоких эксплуатационных расходах. Однако для успешной реализации метода необходимы большие капитальные вложения для строительства очистных сооружений. В ходе процесса очистки необходимо строго соблюдать технологий режим очистки и учитывать чувствительность микроорганизмов к высоким концентрациям загрязнителей. Поэтому перед биоочисткой стоки необходимо разбавлять.

Для биологической очистки сточных вод применяют два типа процессов: аэробные, в которых микроорганизмы используют для окисления веществ кислород, и анаэробные, при которых микроорганизмы не имеют доступа ни к свободному растворенному кислороду, ни к предпочтительным акцепторам электронов типа нитрат-ионов. В этих процессах в качестве акцептора электронов микроорганизмы могут использовать углерод

органических веществ. При выборе между аэробными и анаэробными процессами предпочтение обычно отдают первым. Аэробные системы более надежны, стабильно функционируют; они также больше изучены. Анаэробные процессы, существенно уступающие аэробным в скорости протекания процесса очистки, имеют ряд преимуществ: 1) масса, образующего в них активного ила практически на порядок ниже (0.1–0.2) по сравнению с аэробными процессами (1.0–1.5 кг/кг удаленного БПК); 2) в них существенно ниже энергозатраты на перемешивание; 3) дополнительно образуется энергоноситель в виде биогаза. Вместе с тем, анаэробные процессы очистки мало изучены, в силу низких скоростей протекания для них требуются дорогостоящие очистные сооружения больших объемов.

Аэробные процессы очистки сточных вод

В аэробных процессах очистки часть окисляемых микроорганизмами органических веществ используется в процессах биосинтеза, другая – превращается в безвредные продукты – H_2O , CO_2 , NO_2 и пр. Принцип действия аэробных систем биоочистки базируется на методах проточного культивирования. Процесс удаления органических примесей складывается из нескольких стадий: массопередачи органических веществ и кислорода из жидкости к клеточной поверхности, диффузии веществ и кислорода внутрь клеток через мембрану и метаболизма, в ходе которого происходит прирост микробной биомассы с выделением энергии и углекислоты. Интенсивность и глубина биологической очистки определяется скоростью размножения микроорганизмов. Когда в очищаемых сточных водах практически не остается органических веществ, наступает второй этап очистки – нитрификация. В ходе этого процесса азотсодержащие вещества стоков окисляются до нитритов и далее – до нитратов. Таким образом, аэробная биологическая очистка складывается из двух этапов: минерализации – окисления углеродсодержащей органики, и нитрификации. Появление в очищаемых стоках нитратов и нитритов свидетельствует о глубокой степени очистки. Большинство биогенных элементов, необходимых для развития микроорганизмов (углерод, кислород, сера, микроэлементы), содержится в сточных водах. При дефиците отдельных элементов (азота, калия, фосфора) их в виде солей добавляют в очищаемые стоки.

В процессах биологической очистки принимает участие сложная биологическая ассоциация, состоящая не только из бактерий, но также включающая одноклеточные организмы – водные грибы, простейшие организмы (амебы, жгутиковые и ресничные инфузории), микроскопические животные (коловратки, круглые черви – нематоды, водные клещи) и др. Эта биологическая ассоциация в процессе биологической очистки формируется в виде активного ила или биопленки. Активный ил представляет собой буро-желтые хлопья размером 3–150 мкм, взвешенные в воде, и образован колониями микроорганизмов, в том числе бактериями. Последние образуют слизистые капсулы – зооглеи. Биопленка – это слизистое обрастание

материала фильтрующего слоя очистных сооружений живыми микроорганизмами, толщиной 1–3 мм.

Биологическая очистка стоков проводится в различных по конструкции сооружениях – биофильтрах и аэротенках.

Капельный биофильтр – наиболее распространенный тип биореактора с неподвижной биопленкой, применяемый для очистки стоков. По существу, это реактор с неподвижным слоем и противотоком воздуха и жидкости. Биомасса растет на поверхности насадки в виде пленки. Особенностью насадки или фильтрующего слоя является высокая удельная поверхность для развития микроорганизмов и большая пористость. Последнее придает необходимые газодинамические свойства слою и способствует прохождению воздуха и жидкости через него.

Биофильтры представляют собой прямоугольные или круглые сооружения со сплошными стенками и двойным дном: верхним в виде колосниковой решетки и нижним, – сплошным (рис. 7.1). Дренажное дно биофильтра состоит из железобетонных плит с площадью отверстий не менее 5–7 % от общей площади поверхности фильтра. Фильтрующим материалом обычно служит щебень, галька горных пород, керамзит, шлак. Нижний поддерживающий слой во всех типах биофильтров должен содержать более крупные частицы фильтрующего материала (размером 60–100 мм). Щебеночные биофильтры имеют высоту слоя 1.5 – 2.5 м и могут быть круглыми с диаметром до 40 м или прямоугольными размером 75×4 м². Входной поток предварительно отстаиваемых сточных вод с помощью водораспределительного устройства периодически равномерно орошает поверхность биофильтра. В ходе просачивания сточных вод через материал фильтрующего слоя происходит ряд последовательных процессов: 1) контакт с биопленкой, развивающейся на поверхности частиц фильтрующего

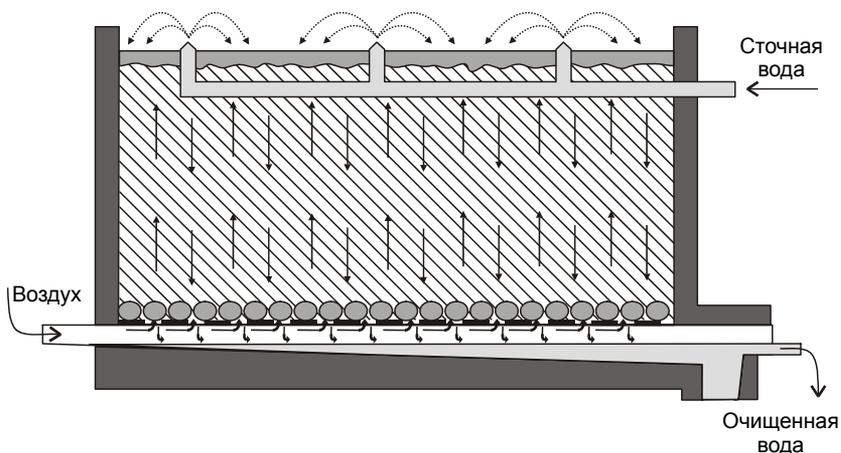


Рис. 7.1. Схема биофильтра (по М. С. Мосичеву и др., 1982).

материала; 2) сорбция органических веществ поверхностью микробных клеток; 3) окисление веществ стоков в процессах микробного метаболизма. Через нижнюю часть биофильтра противотоком жидкости продувается воздух. Во время паузы между циклами орошения сорбирующая способность биопленки восстанавливается. Биопленка, формирующаяся на поверхности фильтрующего слоя биофильтра, представляет собой сложную экологическую систему (рис. 7.2).

Бактерии и грибы образуют нижний трофический уровень. Вместе с микроорганизмами – окислителями углерода они развиваются в верхней части биофильтра. Нитрификаторы находятся в нижней зоне фильтрующего слоя, где процессы конкуренции за питательный субстрат и кислород менее выражены. Простейшие, коловратки и нематоды, питающиеся бактериальной компонентой экосистемы биопленки, служат пищей высшим видам (личинкам насекомых).

В биофильтре происходит непрерывный прирост и отмирание биопленки. Отмершая биопленка смывается током очищаемой воды и выносятся из биофильтра. Очищенная вода поступает в отстойник, в котором освобождается от частиц биопленки, и далее сбрасывается в водоем.

Процесс окисления органических веществ сопровождается выделением тепла, поэтому биофильтры обогреваются за счет собственного тепла. Крупные установки, снабженные слоем теплоизоляционного материала, способны функционировать при отрицательных внешних температурах. Однако, температура внутри фильтрующего слоя должна быть не ниже 6°. Основной режим работы щебеночных биофильтров – однократное прохождение стоков. При этом нагрузка по органическому веществу на фильтр составляет 0.06–0.12 кг БПК/м³ в сутки. Для повышения нагрузки без увеличения площади биофильтра применяют режим очистки с рециркуляцией стоков или режим двойного фильтрования.



Рис. 7.2. Трофическая пирамида в биопленке капельного биофильтра (по К. Форстеру и Д. Вейзу, 1990).

Коэффициент рециркуляции для сточных вод, загрязненных трудно окисляемой органикой, может составлять 1:1 – 1:2. Нагрузка по органическому веществу при этом может достигать 0.09–0.15 кг БПК/ м³ в сутки. Переменное двойное фильтрование заключается в использовании двух направлений фильтрования и двух вторичных отстойников. Последовательность потоков меняется с интервалом в 1–2 недели. Это вызывает быстрый рост биопленки и позволяет увеличить нагрузку до 0.15–0.26 кг БПК/м³ в сутки.

На смену минеральным материалам в биофильтрах с начала 80-х годов пришли пластмассы, обеспечивающие при высоких значениях удельной поверхности фильтрующего слоя большую пористость и лучшие гидродинамические свойства слоя (табл. 7.1). Это позволило строить высокие, не занимающие много места биореакторы, и очищать промышленные стоки с высокой концентрацией загрязняющих веществ. Удельная поверхность пластмассовых насадок, используемых для быстрого фильтрования, выше, чем у щебеночных биофильтров.

Щебеночные биофильтры, имея более низкую объемную плотность, могут достигать высоты до 8–10 м. Этот тип биореактора при быстром режиме фильтрации стоков обеспечивает степень удаления 50–60 % БПК. Для более высокой степени очистки применяют каскад биофильтров.

В 1973 г. в Великобритании был создан вращающийся биологический реактор, представляющий собой вращающиеся диски – «соты» из пластиковых полос, попеременно погружаемые в сточные воды и поднимаемые на поверхность. При этом площадь поверхности контакта с биослоем существенно возрастает и улучшается аэрация.

Более совершенным типом биореактора с неподвижной биопленкой является реактор с псевдооживленным слоем, характеризующийся наличием носителя, покрытого микробной пленкой, достаточного для создания псевдооживленного слоя восходящего потока жидкости. Реактор имеет систему подачи кислорода и устройство, обеспечивающее практически

Таблица 7.1.

**Свойства насадок, используемых в капельных биофильтрах
(по К. Форстеру и Д. Вейзу, 1990)**

Тип насадки	Удельная поверхность, м ² /м ³	Пористость, %
Минеральная:		
Шлак	50–120	50
Гранит	24–110	–
Гравий	86–101	–
Полимерная:		
Непластифицированный поливинилхлорид	240	95
Полипропилен	124	98

горизонтальное распределение потока жидкости в слое носителя. В качестве носителя в таких биореакторах может быть использован песок, через который пропускается кислород (система «Окситрон»). Применяют также волокнистые пористые подушечки с системой подачи кислорода в самом аппарате (установка «Кептор»).

Эксплуатация биофильтров – достаточно несложный процесс. Важным условием для эффективной работы биофильтров является тщательная предварительная очистка стоков от взвешенных частиц, способных засорить распределительное устройство. Неблагоприятным моментом в эксплуатации биофильтров является вероятность заливания, размножение мух на поверхности, дурной запах, как вследствие избыточного образования микробной биомассы.

В настоящее время около 70 % очистных сооружений Европы и Америки представляют собой капельные биофильтры. Срок службы таких биореакторов исчисляется десятками лет (до 50). Основной недостаток конструкции – избыточный рост микробной биомассы. Это приводит к засорению биофильтра и вызывает сбой в системе очистки. Предложенная недавно модификация представляет собой установку с чередующимся недавним фильтрованием. Система рециркуляции позволяет исключить негативные моменты, характерные для биофильтров.

Аэротенк относится к гомогенным биореакторам. Типовая конструкция биореактора представляет собой железобетонный герметичный сосуд прямоугольного сечения, связанный с отстойником. Аэротенк разделяется продольными перегородками на несколько коридоров, обычно 3–4. Конструкционные отличия различных типов аэротенков связаны, в основном, с конфигурацией биореактора, методом подачи кислорода, величиной нагрузки. Типовые схемы аэротенков представлены на рис. 7.3. Процесс биоочистки в аэротенке состоит из двух этапов. Первый этап заключается во взаимодействии отстоявшихся сточных вод, содержащих около 150–200 мг/л взвешенных частиц и до 200–300 мг/л органических веществ, с воздухом и частицами активного ила в аэротенке в течение некоторого времени (от 4 до 24 ч. и выше в зависимости от типа стоков, требований к глубине очистки и пр.). На втором – происходит разделение вод и частиц активного ила во вторичном отстойнике. Биохимическое окисление органических веществ стоков в аэротенке на первом этапе реализуется в две стадии: на первой микроорганизмы активного ила адсорбируют загрязняющие вещества стоков, на второй – окисляют их и восстанавливают свою окислительную способность.

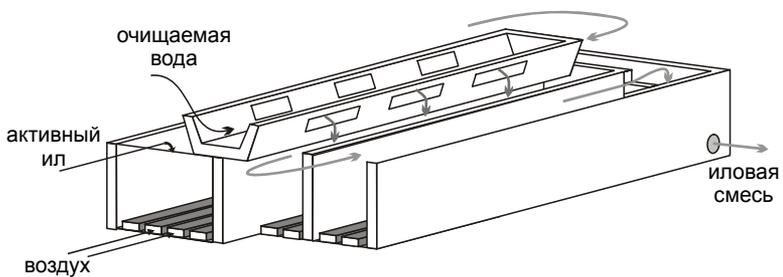
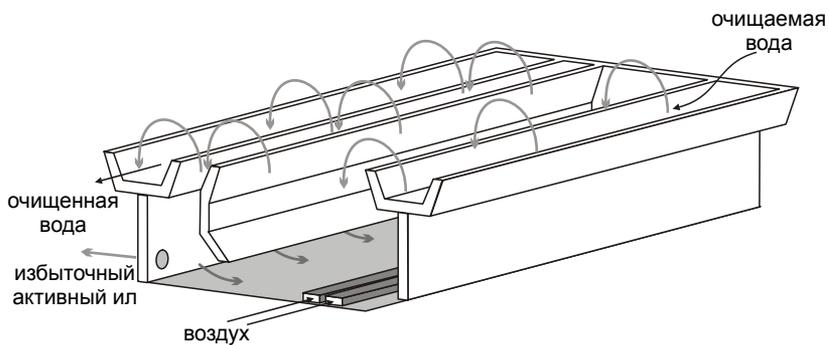
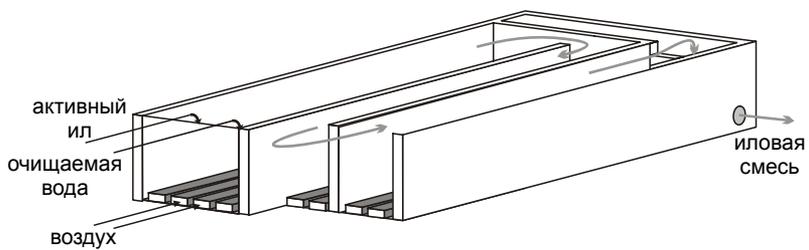
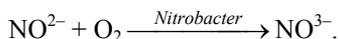
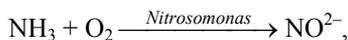


Рис.7.3. Схемы аэротенков.

Сверху вниз: аэротенк вытеснения, аэротенк смешения, аэротенк с рассредоточенной подачей сточной воды и регенерацией активного ила (по Дж. Бесту и др., 1988).

Подача воздуха в «коридоры» аэротенка осуществляется через пористые железобетонные плиты или через систему пористых керамических труб. Обычно воздухораспределительное устройство располагают не по центру, а около одной из стен коридора. В результате этого в аэротенке происходит турбулизация потока, и сточные воды не только продвигаются вдоль коридора, но и закручиваются по спирали внутри него. Это улучшает режим аэрации и условия очистки. Процесс очистки в аэротенке представляет собой непрерывную ферментацию.

Частицы активного ила, образованные бактериями и простейшими, являются флокулирующей смесью. По сравнению с биопленкой, функционирующей в биофильтрах, активный ил аэротенков представляет собой меньшее экологическое разнообразие видов. Основными группами бактериальной компоненты активного ила являются окисляющие углерод флокулирующие бактерии, окисляющие углерод нитчатые бактерии и бактерии-нитрификаторы. Первая группа бактерий не только принимает участие в деградации органических компонентов стоков, но и формирует стабильные флокулы, быстро осаждающиеся в отстойнике с образованием плотного ила. Нитрификаторы (*Nitrosomonas* и *Nitrobacter*) превращают восстановленные формы азота в окисленные:



Нитчатые бактерии, с одной стороны, образуют скелет, вокруг которого образуются флокулы; с другой, – стимулируют неблагоприятные процессы (образование пены и плохое осаждение). Простейшие потребляют бактерии и снижают мутность стоков, наибольшее значение среди них имеют инфузории (*Vorticella*, *Opercularia*).

Активный ил является совокупностью микроорганизмов и простейших, обладающих набором ферментов для удаления загрязнений из стоков. Активный ил имеет также поверхность с сильной адсорбционной способностью. Концентрация активного ила в аэротенке обычно составляет 1.5–5.0 г/л. Эта величина зависит от уровня загрязнений стоков, от возраста ила и его продуктивности. Возраст ила вычисляют по уравнению:

$$T = MV / (m_y + Gc_{\text{вых}}),$$

где: M – взвешенные частицы иловой смеси, кг/м³; V – объем аэротенка, м³; m_y – количество удаляемого ила, кг/сут.; G – расход воды, м³/сут.; $c_{\text{вых}}$ – концентрация ила в выходном стоке, кг/м³.

Например, для достижения нитрификации с участием медленно растущих нитрификаторов используют ил большого возраста (12 суток), а для окисления органики – возраст ила существенно ниже.

Рабочая концентрация растворенного кислорода вычисляется на основе расчетной потребности установки. Для полной нитрификации состав-

ляет не менее 2 мг/л; для окисления углерода и денитрификации – менее 1 мг/л. На практике в зависимости от типа аэрации применяют несколько типов режимов очистки стоков: быструю, стандартную и продленную. Быстрые процессы применяют при частичной очистке стоков. Наиболее распространенным типом очистки является процесс, средний между стандартной и быстрой аэрацией. Степень аэрации определяет допустимую нагрузку по органическому веществу во входных стоках и качество очистки (табл. 7.2).

Следующим важным параметром для расчета процесса биоочистки в гомотенных проточных биореакторах является режим перемешивания. Известны системы полного смешения и идеального вытеснения. Первый тип обеспечивает мгновенное разбавление входного потока в аэротенке. Это защищает микрофлору активного ила от ингибирующего воздействия загрязнителей стоков. Активный ил в такой системе, однако, имеет худшую способность к оседанию в отличие от систем идеального вытеснения. В последних активный ил поступает в первый коридор, где в ходе аэрации восстанавливает свою окислительную способность. Сточные воды поступают во второй коридор вместе с регенерированным активным илом. Концентрация загрязняющих веществ снижается постепенно, по мере прохождения стоков по системе коридоров аэротенка. В таких системах концентрация загрязняющих веществ во входном потоке не должна превышать предельно допустимую для биологических компонентов, образующих активный ил.

Опыт эксплуатации различных типов аэротенков показывает, что содержание органических веществ в стоках, подаваемых на очистку, не должно превышать 1000 мг/л. Оптимальная величина рН обычно лежит в диапазоне 6.5–8.5.

Количество биогенных элементов в очищаемых стоках корректируется добавками необходимых солей. Так, при БПК около 0.5 кг O_2/m^3 содержание усвояемого азота в стоках должно быть не ниже 10, фосфатов – 3 мг/л. Лучшие результаты очистки вод в аэротенках получают при величине входного БПК до 0.2 кг O_2 /m^3 . Если уровень аэрации при таком БПК составляет до 5

Таблица 7 2

Зависимость качества входного потока от типа аэрации (по К. Форстеру, 1990).

Тип аэрации	Нагрузка по органическому веществу на ил, кг/кг-сут.	Качество выходного потока
Продленная	0.05–0.02	Высокое: БПК < 10 мг/л, полная нитрификация, аммонийный азот < 5 мг/л.
Стандартная	0.20–0.45	Различное: от полной нитрификации до ее отсутствия.
Быстрая	0.50–5.00	Высокая скорость удаления БПК на единицу массы ила; качество может быть выше в 20–30 раз при достаточном уровне аэрации.

$\text{м}^3/\text{м}^2 \cdot \text{ч}$, БПК очищенной воды может упасть до $0.015 \text{ кг O}_2/\text{м}^3$.

Прирост биомассы активного ила в ходе очистки приводит к его «старению» и снижению биокаталитической активности. Поэтому большая часть активного ила после вторичного отстойника выводится из системы, и только часть ила возвращается в реактор. Аэротенки технологически связаны с вторичными отстойниками, в которых происходит осветление выходящих вод и отделение активного ила. Отстойники выполняют также функцию контактных резервуаров. В них сточную воду хлорируют. Дезинфицирующая доза хлора после биологической очистки в зависимости от качества очистки составляет $10\text{--}15 \text{ мг/л}$ при продолжительности контакта хлора с жидкостью не менее 30 минут.

Биологические (очистные) пруды используются в качестве самостоятельного очистного сооружения или конечного пункта очистки стоков, прошедших стадию биоочистки в биофильтре или аэротенке. Если очистные пруды функционируют как самостоятельные системы водоочистки, сточные воды перед поступлением в них разбавляются трех-, пятикратными объемами технической или хозяйственно-питьевой воды. Для отстоянных стоков без разбавления нагрузка на пруды составляет до $250 \text{ м}^3/\text{га} \cdot \text{сут.}$; для биологически очищенных вод – до $500 \text{ м}^3/\text{га} \cdot \text{сут.}$ Средняя глубина прудов составляет от 0.5 до 1.0 м . Срок «созревания» прудов в зонах умеренного климата – не менее одного месяца.

Методы аэробной биологической очистки сточных вод непрерывно совершенствуются. В последние годы стали внедряться более эффективные системы биоочистки. Это процессы в шахтных реакторах, процессы с использованием для аэрирования кислорода. Такие биореакторы называют окситенками. Концентрация растворенного кислорода в окситенках достигает $10\text{--}12 \text{ мг/л}$. Это в несколько раз превосходит уровень аэрации в аэротенках. В результате повышенной аэрации стоков концентрация активного ила в них возрастает до 15 г/л и их окислительная мощность в $4\text{--}5$ раз превосходит аэротенки. Шахтные биореакторы позволяют реализовать процесс очистки стоков аналогично протеканию его в окислительном канале, но расположенном вертикально. Такие реакторы занимают небольшие площади и большей частью заглублены в грунт. Высота шахтных аппаратов достигает $50\text{--}150 \text{ м}$ при диаметре $0.5\text{--}10.0 \text{ м}$. Внутри аппарата вмонтирован полый стержень или специальное устройство, обеспечивающее образование зон восходящего и нисходящего потоков для циркуляции потоков очищаемой воды. Направление циркуляции задается вдуванием воздуха в секцию с восходящим потоком на относительно небольшой глубине. Аппараты компактны, обеспечивают хороший массоперенос кислорода, (до $4.5 \text{ кг/м}^3 \text{ ч}$). При этом уровень нагрузки на ил может достигать $0.9 \text{ кг БПК/кг} \cdot \text{сут.}$ Основной проблемой, возникающей при эксплуатации окситенков, является проблема отделения твердых частиц от иловой смеси. Микропузырьки воздуха прилипают к твердым частицам и ухудшают

осаждение. Для улучшения осаждения применяют вакуумную дегазацию, флотацию, отдувку воздуха. После стадии дегазации иловая смесь направляется в аэротенк, где после удаления микропузырьков происходит доокисление оставшейся органики. Далее стоки поступают по обычной схеме в отстойник.

Анаэробные процессы очистки стоков

Анаэробные процессы очистки сточных вод не получили достаточно широкого развития в настоящее время. Эти процессы по сравнению с аэробными процессами очистки сточных вод имеют ряд несомненных преимуществ. Главными являются высокий уровень превращения углерода загрязняющих веществ при относительно небольших объемах прироста биомассы и получение дополнительного ценного продукта – биогаза.

Анаэробные процессы для очистки стоков применяются в Европе около 100 лет. Используемые для этих целей биореакторы – септиктенки, представляют собой отстойники, в которых осевший ил подвергается анаэробной деградации. Септиктенки эксплуатируются обычно при температуре 30–35°C. Время пребывания в них очищаемых стоков существенно выше – около 20 суток. При проектировании биореакторов такого типа одним из основных параметров является его вместимость в литрах (V), рассчитываемая с учетом количества обслуживаемого населения P :

$$V = 180 P + 2000.$$

Половина объема в 180 л на душу населения отводится для жидкости, половина служит для накопления ила. Объем тенка распределяется между двумя камерами, при этом первая занимает 2/3 объема и имеет наклонное днище для удержания ила (рис. 7.4). Ил периодически (примерно раз в год) удаляется, а небольшая его часть остается в биореакторе. Септиктенки применяют в системе городских очистных сооружений. В них перерабатывают осадки, удаляемые из первичных отстойников. При этом сброженный ил ликвидируют или закапывают. При сбраживании уменьшается объем ила, снижается содержание в нем патогенных микроорганизмов и

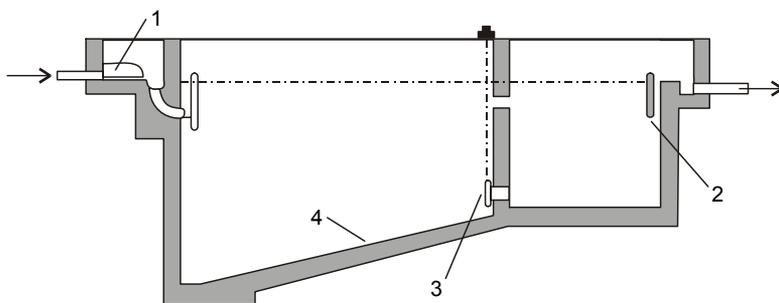


Рис. 7.4. Двухкамерный септиктенк (по К. Форстеру, 1990).
1 – регулятор, 2 – отражатель, 3 – напорный трубопровод, 4 – уклон 1:4.

дурной запах. Пути биодegradации загрязняющих веществ, протекающие в септиктенках на основе сложной микробной ассоциации, включают гидрoлитические процессы с участием ацидогенных, гетерoацетогенных бактерий и процесс метаногенерации с участием метаногенов. Анаэробные проточные сбраживатели такого типа применяют для анаэробной биоочистки промышленных и сельскохозяйственных стоков.

Особенно эффективно применение сравнительно недорогих анаэробных систем для сильно загрязненных стоков пищевой промышленности и отходов интенсивного животноводства. Данные стоки имеют высокие уровни нагрузки по БПК и ХПК (химическая потребность в кислороде), а навозные стоки – также высокое содержание нерастворимых компонентов, не поддающихся биодegradации. Для их очистки применяют сбраживатели полного смешения. Стоки свино- и птицекомплексов освобождаются в ходе анаэробной биоочистки только на 50 % ХПК, а стоки ферм крупного рогатого скота – на 30 %. Высокие концентрации органики и аммонийного азота (до 4000 мг/л) способны ингибировать процесс дegradации. Время удержания таких стоков в биореакторе объемом до 600–700 м³ удлинится до 15–20 суток при норме суточной загрузки 20–30 м³. Биогаз, образующийся при этом, содержит до 70 % метана. Биореактор сравнительно небольшого объема очищает стоки средних ферм с содержанием 1200–1500 голов свиней.

Для очистки загрязненных стоков пищевой промышленности применяют специально разработанные контактные анаэробные процессы (рис. 7.5).

В таких процессах в первичном танке, входящем в состав установки, поступающие стоки полностью перемешиваются за счет рециркуляции биогаза, ила или механического перемешивания. Помимо перемешивания, фактором интенсификации процесса является изменение температуры в биореакторе. Сброженные стоки направляются в осветлитель, где происходит процесс осаждения ила и дополнительное образование биогаза.

Уплотнившийся ил возвращают в сбраживатель, куда поступают новые порции стоков. Если величина концентрации биомассы в сбраживателе составляет 5–10 г/л, возможно достаточно эффективная очистка стоков с содержанием ХПК до 20 кг/м³. При увеличении концентрации биомассы до 20–30 г/л возможно использование неразбавленных стоков с ХПК до 80 кг/м³. Реакторы с неподвижной биопленкой (анаэробные биофильтры) также находят применение для анаэробной очистки стоков. Используемые для этих целей биореакторы в отличие от аэробных капельных биофильтров имеют более крупную насадку для избежания процесса заиливания. Применяемая для этих целей щебеночная насадка диаметром 25–65 мм имеет до 50 % свободного объема. Скорость очищаемого потока стоков обычно низка, и биомасса удерживается в свободном пространстве насадки. Предельная нагрузка по ХПК для таких систем составляет до 10 кг/м³·сут., с умеренным количеством органики она обычно близка к 5 кг/м³. Эффективность

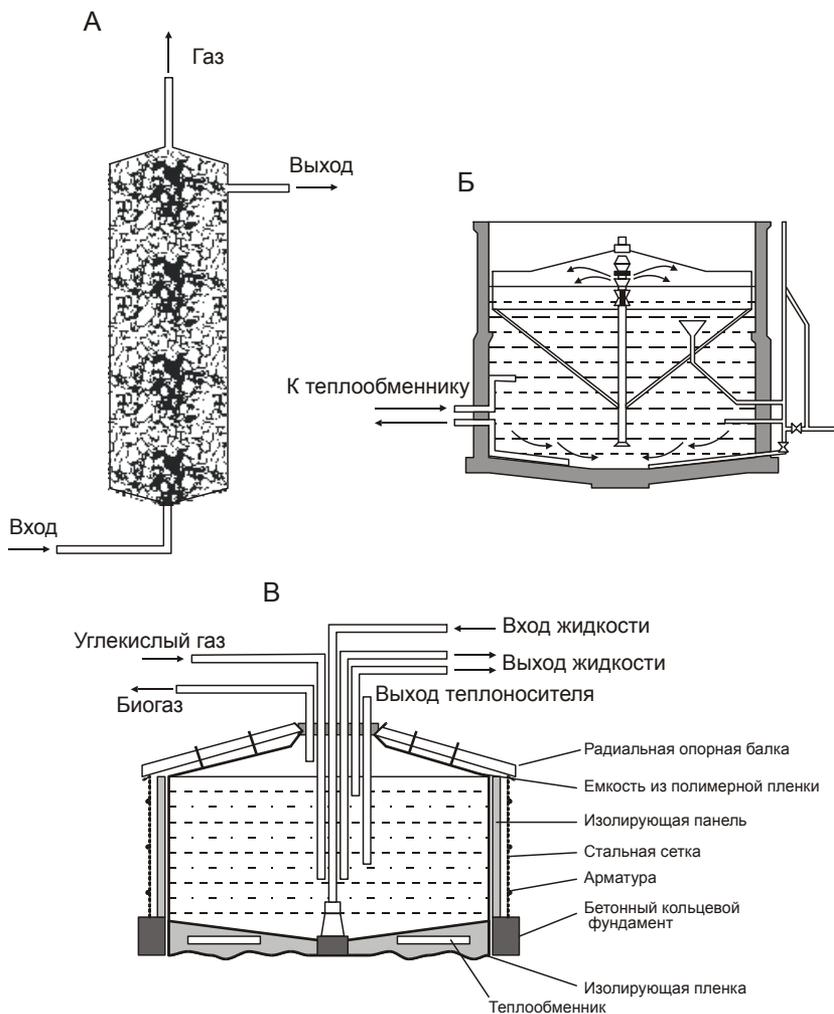


Рис. 7.5. Типы установок для очистки сточных вод пищевой промышленности.
 А – анаэробный биофильтр, Б – установка с винтовым насосом для перемешивания,
 В – высокоскоростной реактор Коулзерда (по Дж. Бесту и др., 1988).

очистки составляет около 70%. Эти сооружения, однако, не нашли пока широкого применения вследствие достаточно высокой стоимости насадки и необходимости периодической промывки материала фильтрующего слоя.

В целом анаэробные процессы очистки стоков, обладая рядом несомненных достоинств, не находят пока такого широкого применения, как аэробные системы биоочистки. Однако в последние годы, вследствие более строгих требований к предварительной очистке промышленных

стоков перед сбросом их в канализацию, интерес к анаэробным процессам возрастает.

7.2. УТИЛИЗАЦИЯ ТВЕРДЫХ ОТХОДОВ

В области переработки и ликвидации твердых отходов биотехнологические методы наиболее широко применяются для утилизации коммунальных отходов и ила из систем биоочистки стоков.

Традиционно твердые отходы складировались на городских свалках. Все возрастающие объемы отходов на душу населения приводят к возникновению огромного количества свалок, увеличению их площадей, а также к неуправляемому попаданию отходов в окружающую среду из-за рассыпания их при транспортировке. Так, по данным 1984 г. во Франции, Греции и Ирландии по ходу транспортировки отходов на свалки было рассыпано, соответственно, 10,3, 17,5 и 35 % от общего количества ликвидированных отходов. Несмотря на все возрастающий интерес к повторному использованию сырья, очевидно, что простая ликвидация отходов на свалках существенно дешевле любого другого способа их переработки. После того, как стало ясно, что при анаэробной переработке отходов в больших количествах образуется ценный энергетический носитель – биогаз, основные усилия стали направляться на соответствующую организацию свалок и получение на месте их переработки метана.

Несмотря на огромное разнообразие отходов, вывозимых на городские свалки, в целом состав твердых отходов в развитых странах становится все более однородным, при этом четко просматривается тенденция увеличения объема бумаги и пластмасс на фоне снижения доли органических и растительных материалов. Это удлиняет время стабилизации отходов на свалках. Исследования химического состава содержимого свалок показали, что фракция, поддающаяся биodeградации, составляет до 70 % от общего количества твердых отходов.

Поведение отходов на свалке носит чрезвычайно сложный характер, так как постоянно происходит наслаивание нового материала через различные временные промежутки. В результате этого процесс подвержен действию градиентов температуры, pH, потоков жидкости, ферментативной активности и пр. В общей массе материала свалок присутствует сложная ассоциация микроорганизмов, которые развиваются на поверхности твердых частиц, являющихся для них источником биогенных элементов. Внутри ассоциации складываются разнообразные взаимосвязи и взаимодействия. В целом состояние и биокаталитический потенциал микробного сообщества зависит от спектра химических веществ материала свалок, степени доступности этих веществ, наличия градиентов концентраций различных субстратов, в особенности градиентов концентраций доноров и акцепторов электронов и водорода.

На типичной европейской свалке, где отходы размещены по отсекам, система переработки отходов является, по существу, совокупностью реакторов периодического действия, в которых субстрат (отходы) находится на разных стадиях биodeградации.

На начальной стадии биodeградации твердых отходов доминируют аэробные процессы, в ходе которых под воздействием микроорганизмов (грибов, бактерий, актиномицетов) и также беспозвоночных (клещей, нематод и др.) окисляются наиболее деградируемые компоненты. Затем деструкции подвергаются трудно и медленно окисляемые субстраты – лигнин, лигноцеллюлозы, меланины, танины. Существуют различные методы оценки степени биodeградации твердых отходов. Наиболее информативным принято считать метод оценки, основанный на различиях в скоростях разложения целлюлозы и лигнина. В непереработанных отходах отношение содержания целлюлозы к лигнину составляет около 4.0; в активно перерабатываемых – 0.9–1.2 и в полностью стабилизированных отходах – 0.2. В течение аэробной стадии температура среды может повышаться до 80°C, что вызывает инактивацию и гибель патогенной микрофлоры, вирусов, личинок насекомых. Температура может служить показателем состояния свалки. Увеличение температуры повышает скорость протекания процессов деструкции органических веществ, но при этом снижается растворимость кислорода, что является лимитирующим фактором. Истощение молекулярного кислорода *in situ* приводит к снижению тепловыделения и накоплению углекислоты. Это, в свою очередь, стимулирует развитие в микробной ассоциации сначала факультативных, а затем облигатных анаэробов. При анаэробной минерализации в отличие от аэробного процесса участвуют разнообразные, взаимодействующие между собой микроорганизмы. При этом виды, способные использовать более окисленные акцепторы электронов, получают термодинамические и кинетические преимущества. Происходит последовательно процесс гидролиза полимеров типа полисахаридов, липидов, белков; образованные при этом мономеры далее расщепляются с образованием водорода, диоксида углерода, а также спиртов и органических кислот. Далее при участии метаногенов происходит процесс образования метана (рис.7.6).

В результате комплекса процессов, происходящих при биodeградации содержимого свалок, образуются два типа продуктов – фильтрующиеся в почву воды и газы. Фильтрующиеся воды, помимо микроорганизмов, содержат комплекс разнообразных веществ, включая аммонийный азот, летучие жирные кислоты, алифатические, ароматические и ациклические соединения, терпены, минеральные макро- и микроэлементы, металлы. Поэтому важным моментом при выборе и организации мест свалок является защита поверхности земли и грунтовых вод от загрязнений. Для борьбы с фильтрацией вод применяют малопроницаемые засыпки или создают непроницаемые оболочки вокруг свалки или специальные ограждения.

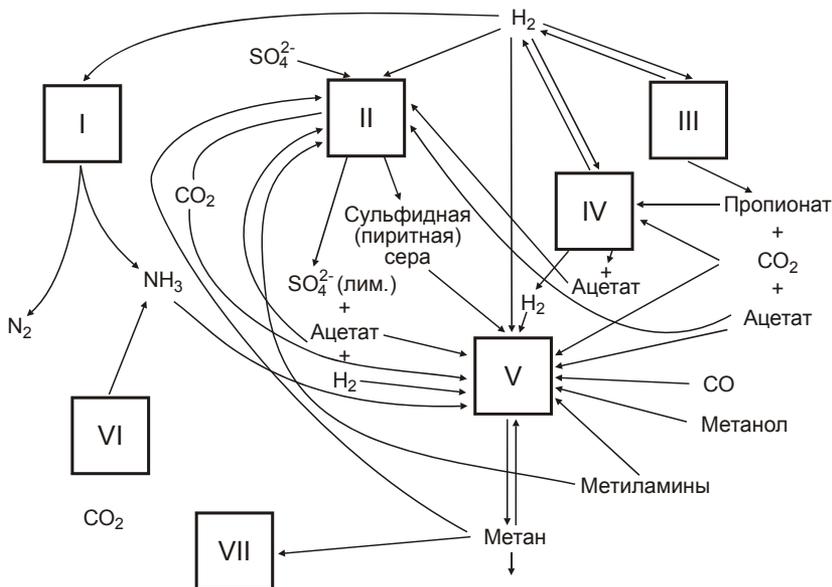


Рис. 7.6. Взаимодействие микроорганизмов в анаэробных условиях заключительной стадии катаболизма (по К. Форстеру и Е. Сениору, 1990).
 Бактерии, потребляющие: I – нитраты, II – сульфаты; бактерии, образующие: III – пропионат, IV – ацетат, V – метан; бактерии, катаболирующие: VI – аминокислоты, VII – метилированные металлоорганические комплексы.

Возможно, что наиболее эффективным способом может стать организация сбора фильтрующихся вод свалок и управляемая анаэробная переработка с применением капельных биофильтров, аэротенков или аэрационных прудов. В системе аэрационных прудов в течение нескольких месяцев можно удалить из вод до 70 % БПК; в капельных биофильтрах или системах с активным илом – до 92 % БПК с одновременным извлечением в результате биосорбции свыше 90 % металлов (железа, марганца, цинка). Анаэробная биоочистка позволяет удалить 80–90 % ХПК в течение 40–50 дней при 25°C (при 10°C величина удаления ХПК снижается до 50 %).

Биогаз, образуемый при биодеградации материала свалок, является ценным энергоносителем, но также может вызывать негативные явления в окружающей среде (дурной запах, закисление грунтовых вод, снижение урожайности сельскохозяйственных культур), поэтому следует ограничивать утечки газа. Это возможно при помощи специальных приспособлений (преграды, траншеи, наполненные гравием, системы экстракции газа), позволяющих управлять перемещением газа, а также созданием над массивом свалок оболочек, препятствующих его утечке.

Интерес к извлечению метана в процессах переработки свалок существенно возрос в последние десять лет. В США для этих целей построено 10 установок, в странах Общего рынка – около 40. Создание таких установок

планируется в Великобритании, Японии, Канаде, Швейцарии и др. Сбор и последующее применение биогаза, образуемого на свалках в больших количествах, имеет огромные перспективы. Так, установка в Росмане в летние месяцы дает до 40000 м^3 газа в день. Объемы таких установок значительны, до $10\text{--}20 \cdot 10^6 \text{ м}^3$.

Теоретический выход метана может составлять $0.266 \text{ м}^3/\text{кг}$ сухих твердых отходов. Реальные экспериментальные выходы биогаза, полученные на различных лабораторных, пилотных установках и контролируемых свалках, дают существенный разброс данных, от десятков до сотен л/кг в год. Огромное влияние на процесс метаногенеза оказывают многие факторы, – температура и pH среды, влажность, уровень аэрации, химический состав отходов, наличие в них токсических компонентов и др. Газ, образуемый на свалке, извлекается с помощью вертикальных или горизонтальных перфорированных труб из полиэтилена. Применение воздухоподъемников и насосов может повысить степень извлечения газа. Газ используют для обогрева теплиц, получения пара, а после дополнительной очистки его можно перекачивать по трубам к местам потребления.

Таким образом, помимо экологической, проблема носит экономический характер, так как использование образуемого на свалках биогаза, снижает материальные затраты на борьбу с загрязнениями, опасными и дурнопахнущими отходами.

7.3. БИООЧИСТКА ГАЗОВОЗДУШНЫХ ВЫБРОСОВ

Проблема борьбы с загрязнением воздушного бассейна в условиях возрастающей технологической деятельности приобретает все большую остроту. В воздухе больших промышленных городов содержится огромное количество вредных веществ. При этом концентрация многих токсикантов превышает допустимые уровни. Основной вклад в загрязнение атмосферы вносят предприятия нефтеперерабатывающей, химической, пищевой и перерабатывающей промышленности, а также большие сельскохозяйственные комплексы, отстойники сточных вод, установки по обезвреживанию отходов. Среди этих веществ – органические (ароматические и непредельные углеводороды, азот-, кислород-, серо- и галогенсодержащие соединения) и неорганические вещества (сернистый газ, сероуглерод, окислы углерода, аммиак, хлороводород, галогены). В воздушных бассейнах больших промышленных городов присутствуют десятки различных соединений, в том числе дурнопахнущие, способные даже в незначительных концентрациях представлять угрозу для здоровья, а также вызывать у людей чувство дискомфорта.

Для очистки воздуха применяют различные методы – физические, химические и биологические, однако уровень и масштабы их применения в настоящее время чрезвычайно далеки от требуемых. Среди применяемых физических методов – абсорбция примесей на активированном угле и дру-

гих поглотителях, абсорбция жидкостями. Наиболее распространенными химическими методами очистки воздуха являются озонирование, прокаливание, каталитическое дожигание, хлорирование. Биологические методы очистки газозвудушных выбросов начали применять сравнительно недавно, и пока в ограниченных масштабах.

Биологические методы очистки воздуха базируются на способности микроорганизмов разрушать в аэробных условиях широкий спектр веществ и соединений до конечных продуктов, CO_2 и H_2O . Широко известна способность микроорганизмов метаболизировать алифатические, ароматические, гетероциклические, ациклические и различные C_1 -соединения. Микроорганизмы утилизируют аммиак, окисляют сернистый газ, сероводород и диметилсульфоксид. Образующие сульфаты утилизируются другими микробными видами. Есть данные об эффективном окислении аэробными карбоксидобактериями моноокси углерода, являющейся одним из наиболее опасных воздушных загрязнителей. Представители рода *Nocardia* эффективно разрушают стерины и ксилон; *Nyphomicrobium* – дихлорэтан; *Xanthobacterium* – этан и дихлорэтан; *Mycobacterium* – винилхлорид.

Наиболее широким спектром катаболических путей характеризуются почвенные микроорганизмы. Так, только представители рода *Pseudomonas* способны использовать в качестве единственного источника углерода, серы или азота свыше 100 соединений – загрязнителей биосферы. Большие возможности для повышения биосинтетического потенциала микроорганизмов-деструкторов токсичных веществ имеются на вооружении у микробиологов и генетиков, включая методы традиционной селекции и отбора, а также новейшие достижения клеточной и генетической инженерии. Подавляющее число токсических загрязнителей атмосферы может быть разрушено монокультурами микроорганизмов, но более эффективно применение смешанных культур, имеющих больший каталитический потенциал и, следовательно, деструктурирующую способность. Для разрушения трудно утилизируемых соединений в ряде случаев микроорганизмы целесообразно адаптировать к таким субстратам и только после этого вводить их в рабочее тело действующих установок.

Для биологической очистки воздуха применяют три типа установок: биофильтры, биоскрубберы и биореакторы с омываемым слоем (табл. 7.3).

Принципиальная схема для биологической очистки воздуха была предложена в 1940 г. Прюссом. Первый биофильтр в Европе был построен в ФРГ совсем недавно – в 1980 г. Спустя три года, в 1984 г. только в ФРГ функционировало и находилось в стадии запуска около 240 установок. Основным элементом биофильтра для очистки воздуха, как и водоочистного биофильтра, является фильтрующий слой, который сорбирует токсические вещества из воздуха. Далее эти вещества в растворенном виде диффундируют к микробным клеткам, включаются в них и подвергаются деструкции.

**Классификация установок биологической очистки воздуха
(по И. Б. Уткину и др., 1989).**

Тип установки	Рабочее тело	Водный режим	Основная стадия удаления примесей из воздуха	Источник минеральных солей
<i>Биофильтр</i>	Фильтрующий слой – иммобилизованные на природных носителях микробные клетки	Циркуляция воды отсутствует	1. Десорбция материалом фильтрующего слоя. 2. Деструкция микробными клетками.	Материал фильтрующего слоя
<i>Биоскруббер</i>	Вода, активный ил	Циркуляция воды	1. Абсорбция в абсорбере водой. 2. Деструкция в аэротенке активным илом.	Минеральные соли вносят в воду
<i>Биореактор с омываемым слоем</i>	Иммобилизованные на искусственных носителях микробные клетки	Циркуляция воды	1. Диффузия через водную пленку к микроорганизмам. 2. Деструкция в биологическом слое.	Минеральные соли вносят в воду

В качестве носителя для фильтрующего слоя используют природные материалы – компост, торф и др. Эти материалы содержат в своем составе различные минеральные соли и вещества, необходимые для развития микроорганизмов. Поэтому в биофильтры не вносят каких-либо минеральных добавок. Воздух, подлежащий очистке, подается вентилятором в систему, проходит через фильтрующий слой в любом направлении, снизу – вверх или – наоборот. При этом воздух должен проходить через всю массу фильтрующего слоя равномерно. Поэтому требуется однородность слоя и определенная степень влажности. Оптимальная для очистки воздуха влажность фильтрующего слоя составляет 40–60 % от веса материала носителя. При недостаточной влажности материала фильтрующего слоя в нем образуются трещины, материал пересыхает. Это затрудняет прохождение воздуха и снижает физиологическую активность микроорганизмов. Увлажнение материала обеспечивается распылением воды на поверхности фильтрующего слоя. При избыточной влажности в толще слоя происходит образование анаэробных зон с высоким аэродинамическим сопротивлением. В результате снижается время контакта потока воздуха с поглотителем и падает эффективность очистки. В толще фильтрующей массы не должно образовываться более плотных зон или комков материала, что возможно при использовании компоста, так как при этом снижается удельная площадь поверхности фильтрующего слоя. В материале не должно возникать температурных градиентов, а также не должно происходить резких изме-

нений pH среды. Поэтому температурный режим в биофилт্রে поддерживается постоянным. Для этого воздух, подаваемый в биофилтър, подогревается, установка в целом термостатируется.

Для обеспечения стабильной работы биофилтров следует соблюдать комплекс мер, важнейшими из которых являются следующие. Воздух, подаваемый на очистку в биофилтър, предварительно увлажняют в биоскруббере до относительной влажности в 95–100 %. При заполнении фильтрующего слоя для снижения аэродинамического сопротивления в материал добавляют гранулы (диаметром 3–10 мм) из синтетических полимерных материалов (полиэтилена, полистирола), а также частицы автопокрышек, активированный уголь. Масса добавок составляет от 30 до 70 % от массы фильтрующего материала.

Для предотвращения резкого закисления материала фильтрующего слоя в ходе трансформации органики в него добавляют известняк или карбонат кальция в количестве 2–40 % от веса носителя. С целью избежания ситуаций, когда микроорганизмы, входящие в состав рабочего тела биофилтра, могут ингибироваться токсическими веществами в результате, например, залповых выбросов, в материаль вносят активированный уголь, до 250 кг/м³.

Эффективность работы биофилтра определяется газодинамическими параметрами фильтрующего слоя, спектром и концентрацией присутствующих в воздухе веществ и ферментативной активностью микроорганизмов-деструкторов. При этом скорость удаления вредных примесей из воздуха в процессе биоочистки может лимитироваться как диффузией веществ из газовой фазы в биокаталитический слой, так и скоростью протекания биохимических реакций в микробных клетках. При высокой входной концентрации вредных веществ в воздухе процесс их деструкции в ходе прохождения потока через фильтрующий слой неравномерен. Сначала разрушаются легкодоступные вещества, и только в конце процесса начинается разрушение труднодеградируемых соединений. Так, при присутствии в воздухе в качестве вредных примесей комплекса соединений (бутанола, этилацетата, бутилацетата и толуола) последний утилизируется микроорганизмами только после окисления всех остальных веществ.

Стационарное состояние и наиболее высокая скорость биоочистки наступают спустя некоторое время после запуска биофилтра. Требуется некоторый период для созревания и адаптации микробиологического ценоза. Длительность периода адаптации зависит от концентрации веществ в воздухе и микробного пейзажа в диффузионном слое и может составлять от нескольких часов до нескольких недель. Концентрация микроорганизмов в ходе очистки возрастает и может стать избыточной. Поэтому периодически материал фильтрующего слоя приходится обновлять. Длительность циклов достаточно велика и составляет несколько лет.

Принцип функционирования биоскрубберов отличается тем, что процесс очистки воздуха реализуется в две стадии в двух различных установках. На

первом этапе в абсорбере токсические вещества, находящиеся в воздухе, а также кислород, растворяется в воде. В результате воздух выходит очищенным, а загрязненная вода далее следует на очистку. Применяют различные типы абсорберов (барботажные, насадочные, распылительные, форсуночные и т.д.). Цель конструктивных усовершенствований заключается в увеличении площади поверхности раздела фаз, газовой и жидкости. Это определяет эффективность абсорбции. На второй стадии загрязненная вода поступает в азротенк, где она регенерируется. Очищение воды в азротенке происходит по обычной схеме с участием кислорода. В ходе очистки сложные органические вещества окисляются микроорганизмами, формирующими активный ил, до конечных продуктов с образованием биомассы.

Биореактор с омываемым слоем: рабочим телом этой биосистемы являются иммобилизованные микроорганизмы. Биослой реактора представляет собой гранулы с иммобилизованными микробными клетками. Этот слой оmyвается водой, содержащей необходимые для развития клеток минеральные вещества. Загрязненный воздух проходит через него, при этом вещества, подлежащие деструкции, диффундируют в водную пленку, покрывающую частицы биокатализатора, и далее окисляются микроорганизмами. Скорость деструкции может лимитироваться скоростью диффузии веществ из газовой фазы в жидкую, а также скоростью протекания реакций в микробных клетках. Скорость диффузии, в свою очередь, зависит от природы токсических веществ и их концентраций. Стационарный режим биореактора с омываемым слоем после его запуска наступает через 5–10 дней. При использовании заранее адаптированных к очищаемым веществам микроорганизмов этот срок может быть сокращен до нескольких часов. Периодически, обычно раз в несколько месяцев, биослой очищают от избытка биомассы и наполняют свежими гранулами.

Основные требования, предъявляемые к установкам биологической очистки газов, заключаются в простоте и эксплуатационной надежности конструкции, высокой удельной производительности и высокой степени очистки. Удельная производительность установки измеряется отношением объема воздуха, прошедшего через нее за 1 ч., к общему объему установки.

Масштабы промышленного применения методов биологической очистки воздуха в настоящее время весьма незначительны. Наиболее распространенным типом установок являются биофильтры. Они достаточно дешевы, малоэнергоемки, требуют незначительных расходов воды. Однако производительность биофильтров сравнительно невысока, – от 5 до 400 м³ очищаемого воздуха на 1 м² поперечного сечения фильтрующего слоя/ч. Главным образом, это определяется низким содержанием микроорганизмов в единице объема материала фильтрующего слоя. Высота биофильтров из-за требований однородности структуры и газодинамических ограничений невелика (около 1 м), поэтому они занимают большие площади (от 10 до 1600 м²). Степень очистки воздуха в биофильтрах – достаточно

высока. Например, используемые в сельском хозяйстве ФРГ биофильтры обеспечивают 90 % очистку воздуха от дурнопахнущей органики. Повышение эффективности работы биофильтров связано с созданием установок, в которых обеспечивается более равномерное прохождение воздуха через рабочее тело установки. Так, в ФРГ фирмой «Гербург Вейз» разработан биофильтр, через который сверху вниз противотоком к вводимому снизу воздуху проходит тонко измельченный компост, полученный при переработке мусора и шлама. Компост выгружается на дно установки и транспортером вновь подается в верхнюю часть установки. Такой движущийся биологически активный компост обеспечивает равномерное прохождение через него очищаемого воздуха; степень извлечения из воздуха п-алканов, толуола, сероводорода составляет 96.7–99.9 %. Повышение эффективности работы биофильтров, безусловно, связано с повышением энергозатрат на процесс биоочистки.

Биоскрубберы по сравнению с биофильтрами занимают меньшую площадь, так как представляют собой башни высотой несколько метров. Эксплуатационные затраты при использовании биоскрубберов выше, так как процесс биоочистки воды требует существенных затрат. Применение биоскрубберов эффективно при наличии в воздухе хорошо растворимых токсических веществ. Производительность биоскрубберов существенно выше по сравнению с биофильтрами, при этом эффективность очистки также высока (табл. 7.4). Например, применение биоскрубберов для очистки отходящих газов металлургических предприятий дает следующие показатели: производительность 120 000 м³/ч, снижение интенсивности запаха воздуха от 75 до 85 %, степень конверсии органических примесей – 50 %.

Наиболее перспективными для очистки воздуха являются биореакторы с омываемым слоем. Эти установки, практически не уступая в степени очистки, характеризуются более высокой удельной производительностью

Таблица 7.4

**Параметры установок биоочистки воздуха
на объектах интенсивного животноводства ФРГ (по В. Brauer, 1984)**

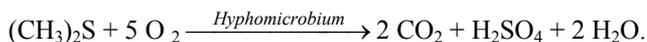
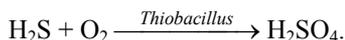
Установка	Рабочий объем, м ³	Удельная производительность, ч ⁻¹	Степень очистки, %	Потери давления, Н/м ²	Расход воды, л/сут.	Удельный расход воды в сутки
Биофильтр с компостом	228	88	92	1700	510	1.8 · 10 ⁻³
Биофильтр с волокнистым торфом	19.5	564	66–90	55	48	2.5 · 10 ⁻³
Биоскруббер	44.4	900	97.5–99.7	1200	9600	0.2
Биореактор с омываемым слоем	1.5	5000	60–90	170	48000	23

(несколько тысяч кубометров очищаемого воздуха в час). Такие малогабаритные установки очень эффективны для очистки воздуха предприятий интенсивного животноводства. Степень очистки воздуха в реакторе с иммобилизованными на активированном угле микроорганизмами от ацетона, бутанола, пропионового альдегида, этилацетата достигает 90 % при удельной производительности установки $10\ 000\ \text{ч}^{-1}$.

Описаны другие подходы для очистки воздуха, например, на основе растущей суспензии микроорганизмов. Пропускание воздуха, насыщенного сероводородом, сернистым ангидридом и парами серной кислоты, через интенсивную культуру микроводоросли *Chlorella*, имеющую большую поверхность контакта суспензии с воздухом, обеспечивает 100 % очистку воздуха при производительности установки до 1 млн. $\text{м}^3/\text{ч}$.

Известны способы комплексной очистки стоков и загрязненного воздуха от алифатических кислот, спиртов, альдегидов и углеводов в аэротенке с активным илом. Показана возможность эффективной очистки отходящего воздуха ряда фармацевтических производств на основе иммобилизованных микробных клеток. Производительность установки по ацетону достигает $164\ \text{г}\ \text{углерода}/\text{м}^3\cdot\text{ч}$; $57\ \text{г}/\text{м}^3\cdot\text{ч}$ по смеси этанол + пропанол и $15\ \text{г}/\text{м}^3\cdot\text{ч}$ по дихлорэтану. Для детоксикации цианида в промышленных выбросах предложены биологические методы, включая применение различных биологических агентов, от активного ила до специфических ферментов, разрушающих цианиды. Так, радаза, обнаруженная у *Bacillus stearothermophilus*, катализирует превращение цианида в тиоцианат, а иммобилизованная цианидгидратаза гидролизует цианид до формамида.

Образующиеся во многих производственных процессах восстановленные соединения серы (тиосульфат, сероводород, метилмеркаптаны, диметилсульфид) могут служить источником энергии для многих микроорганизмов:



Один из методов очистки от сероводорода состоит в пропускании воздуха через солевой раствор меди. Образующийся в результате этого нерастворимый сульфид металла далее может быть окислен при участии микроорганизмов. Возможно создание системы биоочистки воздуха от сероводорода, а также органических соединений серы с использованием тиобацилл; при анаэробных условиях десульфурование сопряжено с денитрификацией:



Таким образом, в настоящее время в промышленных масштабах применяются достаточно эффективные биологические процессы для очистки газоздушных выбросов. Существуют реальные научные основы для разработки и внедрения новых методов биоочистки.

7.4. БИОДЕГРАДАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

Ксенобиотики – чужеродные для организмов соединения (пестициды, ПАВ, красители, лекарственные вещества и пр.), которые практически не включаются в элементные циклы углерода, азота, серы или фосфора. Ксенобиотики временно или постоянно накапливаются в окружающей среде и вредно влияют на все живое. Широкое и повсеместное применение пестицидов, в том числе неразлагаемых, накопление различных отходов в огромных количествах привело к широкому распространению загрязнения окружающей среды – недр, воды, воздуха. Накопление ксенобиотиков представляет огромную опасность для человека, употребляющего в пищу крупную рыбу и высших животных.

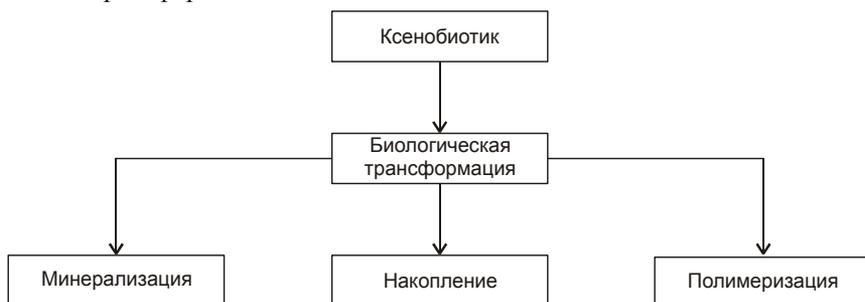
Судьба химических соединений, попадающих в окружающую среду, определяется комплексом физических, химических и, особенно, биологических факторов. Дegrаdация ксенобиотиков может происходить в результате физических и химических процессов и существенно зависит от типа почвы, ее структуры, влажности, температуры и пр. Биологическая трансформация соединений, попавших в окружающую среду, может протекать в различных направлениях, приводя к минерализации, накоплению или полимеризации.

Так, примерные значения коэффициента увеличения концентрации ДДТ (дихлордифенилтрихлорэтана) таковы:

Водная среда	10^0
↓	
Фитопланктон	
↓	↓
Зоопланктон	
↓	
Мелкая рыба	10^6
↓	
Крупная рыба	↓
↓	
Хищные птицы	10^8

Ксенобиотики, которые подвергаются полной деградации, то есть минерализуются до диоксида углерода, воды, аммиака, сульфатов и фосфатов, используются микроорганизмами в качестве основных ростовых субстратов и проходят полный метаболический цикл. Частичная трансформация соединений происходит, как правило, в процессах кометаболизма или

соокисления и не связана с включением образуемых продуктов в метаболический цикл микроорганизмами. Наконец, некоторые ароматические углеводороды и синтетические полимеры вообще не поддаются биологической трансформации:



Поведение ксенобиотика в природе зависит от многих взаимосвязанных факторов: структуры и свойств самого соединения, физико-химических условий среды и ее биокаталитического потенциала, определяемого микробным пейзажем. Все эти факторы в совокупности определяют скорость и глубину трансформации ксенобиотика. Нельзя забывать о том, что биологическая деградация ксенобиотиков оправдана только тогда, когда происходит их полная минерализация, разрушение и детоксикация. Это может быть достигнуто в результате всего одной модификации структуры соединения. Однако часто в ходе деградации происходит серия последовательных модификаций исходного соединения с участием нескольких микробных видов. Важную роль в удалении ксенобиотиков из окружающей среды играют разнообразные типы микробного метаболизма. В природных условиях на ксенобиотики воздействуют микробные сообщества. В них проявляются различные типы взаимодействия: кооперация, комменсализм, взаимопомощь. Именно благодаря гетерогенности природных микробных сообществ ксенобиотики в принципе могут подвергаться биодеградации, а наличие в микробных сообществах взаимосвязанных метаболических путей разрушения токсинов является основой для борьбы с загрязнением окружающей среды. Есть два пути для борьбы с загрязнением биосферы ксенобиотиками: сбор и детоксикация ксенобиотиков до момента попадания в окружающую среду и трансформация или удаление ксенобиотиков, попавших в среду.

Возможности микробных сообществ в отношении деградации многих токсичных соединений значительны. Доказано, что при повторном попадании в среду многих химических соединений время до начала их трансформации (так называемый адаптационный период микроорганизмов по отношению к данному субстрату) значительно короче, по сравнению с первым попаданием этого соединения. В течение этого периода микроорганизмы в ходе адаптации к токсическому соединению, как субстрату,

селектируются по способности деградировать данный субстрат. В результате естественным путем возникают микробные популяции, которые, как оказалось, могут сохраняться в почве в течение нескольких месяцев после полной деградации токсиканта. Поэтому к моменту нового поступления этого соединения в почву в ней уже присутствуют адаптированные микроорганизмы, способные атаковать токсикант. Таким образом, после попадания ксенобиотиков в окружающую среду из почвы можно выделить микробные виды, способные деградировать конкретные ксенобиотики и далее среди них вести селекцию на увеличение скорости деградации. Это возможно различными путями: отбором конститутивных мутантов, отбором на генную дупликацию и на основе механизма переноса генов. Повышение деградирующей способности возможно также в результате стимуляции естественной почвенной микрофлоры, уже адаптированной к токсикантам.

При попадании новых веществ в окружающую среду может происходить природное генетическое конструирование, в результате которого возникают микробные формы с новыми катаболическими функциями. Огромная роль в процессах межорганизменного переноса генетической информации, приводящих к биохимической изменчивости популяций, принадлежит плазмидам – внехромосомным генетическим элементам. Катаболические, или деградативные плазмиды, кодирующие реакции минерализации или трансформации ксенобиотиков, придают микроорганизмам способность перераспределять между собой пул деградативных генов.

Таблица 7.5.

Природные катаболические плазмиды (по Д. Хардмену, 1990).

Плаزمида	Субстрат	Хозяин
pJP1	2,4-Дихлорфеноуксусная кислота и галогенсодержащие пестициды	<i>Alcaligenes paradoxus</i>
pUU220	Галогеналкилы Никотин	<i>Alcaligenes sp.</i> <i>Arthrobacter oxidans</i>
CAM	D-Камфора	<i>Pseudomonas putida</i>
SAL	Салицилат	<i>P. sp.</i>
NAH	Нафталин	<i>P. putida</i>
OCT	Октан	<i>P. oleovorans</i>
XYL	Ксилол	<i>P. arvilla</i>
TOL	Толуол, м-ксилол, п-ксилол	<i>P. putida</i>
NIC	Никотин, 3,5-Ксиленол	<i>P. convexa</i> <i>P. putida</i>
pAC25	3-Хлорбензол п-Крезол	<i>P. putida</i> <i>P. putida</i>
pWW17	Фенилацетат	<i>P. sp.</i>
pUU204	Галогеналкилы	<i>P. sp.</i>

В настоящее время описаны разнообразные природные катаболические плазмиды, встречающиеся у различных представителей почвенной микрофлоры (табл. 7.5). Особенно часто они идентифицируются среди рода *Pseudomonas*. Информация, которую несут плазмиды, может расширить круг субстратов хозяина за счет объединения двух метаболических путей, либо полным кодированием нового пути, либо дополнением существующих метаболических путей. Внутри- и межплазмидные рекомбинации приводят к перетасовке генов на плаزمиде и возникновению новых метаболических путей.

Известны также случаи перераспределения генетического материала между плазмидами и хромосомой хозяина, приводящие к появлению совершенно новых генов. Пластичность катаболических плазмид обеспечивает перераспределение генетического материала, что может привести к возникновению в природе нового организма, эффективно деградирующего новый субстрат.

Таким образом, природные генетические механизмы обмена информации позволяют получать эффективные штаммы-деструкторы ксенобиотиков. Это тем более важно, так как общепринятые методы работы с рекомбинантными ДНК, применяемые для клонирования чужеродной ДНК с небольшим числом генов, имеют существенные ограничения при клонировании метаболических путей деградации ксенобиотиков, кодируемых десятками генов. Ограничения также обусловлены недостатком знаний о механизмах деградации и структуре метаболических путей, а также возможностями риска, связанного с попаданием сконструированных организмов в среду. Методы генетической инженерии могут быть полезными для усовершенствования уже существующих деградативных способностей микробных клеток.

Большинство пестицидов, попадающих в окружающую среду в результате использования их для обработки сельскохозяйственных культур, расщепляются бактериями и грибами. Превращение исходного пестицида в менее сложное соединение достаточно эффективно происходит под воздействием микробных сообществ. Доказана возможность полной минерализации ДДТ в ходе сопряженного метаболизма. Высокая токсичность ряда пестицидов может утрачиваться уже на первой стадии микробной трансформации. Это позволяет разрабатывать относительно простые микробиологические методы для борьбы с ксенобиотиками. Описаны опыты успешного применения ферментов (гидролаз, эстераз, ациламидаз и фосфоэстераз) для проведения первичного гидролиза пестицидов и увеличения степени их последующей биодеградации. Например, с помощью паратионгидролазы из *Pseudomonas* sp. можно достаточно эффективно удалять остаточный паратион из контейнеров с данным пестицидом, а забуференные растворы данного фермента применяют для уничтожения разливов паратиона на почвах. На основе иммобилизованных ферментов возможно

удаление пестицидов из сточных вод; ферменты применяют также в виде аэрозолей для удаления пестицидов с промышленных установок.

Большую опасность для окружающей среды представляют полиароматические углеводороды. Так, полихлорбифенилы (ПХБ) являются очень устойчивыми соединениями, долго присутствующими в окружающей среде в результате прочной адсорбции биологическими и осадочными породами и плохой миграции. Микроорганизмы не способны глубоко деградировать эти соединения, тем не менее, модифицируют их. Установлена способность микробных сообществ деградировать промышленные ПХБ с образованием новых типов углеводородов, при этом молекулы с низкой степенью хлорирования расщепляются. Устойчивое полиароматическое соединение бензапирен не минерализуется в системах активного ила, хотя описано несколько микробных видов, способных частично его метаболизировать. В ходе деградации бензапирена образуются канцерогенные соединения (гидроксиды- и эпоксипроизводные). Также устойчив к деградации полистирол, хотя описано несколько случаев частичной деградации измельченных автомобильных шин, изготовленных из стирол-бутадиеновой резины. Есть сообщения о росте микробного сообщества на стироле, в ходе которого разрушается ингибитор полимеризации 4-трет-бутилкатехол, далее происходит свободнорадикальная полимеризация стирола с осаждением образующегося полистирола. Этот полимер впоследствии под воздействием микробного сообщества исчезает из почвы.

Одной из крупнейших групп загрязнителей природы являются галогенсодержащие ксенобиотики, которые характеризуются высокой токсичностью и плохой деградируемостью. Причина токсичности и устойчивости этих соединений определяется наличием в них трудно расщепляемой галоген-углеродной связи. Однако, как оказалось, ряд галогенсодержащих соединений являются природными образованиями и представляют собой метаболиты бактерий, грибов, водорослей. Это определило судьбу отдельных галогенсодержащих соединений в природе. Наличие данной природной предпосылки для полной деградации ксенобиотика, однако, недостаточно. Для эффективной трансформации родственного ксенобиотического соединения необходима адаптация микроорганизма, включая его генетическую изменчивость. Длительные исследования путей деградации галогенсодержащих ксенобиотиков показали, что для получения суперштамма, эффективно разлагающего данные ксенобиотики, нужно модифицировать существующий катаболический механизм деградации ароматических соединений. Идея конструирования катаболических путей принадлежит Рейнеке и Кнакмуссу, создавшим штамм *Pseudomonas*, способный деградировать 4-хлорбензоат. В эксперименте по скрещиванию *Pseudomonas putida* PaW1, обладающего TOL-плазмидой pWWO с *Pseudomonas* sp. B13 (pWR1), утилизирующим 3-хлорбензоат, они получили трансконъюгат, способный использовать 4-хлорбензоат в результате

переноса гена толуол-1,2-диоксигеназы (контролируемого плазмидой pWWO), в штамм *Pseudomonas* sp. B13. Аналогичный результат был получен при совместном культивировании в хемостате двух культур – *P. aeruginosa*, содержащей плазмиду pAC25, и культуры, содержащую TOL. Первая плазида, связанная с катаболизмом галогенированных органических соединений (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты), была обнаружена у *Alcaligenes paradoxus*, затем у других микроорганизмов. Позже появилась серия публикаций о деградации 2,4-Д, однако сообщения по разрушению 2,4,5-трихлоруксусной кислоты были крайне редки. Впоследствии при совместном культивировании в хемостате в течение 8–10 месяцев микробных культур, содержащих несколько катаболических плазмид, при постепенном увеличении концентрации 2,4,5-Т получили штамм, способный к деградации 2,4,5-Т и трихлорфенола.

Биологические методы также применимы для очистки природной среды от нефтяных загрязнений, представляющих собой как сточные воды нефтяной промышленности, так и непосредственное загрязнение в результате разлива нефти. Сточные воды нефтяной промышленности очищают биологическими методами после удаления большей части различных углеводородов физическими методами. Для этого применяют аэрируемые системы биоочистки с активным илом, содержащим адаптированное к компонентам нефти сообщество. Скорость деградации зависит от качественного состава и концентрации углеводородов, а также температуры и степени аэрации среды. Наиболее эффективно биодеградация осуществляется, когда нефть эмульгирована в воде. Особую проблему представляют выбросы и аварийные разливы нефти на поверхность почвы. Это приводит не только к загрязнению пахотных земель, но также и источников питьевой воды. В почве содержится много микробных видов, способных деградировать углеводороды, но их активность часто низка, в том числе и в результате дефицита отдельных биогенных элементов. В таких случаях эффективным является внесение в почву так называемых «олеофильных удобрений», в состав которых входят соединения азота, фосфаты и другие минеральные элементы, концентрации которых в почве достаточно низки и лимитируют рост микроорганизмов. После внесения этих соединений в почву концентрация микроорганизмов-деструкторов существенно возрастает, и возрастает скорость деградации нефти.

С помощью генетического конструирования создан «супермикроб», способный утилизировать большинство основных углеводородов нефти (рис. 7.7). Многие природные штаммы *Pseudomonas putida* несут катаболические плазмиды, каждая из которых кодирует фермент для расщепления одного класса углеводородов – плазида OCT обуславливает расщепление октана, гексана, декана; XYL – ксилола и толуола; CAM – камфары, NAH – нафталина. Плазмиды CAM и NAH сами способствуют своему переносу, стимулируя спаривание бактерий.

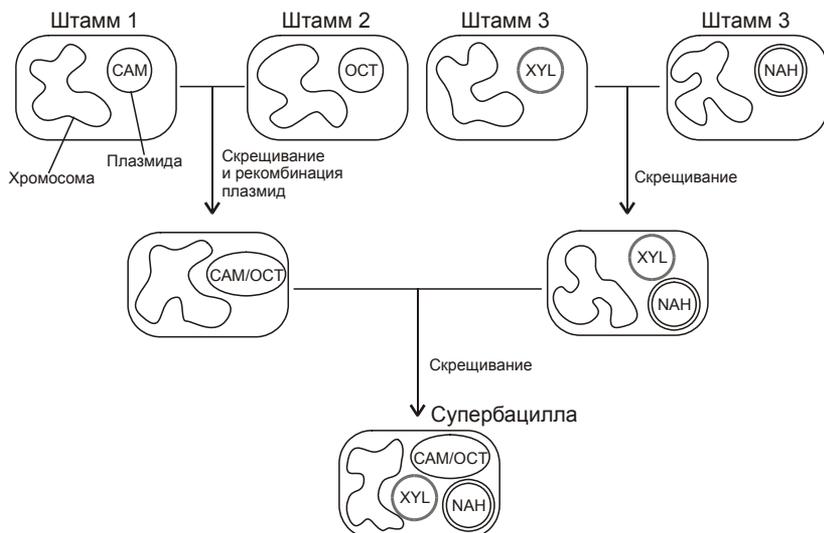


Рис. 7.7. Суперштамм, полученный на основе последовательных скрещиваний четырех штаммов *Pseudomonas putida* (по Д. Хопвуду, 1984).

Штамм содержит XYL и NAN плазмиды, гибридную плазмиду CAM/OCT, так как изолированные плазмиды CAM и OCT не способны существовать в одной клетке.

В результате последовательных скрещиваний был получен «суперштамм», несущий плазмиды XYL и NAN и гибридную плазмиду, содержащую части плазмид OCT и CAM. Такая мультиплазмидная бактерия растет, утилизируя неочищенную нефть. Однако возможность эффективного применения такого организма в естественных условиях требует доказательства.

Использование методов генетического конструирования микробных штаммов-деструкторов ксенобиотиков для практического применения находится на ранней стадии. Одна из основных проблем при конструировании микроорганизмов на основе природных катаболических плазмид – стабильность. Стабильность систем «хозяин-вектор» особенно важна при интродукции штаммов в естественную среду. При возвращении микроорганизма с новой катаболической функцией в исходную природную среду ему приходится конкурировать с хорошо адаптированной к данным условиям среды естественной микрофлорой, сталкиваться с огромным разнообразием источников углерода, в том числе высокотоксичных. При этом совершенно неясны перспективы сохранения стабильности новой катаболической функции и, следовательно, самого штамма.

Пока существует большой разрыв между достижениями, полученными в конструировании микроорганизмов, и возможностями их практического применения. Вероятно, в будущем наиболее перспективными для детоксикации ксенобиотиков будут биологические системы, состоящие из микробиологической консорции индивидуальных организмов и микробных сообществ, полученных методами клеточной и генетической инженерии.

Заклучение

В определении оптимального направления развития биологических технологий, независимо от области их применения, большую роль играет международное сотрудничество, которое обеспечивает выбор той или иной технологий с учетом экономико-социальных условий отдельных стран. Примером региональной кооперации в биотехнологии может служить Центрально-Американский институт промышленных исследований (САИП), созданный в 1955 г. Этот институт, расположенный в Гватемале, содействует промышленному развитию региона, который может обеспечить достаточный уровень биопромышленности с учетом имеющихся территорий, климато-географических условий и огромного количества имеющихся здесь побочных продуктов и отходов сельскохозяйственного производства. В рамках САИП в 1970 г. был создан биотехнологический отдел, являющийся штаб-квартирой Международного центра по исследованию микробных ресурсов (MIRCEN) данного региона, субсидируемого ЮНЕСКО. Исследовательские проекты института сосредоточились в двух направлениях, связанных с основными видами сельского хозяйства региона: переработкой кофейных зерен и получением сахара. Накапливающиеся в огромных количествах отходы данных технологий были использованы в качестве субстратов для производства биогаза и микробной биомассы. Были разработаны также процессы получения спирта из соков тропических фруктов, а на основе иммобилизованных ферментов созданы производства осахаривания фруктозных сиропов из сахарного тростника, разработаны новые технологии ферментации овощей под воздействием чистых культур лактобацилл. Таким образом, наличие этого института сформировало фронт биотехнологических работ, внедрение которых способствовало экономическому развитию региона.

С целью переноса новейших технологий из развитых стран в развивающиеся ООН создан Международный центр генной инженерии и биотехнологии. Под эгидой Организации промышленного развития ООН (UNIDO) создана комиссия для изучения мнения государств-членов по взаимодействию с Международным центром. На базе совместных исследований центром запланировано создать школу для подготовки специалистов из развивающихся стран. В качестве направлений совместных исследований комиссией UNIDO рекомендованы: использование энергии биомассы, добыча нефти из истощающихся скважин, усовершенствование методов ферментации, синтез лекарств против тропических болезней, получение эффективных вакцин для человека и домашних животных, селекция высокоурожайных и устойчивых к болезням сортов культурных растений.

На протяжении ряда лет программы крупнейших международных организаций (ФАО, ВОЗ, ЮНЕСКО) содействуют развитию и расширению

международного сотрудничества в прикладной микробиологии и технологии. В начале 70-х гг. ЮНЕСКО субсидировало создание Международной организации исследования клетки (ICRO). В начале 80-х гг. в рамках «Программы окружающей среды» (UNEP) ЮНЕСКО основало международную программу, призванную охранять генетическое разнообразие микробных ресурсов и сделать их доступными для развивающихся стран. С середины 80-х гг. начала формироваться сеть международных центров по исследованию микробных ресурсов (MIRCEN). Цели данного формирования следующие: интеграция и сотрудничество между лабораториями; распределение и использование микробных ресурсов; сохранение микробного генофонда; разработка новых видов недорогих и эффективных технологий; использование микробиологии в практике сельского хозяйства; обучение персонала и распространение новой информации, связанной с общей и прикладной микробиологией.

Первым шагом в создании сети MIRCEN было образование в Австралии Международного центра данных о микроорганизмах. Центр обладает огромной коллекцией микробных штаммов и имеет мировой указатель микробных коллекций. Аналогичные центры созданы в Бангкоке – для стран Юго-Восточной Азии, в Найроби – для Африки, в Бразилии – для Южной Америки, в Гватемале – для Центральной Америки, в Каире – для арабских стран. Специализация направлений исследований в этих центрах связана с климато-географическими особенностями и экономикой регионов и способствует их развитию.

Развитие всех современных направлений биотехнологии, включая экологическую биотехнологию, происходит в настоящее время настолько быстро, что точные прогнозные оценки в этой области весьма затруднительны. Биологические технологии целиком базируются на научных достижениях. При этом то, что лишь недавно было предметом лабораторных исследований, сегодня активно внедряется в производство. Круг наук, результаты которых воплощаются в биотехнологию, непрерывно расширяется. Таким образом, расширяются возможности и сферы самой биотехнологии. Вероятно, в будущем не будет ни одного направления человеческой деятельности, которое не было бы в тех или иных пределах связано с биотехнологией.

Постановка новых биотехнологических процессов связана с большими капиталовложениями и высоким риском. Внедрение новейших методов биотехнологии особенно перспективно, когда целевой продукт не может быть получен иными способами или масштабы его производства малы, а цены очень высоки. Особенно это касается фармакологических препаратов и диагностических средств. В этой связи огромные перспективы у иммунной биотехнологии, с помощью которой можно распознавать и выделять из смесей одиночные клетки. Эти возможности очень важны и перспективны для диагностики и лечения, в фармакологической, пищевой

промышленности, для очистки гормонов, витаминов, белков, токсинов, вакцин и пр., а также в научных исследованиях.

Дальнейшее развитие биологических технологий во многом связано с прогрессом в области технических наук. Повышение эффективности биотехнологических процессов невозможно без автоматизации и совершенствования аппаратного и технологического оформления процессов. Это позволит повысить эффективность традиционных биотехнологических процессов и расширит сферы применения получаемых продуктов. Сегодня огромные средства инвестируются на масштабирование биотехнологических процессов. По оценкам специалистов, инвестиции в этой области будут возрастать в среднем на 9 % в год, и к 2000 г. составят свыше 14 млрд. долл. в год.

Новые перспективы для биотехнологических производств связаны с разработкой биодатчиков. В настоящее время применяются и создаются в основном ферментные и микробные электроды, иммунодатчики и электродные резисторы. Пример будущего применения биодатчиков – различные области, в том числе определение биологически активных органических веществ в крови, а также концентраций токсических веществ в различных средах, включая вирусы и патогены, нервно-паралитические газы; контроль количества пестицидов и других ксенобиотиков в среде; диагностика заболеваний человека, животных и растений; качественный анализ пищевых продуктов и пр. По разным оценкам рынок биодатчиков составит к 2000 г. от 0.5 до 14 млрд. долл. (табл. 1).

Большое будущее у прототипологии – технологии изменения свойств природных белков на генетическом уровне и получения новых белков (стимуляторов роста растений, инсектицидов, высокоактивных и устойчивых ферментов, биосенсоров и биоэлементов для ЭВМ).

Важнейшая роль принадлежит биотехнологии в решении проблемы обеспечения населения планеты пищевыми продуктами. В этой области грядущие усовершенствования связаны с получением высокопродуктивных и устойчивых к болезням и вредителям культурных растений и сельскохозяйственных животных, внедрением генов азотфиксации в высшие растения, получением эффективных биопестицидов и биогербицидов.

Согласно прогнозам, мировой рынок традиционных продуктов биотехнологии составит к 2000 г. более 50 млрд. долл. (табл. 2). При этом мировой объем продаж составит (в млрд. долл. в год): продуктов для пищевой промышленности и сельского хозяйства – 21.20; медицинских препаратов – 10.08; других продуктов – 18.40.

Велики перспективы биотехнологии в создании новых источников энергии. Экологически чистые биотехнологические способы получения энергии уже в настоящее время оказывают существенное влияние на энергетический потенциал общества. Продолжение исследований по усовершенствованию процессов метаногенеза, получения спиртов, а также пре-

Таблица 1.

**Прогнозируемый рынок биодатчиков в 1990–2000 гг.
(по А. W. Dokumentationen zur Aussenwirtschaft, 1988).**

Область применения	Млн. долл. в год	
	1990 г.	2000 г.
Медицина и ветеринария	240	630
Сельское хозяйство и пищевая промышленность	105	300
Защита окружающей среды	67	377
Химия и биотехника	59	439
Всего:	471	1746

Таблица 2.

**Прогноз мирового рынка традиционных продуктов биотехнологии в 2000 г.
(по Hemijska Industrija, 1988).**

Продукт	Продажа, млн. долл.	Продукт	Продажа, млн. долл.
Белки	15	Ферменты	0.5
Аминокислоты	2.4	Витамины	0.43
Пептиды	2.0	Антивирусные препараты	0.2
Антибиотики	2.0	Гормоны	1.26

образования различных видов энергии и созданию биотопливных элементов, чрезвычайно перспективны и обещают большие экономо-экологические выгоды. Прогнозируется, что объем продажи биотехнологических энергоносителей к 2000 г. составит около 16.35 млрд. долл. в год.

Более широкое применение биотехнологии в добывающей промышленности приведет к переходу от тяжелой индустрии к высоким технологиям. Применение методов биогеометаллургии позволит вовлечь в производство огромное количество отходов, забалансовые, а также трудноперерабатываемые руды и горные породы.

Генетическую инженерию следует рассматривать как одно из приоритетных направлений развития биотехнологии. Рынок генноинженерных продуктов к 2000 г. предположительно составит около 40 млрд. долл. и будет включать до 40 наименований. Основными среди них будут интерфероны, человеческие гормоны, моноклональные антитела, противораковые агенты, вакцины, тромболитики.

Прогнозируя мировой объем продажи продуктов биотехнологии, многие специалисты ведущих западных фирм полагают, что ежегодный прирост составит около 7.5 % и к 2000 г. достигнет 60–65 млрд. долл. (табл. 3). Около 80 % этой суммы придется на традиционные продукты и 20 % – на новые.

Таблица 3.

Прогноз мирового рынка продуктов, получаемых методами новейшей биотехнологии, в млрд. долл. (по Biofutur, 1987).

Область применения	1985 г.	2000 г.
Фармацевтические продукты:		
терапевтические препараты	0.2	32.0
диагностические средства	–	10.0
вакцины	0.1	3.0
Кормовые добавки	1.7	9.0
Приборы и оборудование	0.5	4.8
Сельское хозяйство	–	5.0
Защита окружающей среды	–	2.0
Химия	–	0.3
Всего:	2.5	66.1

На основе ферментов намечено получать до 32 % общего объема вырабатываемых препаратов; 40–50 % продукции составят аминокислоты, медицинские препараты, включая полученные на основе декомбинантных ДНК.

Расширение сферы внедрения биотехнологии изменяет соотношение в системе «человек – производство – природа», повышает производительность труда, принципиально изменяет его качество. Биологизация производства в целом – одно из важнейших направлений в создании гибких саморегулирующихся производственных процессов будущего, которые гармонично вписываются в природу, не причиняя ей вреда. В настоящее время последствия антропогенной деятельности достигли такой грани, когда дальнейшая некоординируемая деятельность может привести к необратимым изменениям в биосфере в целом. Это может привести к тому, что биосфера станет непригодной для обитания человека. Разрешение этого противоречия, то есть создание такого равновесия в природе, которое в состоянии привести к гармоничному сосуществованию возрастающего населения планеты и биосферы, возможно только на основе дальнейшего развития науки и техники. Для этого необходимо разумное развитие человеческого общества в целом, направленное не на разрушение биосферы, а на ее дальнейшее развитие. Последнее, в свою очередь, должно оказывать позитивное влияние на дальнейший прогресс человечества, то есть создание ноосферы. Один из основных путей решения данной проблемы – дальнейшее развитие биологии и расширение сферы применения биотехнологии. Внедрение биотехнологии ведет к созданию экологически чистых технологий в различных сферах человеческой деятельности, включая более рациональное использование природных ресурсов и создание замкнутых производственных циклов.

Литература

К главе 1

1. **Айба Ш., Хемфри А., Миллс Н.** Биохимическая технология и аппаратура. – М., 1967.
2. **Беккер М. Е.** Введение в биотехнологию. – М., 1978.
3. **Бернал Дж.** Наука в истории общества. – М., 1956.
4. **Биотехнология.** /Под ред. А. А. Баева. – М., 1984.
5. **Биотехнология** в 8 тт. /Под. ред. Н. С. Егорова и В. Д. Самуилова. – М., 1987.
6. **Биотехнология** – принципы и применение / под ред. И. Хиггинса, Д. Беста и Дж. Джонса. – М., 1988.
7. **Биотехнология** микробного синтеза. – Рига, 1980.
8. **Бирюков В. В., Кантере В. М.** Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. – М., 1985.
9. **Быков В. А., Винаров Ю. Ю., Шерстобитников В. В.** Расчет процессов микробиологических производств. – Киев, 1985.
10. **Виестур У. Э., Кузнецов А. М., Савенков В. В.** Системы ферментации. – Рига, 1986
11. **Виестур У. Э., Шмите И. А., Жилевич А. В.** Биотехнология – биологические агенты, технология, аппаратура. – Рига, 1987.
12. **Воробьева Л. И.** Техническая микробиология. – М., 1987.
13. **Воробьева Л. И.** Промышленная микробиология. – М., 1989.
14. **Готшалк Г.** Метаболизм бактерий. – М., 1982.
15. **Деймен А., Соломон Н.** Промышленная микробиология. – М., 1984.
16. **Заварзин Г. А.** Микробиология – двадцатому веку. – М., 1981.
17. **История** биологии с древнейших времен до начала XX века /под ред. С. Р. Микулинского. – М., 1972.
18. **История** биологии с начала XX в. до наших дней /под ред. Л. Я. Бляхера. – М., 1975.
19. **Лиепиньш Г. К., Дунце М. Э.** Сырье и питательные субстраты для промышленной биотехнологии. – Рига, 1986.
20. **Мосичев М. С., Складнев А. А., Котов В. Б.** Общая технология микробиологических производств. – М., 1982.
21. **Перт С. Дж.** Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М., 1978.
22. **Плановский А. Н., Николаев П. И.** Процессы и аппараты химической и нефтехимической технологии. – М., 1985.
23. **Попова Т. Е.** Развитие биотехнологии в СССР. – М., 1988.
24. **Прескот С., Дэн С.** Техническая микробиология. – М., 1952.
25. **Промышленная микробиология** / под ред. Н. С. Егорова. – М., 1989..
26. **Работнова И. Л., Позмогова И. Н.** Хемостатное культивирование и ингибирование микроорганизмов. – М., 1979.
27. **Сассон А.** Биотехнология: свершения и надежды. – М., 1987.
28. **Biotechnology.** / Ed. by H.-J. Rehm, G. Reed. Weinheim, 1983.

К главе 2.

1. **Андрусенко М. Я., Минина В. С., Безбородов А. М. и др.** Получение белка пищевого назначения на основе новых сырьевых источников. – М., 1979.
2. **Безбородов А. М.** Биохимические основы микробиологического синтеза. – М., 1984.
3. **Безбородов А. М., Астапович Н. И.** Секреция ферментов у микроорганизмов. – М., 1982.
4. **Березовский В. М.** Химия витаминов. – М., 1973.
5. **Бекер В. Ф., Бекер М. Е.** Лизин микробного синтеза. – Рига, 1974.
6. **Биосинтез аминокислот микроорганизмами.** / Рубан Е. А. и др. – М., 1968.
7. **Быков В. А., Манаков М. Н., Панфилов В. И., Свитцов А. А., Тарасова Н. В.** Производство белковых веществ / Биотехнология, под ред. Н. С. Егорова и В. Д. Самуилова; т. 5. – М., 1987.
8. **Быков В. А., Крылов И. А., Манаков М. Н. и др.** Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. / Биотехнология, под ред. Н. С. Егорова и В. Д. Самуилова; т. 6. – М., 1987.
9. **Букин В. Н.** Микробиологический синтез витаминов. – М., 1972.
10. **Викторов П. И.** Опыт применения продуктов микробиологического синтеза в кормопроизводстве. – М., 1979.
11. **Воробьева Л. И.** Пропионовокислые бактерии и образование витамина В₁₂. – М., 1976.
12. **Воробьева Л. И.** Техническая микробиология. – М., 1987.
13. **Воробьева Л. И.** Промышленная микробиология. – М., 1989.
14. **Волова Т. Г., Терсков И. А., Сидько Ф. Я.** Микробиологический синтез на водороде. – Новосибирск, 1985.
15. **Григорян А. Н., Горская Л. А.** Биосинтез на природном газе. – М., 1975.
16. **Егоров Н. С.** Основы учения об антибиотиках. – М., 1986.
17. **Ермольева З. В., Вайсберг Г. Е.** Стимуляция неспецифической резистентности организмов и бактериальные полисахариды. – М., 1976.
18. **Карклиньш Р. Я., Пробок А. К.** Биосинтез органических кислот. – Рига, 1972.
19. **Лобанок А. Г., Бабицкая В. Г.** Микробиологический синтез белка на целлюлозе. – Минск, 1986.
20. **Малашенко Ю. Р., Романовская В. А., Троценко Ю. А.** Метанооксиляющие микроорганизмы. – М., 1978.
21. **Малков М. А.** Технология хлебопекарских и кормовых дрожжей. – М., 1962.
22. **Мосичев М. С., Складнев А. А., Котов В. Б.** Общая технология микробиологических производств. – М., 1982.
23. **Подгорский В. С.** Физиология и метаболизм метанол-усваивающих дрожжей. – Киев, 1982.
24. **Покровский А. А.** Роль биохимии в развитии науки о питании. – М., 1974.
25. **Производство антибиотиков.** / под ред. С. М. Навашина. – М., 1970.
26. **Промышленная микробиология.** / под ред. Н. С. Егорова. – М., 1989.
27. **Рубан Е. А.** Микробные липиды и липазы. – М., 1977.
28. **Феофилова Е. П.** Пигменты микроорганизмов. – М., 1978.
29. **Rehm H. J.** Industrielle Mikrobiologie Berlin; Heiderberggerge; New York, 1980.

К главе 3

1. **Биокатализ.** / под ред. И. В. Березина. – М., 1984.
2. **Биотехнология.** / под ред. А. А. Баева. – М., 1984.
3. **Введение** в прикладную энзимологию. / под ред. И. В. Березина, К. Мартинека. – М., 1982.
4. **Грачева И. М.** Технология ферментных препаратов. – М., 1975.
5. **Иммобилизованные** клетки и ферменты. / под ред. Дж. Вудворда. М., 1988.
6. **Иммобилизованные** ферменты. / под ред. И. В. Березина и др. – М., 1976.
7. **Инженерная** энзимология. / И. В. Березин, А. А. Клесов, В. К. Швадос и др. М., 1987.
8. **Биотехнология** в 8 тт. / под ред. Н. С. Егорова и В. Д. Самуилова. М., 1987.
9. **Калуныц К. А., Голгер Л. И.** Микробные ферментные препараты. М., 1979.
10. **Кощеенко К. А.** Иммобилизованные клетки. / Сер. Микробиология. Итоги науки и техники. М., 1981.
11. **Кулис Ю. Ю.** Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. Вильнюс, 1981.
12. **Диксон М., Уэбб Э.** Ферменты. М., 1966.
13. **Химическая** энзимология. / под ред. И. В. Березина. М., 1980.
14. **Техническая** биохимия. / под ред. В. Л. Кретовича. М. 1973.
15. **Угарова Н. Н., Бровко Л. Ю.** Билюминесценция и билюминесцентный анализ. – М., 1981.
16. **Buchholz K.** Reaction engineering parameters for immobilized biocatalysis. Berlin, 1983.
17. **Topics** in enzyme and fermentation biotechnology. / Ed. by A. Wiseman. New York, 1982.

К главе 4

1. **Актуальные** проблемы молекулярной, клеточной и клинической иммунологии. / под ред. Г. И. Марчука и Р. В. Петрова. Итоги науки и техники. Сер. Иммунология. – М., 1983.
2. **Биотехнология.** / под ред. А. А. Баева. – М., 1984.
3. **Биотехнология** растений: культура клеток. / под ред. Р. Диксона. – М., 1989.
4. **Вахтин Ю. В.** Генетическая теория клеточных популяций. – Л., 1980.
5. **Генетическая** инженерия. / под ред. А. А. Баева. Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. – М., 1985.
6. **Глеба Ю. Ю., Сытник К. М.** Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений. – Киев, 1982.
7. **Дебабов В. Г., Гордон И. О., Серегин В. И.** Генная инженерия в производстве биологически активных веществ. – М., 1982.
8. **Катаева Н. В., Бутенко Р. Г.** Клональное размножение растений. – М., 1983.
9. **Методы** генетики соматических клеток. / под ред. Дж. Шей. – М., 1985.
10. **Петров Р. В., Хаитов Р. М., Аталуханов Р. И.** Иммуногенетика и искусственные антитела. – М., 1983.
11. **Промышленная** микробиология и успехи генетической инженерии. / Специальный выпуск журнала «Scientific American». – М., 1984.
12. **Шамина З. Б.** Генетическая изменчивость растительных клеток in vitro. Киев, 1978.

13. **Фролова Л. В.** Особенности популяции растительных клеток. – М., 1981.
14. **Genetic Engineering:** In 6 vol. / Ed. by R. Williamson. London, 1981.
15. **Maniatis T., Fritsch F., Sambrook J.** Molecular cloning: A laboratory manual. New York, 1982.
16. **Rodriguez R., Tait R.** Recombinant DNA techniques: As introduction. London, 1983.

К главе 5

1. **Варфоломеев С. Д.** Конверсия энергии биокаталитическими системами. – М., 1981.
2. **Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н.** Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. – М., 1981.
3. **Мальцев П. М.** Технология бродильных производств. – М., 1980.
4. **Скулачев В. П.** Трансформация энергии в биомембранах. – М., 1972.
5. **Чан Динь Тоай, Хлудова М. С., Панцхава Е. С.** Биогенез метана. / Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. – М., 1983.
6. **Яровенко В. Л., Ровинский Л. А.** Моделирование и оптимизация микробиологических процессов спиртового производства. – М., 1978.
7. **Bioconversion systems.** / Ed. by D. L. Wise. Boca Ration, 1984.
8. **Каравайко Г. А.** Микробиологические процессы выщелачивания металлов из руд. – М., 1984.
9. **Каравайко Г. А., Кузнецов С. И., Голомзик А. И.** Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. – М., 1972.
10. **Полькин С. И., Адамов Э. В., Панин В. В.** Технология бактериального выщелачивания цветных и редких металлов. – М., 1982.

К главе 6

1. **Африкян Э. К.** Энтомопатогенные бактерии и их значение. – Ереван, 1973.
2. **Биология** культивируемых клеток и биотехнология растений, под ред. Р. Г. Бутенко. – М., 1991.
3. **Биотехнология** сельскохозяйственных растений. / под ред. С. Мантеля. – М., 1987.
4. **Биотехнология** растений: культура клеток. / под ред. Дж. Диксона. – М., 1989.
5. **Вейзер Я.** Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. – М., 1972.
6. **Гулий В. В., Иванов Г. М., Штерншис М. В.** Микробиологическая борьба с вредными организмами. – М., 1982.
7. **Дорогойченко Н. И., Фрейман В. Б.** Новые формы микробных инсектицидов и методы их применения. – М., 1982.
8. **Доронский Л. М.** Клубеньковые бактерии и нитрагин. – Л., 1970.
9. **Евляхова А. А.** Энтомопатогенные грибы. – Л., 1974.
10. **Ильичева С. Н., Кононова Э. В.** Получение и применение грибных инсектицидов. – М., 1984.
11. **Катаева Н. В., Бутенко Р. Г.** Клональное микроразмножение растений. М., 1983.
12. **Культура клеток растений.** / под ред. Р. Г. Бутенко. М., 1986.
13. **Мишустин Е. Н.** Микроорганизмы и продуктивность земледелия. – М., 1972.

14. **Мишустин Е. Н., Шильников В. К.** Биологическая фиксация молекулярного азота. – М., 1968.
15. **Орловская Е. В., Шумова Т. А.** Вирусные препараты для борьбы с насекомыми – вредителями сельского хозяйства и леса. – М., 1980.
16. **Пирузян Э. П.** Основы генетической инженерии растений. – М., 1988.
17. **Солдатова А. В., Шумова Т. А.** Культура клеток насекомых и ее использование для получения вирусных и энтомопатогенных препаратов. – М., 1983.
18. **Тарасевич Л. М.** Вирусы насекомых служат человеку. – М., 1985.
19. **Хотянович А. В., Чиканова В. М., Бочаров В. В.** Эффективность различных методов инокуляции бобовых растений препаратами клубеньковых бактерий. – М., 1982.
20. **Шильникова В. К., Серова Е. Я.** Микроорганизмы – азотонакопители на службе растений. – М., 1983.

К главе 7

1. **Варежкин Ю. М., Михайлова А. И., Терентьев А. М.** Методы интенсификации процесса биологической очистки сточных вод. – М., 1987.
2. **Голубовская Э. К.** Микроорганизмы очистных сооружений. – Л., 1975.
3. **Гюнтер Л. И., Агранник Р. Я., Гольдфарб Л. Л.** Сбраживание осадков городских сточных вод в метанотенках. – М., 1986.
4. **Данилович Д. Л., Монгайт А. И.** Анаэробная очистка концентрированных сточных вод. – М., 1989.
5. **Евилевич М. А., Брагинский Л. Н.** Оптимизация биохимической очистки сточных вод. – Л., 1979.
6. **Кузьменкова А. М.** Использование компостов из твердых бытовых отходов. – М., 1976.
7. **Мельдер Х. А., Пааль Л. Л.** Малогабаритные канализационные очистные установки. – М., 1987.
8. **Очистка производственных сточных вод.** / С. Л. Яковлев, Я. А. Карелин, Ю. М. Ласков, Ю. В. Воронов. – М., 1979.
9. **Ротмистров М. Н., Гвоздяк П. И., Ставская С. С.** Микробиологическая очистка воды. – Киев, 1978.
10. **Тавартниладзе И. М., Клепикова В. В.** Очистка сточных вод на биофильтрах. – Киев, 1983.
11. **Туровский И. С.** Обработка осадков сточных вод. – М., 1988.
12. **Экологическая биотехнология.** / под ред. К. Ферстера и Д. Вейза. – Л., 1990.
13. **Яковлев С. В., Воронов Ю. В.** Биологические фильтры. – М., 1982.
14. **Bellmany W. D.** The use of microbiological agents in upgrading waste for feed and food. – London, 1983.

Оглавление

Введение	5
Глава 1. НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	8
1.1. БИОТЕХНОЛОГИЯ – НОВАЯ КОМПЛЕКСНАЯ ОТРАСЛЬ	8
1.2. ИСТОРИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ФОРМИРОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	9
1.3. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ.....	16
1.4. ЭЛЕМЕНТЫ, СЛАГАЮЩИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ	21
1.5. КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССОВ.....	32
1.6. КОНТРОЛЬ И УПРАВЛЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ; МОДЕЛИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ	35
Глава 2. ПРОМЫШЛЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: ПРОЦЕССЫ ПРОИЗВОДСТВА ПОЛЕЗНЫХ ВЕЩЕСТВ	39
2.1. БЕЛОК ОДНОКЛЕТОЧНЫХ	39
Субстраты I-го поколения – углеводы	42
Субстраты II-го поколения – жидкие углеводороды.....	45
Субстраты III-го поколения – оксиды углеводородов, газообразные углеводороды, углекислота, водород.....	48
2.2. АМИНОКИСЛОТЫ.....	53
Технология получения глутаминовой кислоты	57
Технология получения лизина	60
Технология получения триптофана	63
2.3. ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ.....	66
Получение лимонной кислоты.....	68
Получение молочной кислоты	72
Получение уксусной кислоты	73
Получение пропионовой кислоты	75
Получение итаконовой кислоты	75
Получение глюконовой кислоты	76
Получение фумаровой кислоты	77
2.4. ВИТАМИНЫ	77
Получение витамина В ₁₂	78
Получение витамина В ₂	79
Получение эргостерина	80
2.5. БИОПОЛИМЕРЫ.....	81
Полисахариды.....	81
Технология получения декстранов.....	83
Ксантан	84

Альгинат.....	84
Курдлан.....	85
Пуллан.....	85
Склероглюкан.....	85
Микробные полиоксикалкоанаты.....	86
2.6. АНТИБИОТИКИ.....	89
Глава 3. ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ.....	96
3.1. ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ.....	96
3.2. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ.....	105
3.3. ПРОЦЕССЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ.....	111
Иммобилизованные ферменты в пищевой промышленности.....	113
Использование иммобилизованных ферментов в тонком органическом синтезе.....	116
3.4. ФЕРМЕНТЫ В МИКРОАНАЛИЗЕ.....	117
Глава 4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ.....	122
4.1. МЕТОДЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ.....	122
Получение генов.....	125
Конструирование рекомбинантных ДНК.....	127
Перенос генов в клетки организма-реципиента.....	128
Скрининг и отбор рекомбинантных клеток.....	129
4.2. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ПРОМЫШЛЕННО ВАЖНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ.....	130
Получение рекомбинантного инсулина.....	132
Биосинтез соматотропина.....	134
Получение интерферонов.....	135
4.3. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ.....	137
Глава 5. ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ БИОЭНЕРГЕТИКА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА МИНЕРАЛЬНОГО СЫРЬЯ.....	143
5.1. БИОЭНЕРГЕТИКА.....	143
Биометаногенез.....	145
Получение спирта.....	152
Жидкие углеводороды.....	155
Биологическое получение водорода.....	157
Биотопливные элементы и биоэлектрокатализ.....	162
5.2. БИОГЕОТЕХНОЛОГИЯ МЕТАЛЛОВ.....	164
Бактериальное выщелачивание.....	164
Биосорбция металлов из растворов.....	174
Обогащение руд.....	176
Глава 6. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АЛЬТЕРНАТИВЫ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ.....	177
6.1. БИОПЕСТИЦИДЫ.....	177

Бактериальные препараты	179
Грибные препараты	184
Вирусные препараты	187
6.2. БИОГЕРБИЦИДЫ	189
6.3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ УДОБРЕНИЯ	190
Технология получения азотных биоудобрений	190
Снабжение растений фосфатами	195
6.4. НОВЕЙШИЕ МЕТОДЫ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ	197
Культура растительных клеток и тканей	197
Техника слияния протопластов: гаплоидные растения	205
Генетическая инженерия растений	207
Глава 7. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ	209
7.1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЧИСТКИ СТОКОВ	210
Аэробные процессы очистки сточных вод	212
Анаэробные процессы очистки стоков	221
7.2. УТИЛИЗАЦИЯ ТВЕРДЫХ ОТХОДОВ	224
7.3. БИООЧИСТКА ГАЗОВОЗДУШНЫХ ВЫБРОСОВ	227
7.4. БИОДЕГРАДАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ	234
Заключение	241
Литература	246