

Приложение 3

**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова»**

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

краткий курс лекций

для магистров I курса

Направление подготовки
19.04.01 Биотехнология

Магистерская программа
Пищевая биотехнология

Саратов 2016

УДК 60:606:60-7

ББК 28

К-21

Биотехнология получения белков и биологически активных веществ: краткий курс лекций для студентов I курса направления подготовки 19.04.01 «Биотехнология» / Сост.: Л.В. Карпунина // ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова. – Саратов, 2016. – 87 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Биотехнология получения белков и биологически активных веществ» составлен в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначен для магистрантов направления подготовки 19.04.01 «Биотехнология». Краткий курс лекций содержит теоретический материал по строению и свойствам белков и биологически активных веществ, биохимии и физиологии биологических объектов продуцентов белков и биологически активных веществ, создания производственных процессов получения белков и биологически активных веществ.

© Карпунина Л.В.
© ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ
им. Н.И. Вавилова, 2016

ВВЕДЕНИЕ

Краткий курс лекций по дисциплине «Биотехнология получения белков и биологически активных веществ» предназначен для магистрантов по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология». Он включает в себя введение в промышленную биотехнологию получения первичных и вторичных метаболитов - белков и биологически активных веществ (ферменты, витамины, гормоны и т.д.), знакомит с организацией биотехнологического процесса их получения. Курс направлен на формирование ключевых компетенций, необходимых для решения профессиональных задач и организации профессиональной деятельности на основе глубокого и всестороннего изучения биотехнологических и биоинженерных проблем.

Лекция 1

ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

1.1. Первичные и вторичные метаболиты

Все живые организмы на нашей планете образуют различные соединения первичного метаболизма, такие, как углеводы, белки, липиды, витамины и другие вещества, необходимые для роста и развития. Их содержание и состав зависит от генетических характеристик объектов, стадии онтогенеза и условий произрастания.

Помимо первичных метаболитов, у некоторых организмов (преимущественно растений) осуществляется синтез так называемых вторичных метаболитов, к которым относятся алкалоиды, терпеноиды, стероиды, фенольные соединения, цианогенные гликозиды и др. Эти низкомолекулярные вещества во многих случаях характерны для определенных видов растений, а их синтез в значительно большей степени видоспецифичен, чем синтез первичных метаболитов.

Все это свидетельствует о чрезвычайном разнообразии соединений, образуемых живыми организмами. Многие из них имеют важное народнохозяйственное значение и поэтому являются целевыми продуктами биотехнологических производств.

Обмен веществ клетки подчиняется сложнейшей системе регуляции. Задачей же биотехнолога является обеспечение сверхсинтеза необходимых для практических целей продуктов метаболизма, что достигается путем изменения как регуляторных систем метаболизма, так и генетических программ.

1.2. Основные методы и подходы, используемые в промышленной биотехнологии

Как мы уже говорили, биотехнология - это целенаправленное получение ценных продуктов за счет использования биохимической деятельности микроорганизмов, изолированных клеток или их компонентов.

Преимущества биотехнологических производств:

- возможность получения специфичных и уникальных природных веществ, часть из которых (например, белки, ДНК) еще не удается получать другим путем (например, химическим синтезом);
- проведение биотехнологических процессов при относительно невысоких температурах и давлениях;
- высокие скорости роста и накопления биомассы;
- использование в качестве сырья дешевых отходов сельского хозяйства и промышленности;
- биотехнологические процессы обычно экологичны, дают меньше вредных отходов и близки к протекающим в природе естественным процессам;
- технология и аппаратура биотехнологических производств просты, а также недороги.

Продукты биотехнологии получают по индивидуальным технологиям, используя для этого определенные биологические агенты, сырье, число стадий производства и их технологические режимы, которые могут сильно варьировать. И то же время для всех биотехнологических производств существует типовая схема.

К определяющим факторам биотехнологического процесса относят:

- вид используемого биотехнологического процесса;
- субстрат с его биохимическими и биофизическими характеристиками;
- аппаратуру, включая систему контроля управления; технологический режим и соответствие требованиям ГОСТа.

Промышленный биотехнологический процесс, в котором производства коммерческих продуктов используют клеточные системы или микроорганизмы, обычно включает три *ключевые стадии*:

- подготовительную (обработка сырья, используемого в качестве источника питательных веществ, и приготовление, если это необходимо, питательных сред);
- биотехнологическую (рост микроорганизмов-мишеней Миом - обычно объемом более 100 л - биореакторе (ферментация) с последующим образованием нужного метаболита, например антибиотика, аминокислоты или белка (биотрансформация));
- получение готовой продукции (очистка целевого продукта от компонентов культуральной среды или от клеточной массы).

Подготовительная стадия необходима для приготовления сырья, используемого в биотехнологическом процессе. В зависимости от целевого продукта, при этом предусматриваются:

- *приготовление среды*, включающей необходимые компоненты питания для организмов, и ее стерилизация (для асептических биотехнологических процессов, при которых нежелательно попадание посторонней микрофлоры);
- *подготовка и стерилизация газов* (обычно воздуха) путем очистки от пыли, влаги и присутствующих в воздухе микроорганизмов, включая споры;
- *подготовка посевного материала*, в том числе культивирование микроорганизмов, изолированных клеток растений или животных;
- *подготовка биокатализатора* - либо фермента в свободном или закрепленном на носителе виде, либо биомассы микроорганизмов, выращенных до состояния, в котором проявляется их ферментативная активность;
- *предварительная обработка сырья*, если оно поступает в непригодном для непосредственного использования биотехнологическом процессе виде. Например, при получении спирта пшеницу сначала дробят, а затем подвергают ферментативному процессу «осахаривания». Другой пример использование древесины для получения дрожжей: ее сначала измельчают, а затем подвергают нагреву до 200 °С в кислой среде. В результате кислотного гидролиза происходит превращение древесины в раствор глюкозы и лигнин. Раствор глюкозы (гидролизат) как раз и используют в биотехнологическом процессе для получения кормовых дрожжей.

Биотехнологическая стадия - основная в биотехнологическом производстве. Именно на этой стадии с использованием того или иного биологического агента (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов или клеточных органелл) происходит преобразование сырья в тот или и целевой продукт.

Главной целью является получение определенного органического вещества. Однако биотехнологическая стадия, как правило, включает не только синтез новых органических соединений, но и ряд других биотехнологических процессов, таких, как:

- *ферментация* - процесс, осуществляемый с помощью ферментов культивируемых

микроорганизмов:

- *биотрансформация* - процесс изменения химической структуры вещества под действием ферментативной активности клеток или готовых ферментов;
- *биокатализ* - химические превращения вещества, протекающие с использованием биокатализаторов-ферментов;
- *биоокисление* - окисление загрязняющих веществ с помощью микроорганизмов или ассоциации микроорганизмов в аэробных условиях;
- *метановое брожение* - переработка органических отходов с помощью ассоциации метаногенных микроорганизмов в анаэробных условиях;
- *биокомпостирование* - снижение содержания вредных органических веществ в твердых отходах;
- *биосорбция* - сорбция вредных примесей из газов или жидкостей (обычно осуществляется закрепленными на специальных твердых носителях микроорганизмами);
- *бактериальное выщелачивание* - процесс перевода нерастворимых в воде соединений металлов в растворенное состояние под действием специальных микроорганизмов;
- *биодegradация* - разрушение вредных соединений, осуществляемая микроорганизмами-биодеструкторами.

Обычно биотехнологическая стадия завершается выходом одного жидкостного и одного газового потоков, иногда - только одного жидкостного или переработанного твердого продукта, например при созревании сыра или биокомпостировании отходов.

Получение готовой продукции - заключительная стадия технологического процесса биотехнологического производства. Чаще всего целевой продукт находится либо в самой биомассе, либо в жидкости. В зависимости от свойств биомассы и жидкости, для их разделения могут быть использованы различные методы:

- *отстаивание* - разделение под действием гравитационных сил (обычно при очистке сточных вод);
- *фильтрация* - пропускание суспензии через фильтрующий материал, на котором задерживаются частицы твердой фазы - биомасса. Такой способ применяют в производстве антибиотиков, особенно в тех случаях, когда микроорганизм-продуцент имеет мицелиальный характер;
- *сепарация, центрифугирование* - разделение под действием центробежных сил. Наиболее часто используют для отделения дрожжей или бактерий в производстве кормовой биомассы;
- *микрофильтрация, ультрафильтрация* - пропускание суспензии через мембраны с весьма малым размером пор, обеспечивающее удержание клеток микроорганизмов на мембране и получение чистого раствора. При ультрафильтрации отделяются не только клетки, но и крупные молекулы растворенных веществ;
- *коагуляция* - добавление в суспензию реагентов, способствующих образованию и осаждению более крупных клеточных частиц и отделению их от жидкости методом отстаивания;
- *флотация* - захват микроорганизмов пузырьками пены и выделение их из пенной фракции.

Целевые продукты биосинтеза могут быть внеклеточными и внутриклеточными. Для внутриклеточных продуктов сначала необходимо разрушить оболочку клеток. Это

можно осуществить *дезинтеграцией клеток*, разрушив клеточную оболочку физическими методами (с помощью мелющих тел, путем замораживания и продавливания, воздействием ультразвуком, методом декомпрессии - резкого сброса давления) или химическими и биотехнологическими методами. Используют также *гидролиз* (разрушение клеточных оболочек под действием химических реагентов и температуры), *ферментолиз* (разрушение клеточных оболочек под действием ферментов при повышенной температуре) или *автолиз* (разновидность ферментолиза, когда используют собственные ферменты клетки).

После проведения какой-либо из вышеперечисленных операций дальнейшее выделение целевого продукта осуществляют методами, общими для внеклеточных и внутриклеточных продуктов. Основными из них являются:

- *экстракция* - переход целевого продукта из водной фазы в не смешивающуюся с водой органическую жидкость (экстрагент). Наиболее известно выделение жироподобных веществ жидкими углеводородами (типа бензина). Применяют и многие другие виды экстрагентов (хлороформ, эфир, бутилацетат). Иногда экстракцию осуществляют непосредственно из биомассы микроорганизмов;

- *осаждение* - выделение целевого продукта путем добавления к жидкости реагента, взаимодействующего с растворенным продуктом и переводящего его в твердую фазу;

- *адсорбция* - перевод растворенного в жидкости продукта в твердую фазу путем его сорбции на специальных твердых носителях (сорбентах);

- *ионный обмен* - в твердую фазу переходят ионы (катионы или анионы), а не молекула целевого продукта или примеси;

- *отгонка, ректификация* - выделение растворенных в культуральной жидкости легкокипящих продуктов, например этилового спирта;

- *ультрафильтрация, нанофильтрация и обратный осмос* - выделение высокомолекулярных соединений (белков, полипептидов, полинуклеотидов). Обратный осмос и нано-фильтрация позволяют отделять даже небольшие по размеру молекулы;

- *центрифугирование, ультрацентрифугирование* - выделение вирусов, клеточных органелл, высокомолекулярных соединений.

Очистка необходима для получения биопродуктов высокой степени чистоты. Основной целью является удаление примесей, что достигается с помощью экстракции, адсорбции, ионного обмена, ультрафильтрации, обратного осмоса, ректификации и ферментолиза, которые были рассмотрены ранее. Кроме перечисленных, используют и другие процессы, такие, как:

- *хроматография* - процесс, напоминающий адсорбцию. На твердом сорбенте собираются растворенные вещества, часто близкие по структуре (например, смеси белков, нуклеотидов, сахаров, антибиотиков). При адсорбции они десорбируются вместе, а вот при хроматографии они выделяются из сорбента как бы по очереди, что позволяет разделить их друг от друга;

- *диализ* - процесс, в котором через полупроницаемую пленку могут проходить низкомолекулярные вещества, а высокомолекулярные остаются. Путем диализа осуществляют очистку вакцин и ферментов от солей и низкомолекулярных растворимых примесей;

- *кристаллизация* - процесс, основанный на различной растворимости веществ при разных температурах. Медленное охлаждение позволяет формировать кристаллы из

растворов целевых продуктов, причем чистота их обычно очень высока. Таким образом, например, получают кристаллы пенициллина. Можно даже получить еще более чистый продукт, если кристаллы растворить в воде или растворителе, а потом снова кристаллизовать (т. е. провести процесс *перекристаллизации*).

Концентрирование продукта повышает его выход. Известно, что после биотехнологической стадии содержание продукта обычно составляет примерно 0,1-1 %, после стадии отделения биомассы - 0,1-2 %, после стадии выделения - 1-10 %, после стадии очистки - 50-80 % и, наконец, после стадии концентрирования - 90-100 %.

На стадии концентрирования применяют такие процессы, как выпаривание, сушка, осаждение, кристаллизация, фильтрация, ультрафильтрация, гиперфильтрация или нанофильтрация, обеспечивающие как бы отжим растворителя из раствора.

Получение готовой формы продукта завершает биотехнологическое производство. Продукт приобретает товарную форму за счет проведения процессов *гранулирования* (формирование гранул из порошка или прямо из раствора), *дражжирования*, *таблетирования* (формирование драже, таблеток), *розлива* или *фасовки*, *ампулирования* (затаривания в ампулы).

Вопросы для самоконтроля

- 1) Какие соединения относятся к первичным и вторичным метаболитам?
- 2) Перечислите определяющие факторы биотехнологического процесса.
- 3) Назовите основные стадии биотехнологического процесса и методы, используемые на этих стадиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.

Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.

2. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162с.

3. *Блинов, В.А.* Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: Полиграфия Поволжья, 2003. – 196 с.

4. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах / В.А. Блинов. – Саратов: Гарнитура Таймс, 2008. – 102 с.
5. *Волова, Т.Г.* Биотехнология: электронное издание, ссылка доступа: <http://polnotext.ru/volova-t-g-biotechnologiya/volova-t-g-biotechnologiya-glava-2-promishlennaya-mikrobiologiya-protsessi-proizvodstva-poleznich-veschestv>
6. *Живухина, Е.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для высших учебных заведений / Е.А. Живухина, Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 506 с.
7. *Кузьмина, Н.А.* Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Электронное издание, 2010.
8. *Орехов, С.Н.* Биотехнология: учебное пособие / С.Н. Орехов, Ю.О. Сазыкин, И.И. Чакалева. – М.: Электронное издание, 2006.
9. *Сазыкин Ю.О.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

Лекция 2

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И ПРОДУКТЫ ПРОМЫШЛЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ

2.1. Биотехнологическое оборудование, условия культивирования

Для культивирования различных биологических объектов, в том числе микроорганизмов и культур клеток, в зависимости от поставленных задач используют различное технологическое оборудование. Это могут быть качалки роллеры - при лабораторных исследованиях, биореактор и ферментеры - при промышленных производствах.

В лабораторных условиях часто используют качалки и роллерные установки, вращение которых предотвращает седиментацию (осаждение) клеток и обеспечивает достаточную концентрацию растворенного кислорода. В большинстве случаев скорость вращения составляет 50-120 об/мин для круговых качалок и 1-20 об/мин - для роллерных установок. Несмотря на различные способы перемешивания клеточных культур, отличия в продуктивности и росте клеток незначительны.

Промышленное выращивание клеток растений осуществляют в биореакторах или ферментерах. Их подразделяют на две группы: по конструкции и по принципу перемешивания культуральной жидкости.

В биореакторах, относящихся к *первой группе*, перемешивание клеток происходит путем аэрирования воздухом. Это *барботажный* тип биореактора, при котором процесс перемешивания суспензии осуществляется поднимающимися пузырьками воздуха. В случае барботажных биореакторов обычно получают хорошие ростовые характеристики для большого числа клеточных культур. Однако сложность поддержания суспензии в гомогенном состоянии при высоких концентрациях биомассы клеток сужает сферу их применения.

Несколько больших значений максимальной концентрации клеточной биомассы можно достичь при применении *эрлифтных* биореакторов, в которых создаются направленные циркуляционные потоки. В эрлифтных биореакторах перемешивание суспензии осуществляется за счет применения специальной конструкции, создающей градиент плотности (как правило, это конструкция с внутренним цилиндром).

Вторая группа биореакторов представляет собой аппараты с применением *механических перемешивающих устройств*. Биореакторы этого типа позволяют изучать растительные клеточные популяции в очень широком диапазоне концентраций биомассы клеток. Вместе с тем стрессовое воздействие перемешивающего устройства на клеточную популяцию часто ограничивает их применение.

Выращивание растительных клеточных культур и микроорганизмов в биореакторах можно проводить в режимах периодического и проточного (непрерывного) культивирования

Периодическое культивирование - это аналог выращивания клеточных культур в колбах на качалке. Периодическую культуру можно рассматривать как замкнутую систему, которая в своем развитии проходит четыре фазы начальную, экспоненциальную,

стационарную и отмирания. Условия существования культуры во всех этих фазах различны.

Проточное (непрерывное) культивирование характеризуется постоянным добавлением в биореактор свежей и питательной среды и постоянным отбором либо суспензии (*закрытое проточное культивирование*), либо отработанной среды (*закрытое проточное культивирование*). Непрерывная культура представляет собой открытую систему стремящуюся к установлению динамического равновесия. Для организмов создаются неизменные условия среды. Проточное культивирование конструктивно более сложно и поддается автоматическому регулированию, так как связано с введением в схему биореактора дополнительных устройств (перистальтических насосов, разделительных устройств и др.).

В периодической культуре условия все время меняются: плотность культуры возрастает, а концентрация субстрата уменьшается. Однако очень часто требуется, чтобы клетки могли долгое время находиться в фазе экспоненциального роста при постоянной концентрации субстрата в неизменных прочих условиях. Этого можно достичь, если в сосуд, содержащий культуру клеток, непрерывно вводить новый питательный раствор и одновременно удалять из него соответствующее количество клеточной суспензии.

Применение проточных сред при культивировании тканей обеспечивает динамичность и большее постоянство условий их питания. Преимущество проточной питательной среды над непроточными твердой и жидкой средами наблюдалось при выращивании незрелых зародышей. Сложность методического и технического обеспечения проточности питательных сред в процессе выращивания, очевидно, является причиной того, что эти среды еще не нашли широкого применения. Однако моделирование условий питания при проточности питательной среды стоит ближе к нативным условиям. Это преимущество, по-видимому, будет учитываться при дальнейшем совершенствовании условий питания в культуре тканей.

В практике микробиологических исследований широко применяют две разновидности открытого проточного культивирования: хемостатный и турбидостатный методы.

Хемостатный метод культивирования клеток базируется на использовании биореактора, в который с постоянной скоростью подается питательная среда и одновременно с той же скоростью (например, слив по уровню) отбирается клеточная суспензия. При этом объем выращиваемой суспензии остается постоянным. Хемостат состоит из сосуда-культиватора, в который из особого резервуара поступает с постоянной скоростью питательный раствор. Благодаря аэрации и механическому перемешиванию, в культиваторе создаются оптимальные условия для снабжения клеток кислородом и более быстрого и равномерного распределения питательных веществ, поступающих с новыми порциями раствора. Рост культуры в хемостате контролируется концентрацией субстратов. На таком ограничении скорости роста концентрацией одного из необходимых субстратов основана стабильность системы.

Турбидостатный метод предусматривает измерения концентрации клеточной биомассы в биореакторе и ее автоматическое поддержание на постоянном уровне путем измерения скорости потока. Работа турбидостата основана на поддержании по-

стоянной плотности суспензии, или постоянной мутности. Датчик мутности регулирует через управляемую систему поступление питательного раствора. В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, и скорость роста культуры приближается к максимальной. Турбидостат используют при скоростях потока близких к максимальной удельной скорости роста, тогда как хемостат иногда становится неустойчивым и может произойти полное вымывание культуры из биореактора. Работа с турбидостатами технически сложнее, чем с хемостатами.

Хемостатный метод культивирования позволяет выделять фактор (чаще всего концентрацию ростлимитирующего компонента питательной среды), определяющий физиолого-биохимическое состояние клеточной популяции. Так, было показано, что удельная скорость роста популяции клеток *Acer pseudoplatanus L.* может контролироваться концентрацией нитрата в питательной среде согласно соотношению определенному Ж. Л. Моно для бактерий.

В то же время в условиях хемостатного выращивания не всегда удается поддерживать в течение продолжительного времени стационарное состояние культур растительных клеток. Например, культура клеток табака, выросшая в условиях хемостата на стандартной питательной среде для пенициллинового выращивания, после одной-двух недель темнела и лизировалась. Только после увеличения концентрации компонентов в среде удалось получить (в условиях хемостата) стабильное состояние культуры клеток в течение 73 суток. Следовательно, для поддержания стабильно пролиферирующей культуры необходимо обеспечивать достаточно высокую концентрацию компонентов питательной среды.

Наряду с лимитирующей концентрацией субстрата, на развитие суспензионной культуры растительных клеток, растущей в условиях хемостата, значительное влияние оказывает и скорость протока суспензии. Ее увеличение выше максимальной удельной скорости роста клеток приводит к вымыванию культуры из биореакторов. Поэтому данный метод непригоден для изучения медленно растущих (медленно делящихся) клеточных популяций.

Новые возможности изучения физиолого-биохимического состояния клеточной популяции появляются при использовании «закрытого протока», когда не происходит удаления клеточной биомассы. При этом питательная среда добавляется в биореактор постоянно, и с той же скоростью из него удаляется бесклеточная культуральная жидкость. Данный режим выращивания растительных клеток правильнее было бы называть закрытым по биомассе протоком, однако обычно употребляют термин «закрытый проток», несмотря на его формальную нелогичность.

В заключение отметим преимущества и недостатки периодических и полупериодических процессов ферментации.

Преимущества:

- малая стоимость аппарата и системы управления; гибкость, т. е. возможность наработки в одном биореакторе разных продуктов;
- время культивирования можно произвольно менять;
- процесс менее подвержен инфицированию, мутациям клеток вследствие отсут-

ствия протока и притока из-за относительно малого времени ферментации;

- процесс удобен для получения малых количеств продукта;
- условия культивирования можно поддерживать в оптимуме как в фазе роста биомассы, так и в фазе биосинтеза продуктов, причем оптимальные условия для биомассы и продукта могут быть различны;
- процесс удобен для реализации биосинтеза вторичных метаболитов.

Недостатки:

- необходимость приготовления посевного материала;
- велико непродуктивное время ферментации;
- в связи с частой стерилизацией быстрее изнашиваются измерительные приборы, особенно датчики величины рН;
- производительность по биомассе и продукту часто ни же, чем при непрерывном процессе.

2.2. Продукты биотехнологии и блок-схемы их производств

Продукты, получаемые биотехнологическими способами, отличаются не только по цвету, вкусу, запаху или химическому составу, но и по тому, какое место в типовой технологической схеме они занимают.

Продуктами биотехнологического производства могут быть:

1. Газы - со стадии ферментации (диоксид углерода - при спиртовом производстве, биогаз - при переработке отходов путем метанового брожения, водород - при культивировании фототрофов).

2. Среда ферментации - культуральная жидкость вместе с микроорганизмами (например, кефир, йогурт) или твердый субстрат (например, сыр или ферментированная с заквасками колбаса).

3. Жидкость (осветленная, надосадочная, нативный раствор, фильтрат, угат, пермеат или супернатант), полученная после отделения биомассы, или ее концентрат. Готовые продукты на этой основе - пиво, вино, квас. Концентрат культуральной жидкости обычно получают выпариванием или высушиванием (например, кормовой лизин или кормовые антибиотики).

4. Биомасса инактивированная (например, кормовые дрожжи, которые на завершающих стадиях подвергают тепловой стерилизации).

5. Биопрепарат - жизнеспособная биомасса микроорганизмов в жидком или высушенном виде (пекарские дрожжи, бактериальные средства защиты растений, деструкторы нефтяных загрязнений, бактериальные удобрения, силосные закваски и т.п.).

6. Ослабленная биомасса микроорганизмов (например, живые вакцины, полученные при обработке клеток патогенных микроорганизмов тепловыми воздействиями или химическими реагентами для снижения их патогенности).

7. Внеклеточные и внутриклеточные биопродукты. Чрезвычайно разнообразны по своей структуре, могут быть легкокипящей жидкостью (например, этанол, выделяемый из среды отгонкой или ректификацией) или твердым веществом (многие медицинские антибиотики, чистые пищевые или медицинские аминокислоты, лимонная кисло-

та).

8. Переработанная биомасса микроорганизмов - гидролизаты и ферментализаты, используемые как источники кормления для животных или как вкусовые добавки; клеточные оболочки, получаемые после разрушения микроорганизмов и применяемые как сорбент для очистки соков, вина, пищевых жидкостей.

9. Очищенная от загрязнений жидкость (например, при очистке сточных вод) или **твердая среда** (например, почва при микробиологической очистке ее от нефтяных загрязнений).

10. Жидкая среда (культуральная жидкость) с экстрагированными (выщелоченными) из твердой фазы компонентами (например, бактериальное выщелачивание металлов из руд, микробиологическое обессеривание угля и нефти).

Все эти продукты получают по технологическим схемам или блок-схемам, содержащим несколько стадий. В каждом конкретном случае это определяется целевой задачей, а также свойствами микроорганизмов, сырья и самого готового продукта.

Блок-схема - это последовательность технологических стадий биотехнологического производства, необходимых для получения продукта. Рассмотрим несколько примеров блок-схем производства различных продуктов.

Блок-схема *производства биогаза* значительно короче общей типовой схемы и включает подготовительные стадии, стадию метанового брожения и сушку как стадию концентрирования. Компримирование (сжатие) биогаза можно рассматривать как создание его готовой формы.

В *производстве йогурта* предусмотрены две подготовительные стадии, одна биотехнологическая и стадия розлива, представляющая собой приведение продукта к готовой форме.

Процесс *производства хлеба*. Приготовление опары (суспензии муки в воде) аналогично приготовлению среды в биотехнологических производствах. В опару добавляют дрожжи для брожения, затем вновь муку (замес теста) и проводят анаэробный биологический процесс брожения. Далее тесто делят на заготовки, и они уже в третий раз подвергаются воздействию дрожжей в процессе *расстойки*. При этом диоксид углерода, образующийся при брожении, увеличивает объем хлеба и создает его пористость. Стадия выпечки закрепляет полученный результат и превращает, по существу, жидкий полупродукт в твердое тело - хлеб и хлебобулочные изделия.

Приведенные примеры показывают, что биотехнологические производства включают в себя как специфические для биотехнологии стадии (ферментация, биоокисление, биотрансформация, брожение, бактериальное выщелачивание, биокомпостирование, ферментализация, стерилизация среды и воздуха, дезинтеграция микроорганизмов), так и множество стадий, встречающихся в химической технологии (фильтрация, сепарация, отстаивание, экстракция, сушка, выпаривание, ультрафильтрация и обратный осмос, кристаллизация, ректификация, коагуляция и др.). Эти стадии, конечно, имеют свою специфику в биотехнологических производствах в связи с физическими и физико-химическими свойствами биологического объекта, его лабильностью и вариабельностью.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Биотехнологическое оборудование.
- 2) Периодическое и непрерывное культивирование.
- 3) Хемостатный и турбидостатный методы культивирования клеток.
- 4) Перечислите продукты, получаемые в процессе биотехнологического производства.
- 5) Что такое блок-схема?
- 6) Чем отличаются биотехнологические производства от химических?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.

Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.

2. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162с.

3. *Блинов, В.А.* Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: Полиграфия Поволжья, 2003. – 196 с.

4. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах / В.А. Блинов. – Саратов: Гарнитура Таймс, 2008. – 102 с.

5. *Волова, Т.Г.* Биотехнология: электронное издание, ссылка доступа:
<http://polnotext.ru/volova-t-g-biotechnologiya/volova-t-g-biotechnologiya-glava-2-promishlennaya-mikrobiologiya-protsessi-proizvodstva-poleznich-veschestv>

6. *Живухина, Е.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для высших учебных заведений / Е.А. Живухина, Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 506 с.

7. *Кузьмина, Н.А.* Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Электронное издание, 2010.

8. *Орехов, С.Н.* Биотехнология: учебное пособие / С.Н. Орехов, Ю.О. Сазыкин, И.И. Чакалева. – М.: Электронное издание, 2006.

9. *Сазыкин Ю.О.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

Лекция 3

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВ

3.1. Структура белка

Белки, или протеины (что в переводе с греческого означает «первые» или «важнейшие»), количественно преобладают над всеми другими макромолекулами, присутствующими в живой клетке, и составляют более половины сухого веса большинства организмов.

Белки служат теми инструментами, посредством которых генетическая информация получает свое реальное воплощение. В соответствии с тем что в клеточном ядре содержатся тысячи генов, каждый из которых определяет какой-то один характерный признак живого организма, в клетке существуют тысячи разновидностей белков и каждый из них выполняет специфическую функцию, определяемую соответствующим геном. Таким образом, белки - это не только наиболее многочисленные, но и исключительно разнообразные по своим функциям макромолекулы.

Молекулы белков представляют собой линейные полимеры, состоящие из 22 основных L- α -аминокислот (которые являются мономерами) и, в некоторых случаях, из модифицированных основных аминокислот (правда модификации происходят уже после синтеза белка на рибосоме). Для обозначения аминокислот в научной литературе используются одно- или трёхбуквенные сокращения.

При образовании белка в результате взаимодействия α -аминогруппы ($-\text{NH}_2$) одной аминокислоты с α -карбоксильной группой ($-\text{COOH}$) другой аминокислоты образуются пептидные связи. Концы белка называют С- и N- концом (в зависимости от того, какая из групп концевой аминокислоты свободна: $-\text{COOH}$ или $-\text{NH}_2$, соответственно). При синтезе белка на рибосоме, новые аминокислоты присоединяются к С-концу, поэтому название пептида или белка даётся путём перечисления аминокислотных остатков начиная с N-конца.

Белки длиной от 2 до 100 аминокислотных остатков часто называют пептидами, при большей степени полимеризации - протеинами, хотя это деление весьма условно.

Последовательность аминокислот в белке соответствует информации, содержащейся в гене данного белка. Эта информация представлена в виде последовательности нуклеотидов, причем одной аминокислоте соответствует одна или несколько последовательностей из трех нуклеотидов - так называемых триплетов или кодонов. То, какая аминокислота соответствует данному кодону в мРНК определяется генетическим кодом, который может несколько отличаться у разных организмов.

Гомологичные белки (выполняющие одну функцию и предположительно имеющие общее эволюционное происхождение, например, гемоглобины) разных организмов имеют во многих местах цепи различные аминокислотные остатки, называемые вариантельными, в противоположность инвариантным, общим остаткам. По степени гомологии возможна оценки эволюционного расстояния между таксонами.

Выделяют простые белки (протеины) и сложные белки (протеиды). Простые белки содержат только аминокислоты, связанные в цепочку. Сложные белки имеют также неаминокислотные группы. Эти дополнительные группы в составе сложных белков называются «простетическими группами». Многие белки эукариот, например, имеют полисахаридные цепи, которые помогают белку принимать нужную конформацию и придают дополнительную стабильность. Дисульфидные мостики также играют роль как элементы необходимые при принятии белком правильной 3-х мерной формы, и являются главным компонентом сложных белков. Но важно заметить, что в основном только эукариоты способны на синтезирование сложных белков (протеидов), так как прокариоты не имеют достаточно компартментализации для создания дополнительных изменений, присутствующих в сложных белках, и даже если могут это делать в периплазматическом пространстве, то это случается либо редко, либо неэффективно.

Кроме последовательности (первичной структуры), крайне важна трехмерная структура белка, которая формируется в процессе фолдинга (от англ. folding, т.е. сворачивание). Показано, что несмотря на огромные размеры молекул, природные белки имеют лишь одну конформацию, утратившие структуру белки теряют свои свойства.

Выделяют четыре уровня структуры белка:

Первичная структура — последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

Вторичная структура — локальное упорядочивание фрагмента полипептидной цепи, стабилизированное водородными связями и гидрофобными взаимодействиями. Ниже приведены некоторые распространенные типы вторичной структуры белков:

α -спирали — плотные витки вокруг длинной оси молекулы, один виток составляют 4 аминокислотных остатка, спираль стабилизирована водородными связями между Н и О пептидных групп, отстоящих друг от друга на 4 звена. Спираль может быть построена исключительно из одного типа стереоизомеров аминокислот (L или D), хотя она может быть как левозакрученной, так и правозакрученной, в белках преобладает правозакрученная. Спираль нарушают электростатические взаимодействия глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, близкорасположенные аспарагин, серин, треонин и лейцин могут стерически мешать образованию спирали, пролин вызывает изгиб цепи и также нарушает α -спирали.

β -листы (складчатые слои) — несколько зигзагообразных полипептидных цепей, в которых водородные связи образуются между разными цепями, а не внутри одной, как имеет место в α -спирали. Эти цепи обычно направлены N-концами в разные стороны (антипараллельная ориентация). Для образования листов важны небольшие размеры R-групп аминокислот, преобладают обычно глицин и аланин.

неупорядоченные фрагменты.

Третичная структура

- пространственное строение полипептидной цепи - взаимное расположение элементов вторичной структуры, стабилизированное взаимодействием между боковыми цепями аминокислотных остатков. В стабилизации третичной структуры принимают участие:

ковалентные связи (между двумя цистеинами - дисульфидные мостики);
ионные (электростатические) взаимодействия (между противоположно заряженными аминокислотными остатками);
водородные связи;
гидрофобные взаимодействия.

Четверичная структура

- субъединичная структура белка. Взаимное расположение нескольких полипептидных цепей в составе единого белкового комплекса.

Также выделяют:

Трёхмерную структуру белка - набор пространственных координат, составляющих белок атомов.

Субъединичную (доменную) структуру белка — последовательность участков белка, имеющих известную функцию или определенную трёхмерную структуру.

Гидрофобное ядро, обеспечивающее сворачивание белка.

3.2. Биосинтез белка

Важнейшие функции организма: обмен веществ, развитие, рост, движение – осуществляются биохимическими реакциями с участием белков. Поэтому в клетках непрерывно синтезируются белки: белки-ферменты, белки-гормоны, сократительные белки, защитные белки.

Первичная структура белка (порядок расположения аминокислот в белке) закодирована в молекулах ДНК. Каждый триплет (группа из трех соседних нуклеотидов) кодирует на нити ДНК одну определенную аминокислоту из двадцати.

Последовательность триплетов на нити ДНК представляет собой генетический код.

Зная последовательность триплетов на нити ДНК, то есть генетический код, можно установить последовательность соединения аминокислот в белке.

К настоящему времени расшифрованы триплеты для всех двадцати аминокислот.

Например:

-аминокислоту лизин кодирует на нити ДНК триплет ТТТ.

-аминокислоту триптофан кодирует триплет АЦЦ и т.д.

В одной молекуле ДНК может быть закодированы несколько разных белков. Участок ДНК, на котором закодирован белок, называют геном.

Участки ДНК отделяются друг от друга специальными триплетами, которые являются знаками препинания. Они означают начало и окончание синтеза белка.

Поскольку ДНК, в которой хранится генетическая информация о белке не принимает непосредственного участия в синтезе белка, содержится в ядре, а синтез белка происходит в цитоплазме на рибосомах, существует посредник- иРНК.

- иРНК считывает генетическую информацию о белке с участка ДНК и передает эту информацию с нити ДНК на рибосому.

- иРНК синтезируется на участке ДНК по принципу комплементарности. Напротив азотистого основания аденин (А) на нити ДНК располагается урацил (У) на нити иРНК,

напротив азотистого основания тимин (Т) на нити ДНК располагается аденин (А) на иРНК, напротив азотистого основания гуанин (Г) на нити ДНК располагается цитазин (Ц). Процесс считывания иРНК генетической информации о белке с участка ДНК называется транскрипцией. Этот процесс протекает как матричный синтез, так как одна из нитей ДНК является матрицей.

Синтез белка происходит на рибосомах. На нити иРНК располагается обычно группа рибосом. Такую группу рибосом называют полисомой.

Рибосомы продвигаются на нити иРНК от триплета к триплету. Каждый триплет на нити иРНК кодирует одну определенную аминокислоту из двадцати аминокислот.

Транспортные РНК присоединяют определенные аминокислоты (каждая тРНК присоединяет одну определенную аминокислоту) и приносит их к рибосомам.

При этом антикодон каждой тРНК должен быть комплементарен одному из триплетов (кодонов) на иРНК (антикодон АГЦ на тРНК должен быть комплементарен кодону УГЦ на нити иРНК. рРНК вместе с белками – ферментами участвует в соединении аминокислот друг с другом, в результате чего на рибосомах синтезируется определенный белок.)

Этот процесс называется трансляцией.

Достигнув конечного участка на нити иРНК, рибосомы отделяются от нити РНК. Отсинтезированная молекула белка имеет первичную структуру. Затем она приобретает вторичную, третичную и четвертичную структуры.

В синтезе белка принимают участие большое кол-во ферментов. На синтез белка расходуется энергия АТФ.

Белок затем поступает в каналы эндоплазматической сети, в котором транспортируется к определенным участкам клетки.

3.3. Применение белка одноклеточных

По многим важным показателям биомасса микроорганизмов может обладать весьма высокой питательной ценностью. В немалой степени эта ценность определяется белками: у большинства видов они составляют значительную долю сухой массы клеток. На протяжении десятилетий активно обсуждаются и исследуются перспективы увеличения доли белка микроорганизмов в общем балансе производимого во всем мире белка. «Белок одноклеточных» является относительно новым источником питательных веществ. Его производство началось в конце 1960-х годов. Термин относится к белку, который получают при крупномасштабном выращивании микроорганизмов, таких как бактерии, водоросли, а также дрожжи и другие грибы. Белок пригоден для употребления людьми и может быть использован в качестве корма для животных. Он служит полезным источником минеральных веществ, витаминов, жиров и углеводов. Теоретически это позволяет высвободить для нужд человека целый ряд белковых продуктов, таких как соевая мука и зерно, которые в настоящее время используются на корм животных.

Крупномасштабное культивирование промышленных микроорганизмов и использование их биомассы – один из основных источников белка для человека и животных.

Сырьевая база микроорганизмов практически неисчерпаема, рост биомассы быстрый и интенсивный, состав белка одноклеточных весьма постоянен, он, как правило, сбалансирован по аминокислотному составу.

Из биомассы промышленных микроорганизмов можно получить широкую гамму продуктов различного назначения в хозяйственной деятельности человека.

Биомасса промышленных микроорганизмов уже сейчас широко используется для получения микробных препаратов (удобрителей почв, стимуляторов и регуляторов роста растений) и микробных полимеров (ферментных белков, иммунобиологических препаратов, интерферонов, антибиотиков, гормонов и т.д.).

Вопросы для самоконтроля

- 1) Строение и свойства белка.
- 2) Основные стадии биосинтеза белка. Где происходит синтез белка?
- 3) Перспективы применения белка одноклеточных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.

Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.

2. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162с.

3. *Блинов, В.А.* Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: Полиграфия Поволжья, 2003. – 196 с.

4. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология. Курс лекций. Часть II. / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2004. – 144с.

5. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах / В.А. Блинов. – Саратов: Гарнитура Таймс, 2008. – 102 с.

6. *Волова, Т.Г.* Биотехнология: электронное издание, ссылка доступа:
<http://polnotext.ru/volova-t-g-biotechnologiya/volova-t-g-biotechnologiya-glava-2-promishlennaya-mikrobiologiya-protsessi-proizvodstva-poleznich-veschestv>

7. *Живухина, Е.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для высших учебных заведений / Е.А. Живухина, Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 506 с.

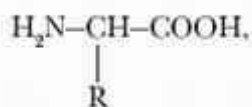
8. *Кузьмина, Н.А.* Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Электронное издание, 2010.
9. *Орехов, С.Н.* Биотехнология: учебное пособие / С.Н. Орехов, Ю.О. Сазыкин, И.И. Чакалева. – М.: Электронное издание, 2006.
10. *Сазыкин Ю.О.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений /Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр “Академия”, 2008. – 256 с.

Лекция 4

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

4.1. Аминокислоты

В количественном отношении белки занимают первое место среди всех содержащихся в живой клетке макромолекул; на их долю приходится не менее половины сухого веса клетки. Белки присутствуют во всех клетках причем их можно найти в любой части клетки. Ключ к пониманию структуры любого из всех этих различных белков дает небольшая группа довольно простых молекул, играющих роль строительных блоков. Для построения всех белков, будь то белки из самых древних линий бактерий или из высших организмов, используется один и тот же набор из 20 различных аминокислот. Все 20 аминокислот, встречающиеся в белках, характеризуются общей структурной особенностью-наличием карбоксильной группы и аминогруппы, связанных с одним и тем же атомом углерода.



Различаются же аминокислоты только по боковым цепям(R-группами), которые у разных аминокислот неодинаковы по структуре, электрическому заряду и растворимости в воде. 20 аминокислот, входящие в состав белков, часто называют стандартными, основными или нормальными аминокислотами, чтобы отличить их от других аминокислот, присутствующих в живых организмах, но не встречающихся в белках.

Все стандартные аминокислоты, кроме одной, содержат в α -положении асимметрический атом углерода, с которым связаны четыре разные замещающие группы: карбоксильная группа, аминогруппа, R-группа и атом водорода. Таким образом, асимметрический α - атом углерода является хиральным центром. Как мы знаем, соединения с хиральным центром встречаются в двух разных изомерных формах, у которых одинаковые все химические и физические свойства, за исключением одного - направление вращения плоскостиполяризации проходящего через них плоскополяризованного света; угол плоскости поляризации измеряют при помощи поляриметра. Если не считать глицина, не имеющего асимметрического атома углерода, все остальные 19 аминокислот, образующиеся при гидролизе белков в достаточно мягких условиях обладают оптической активностью, т.е. способны вращать плоскость поляризации света в том или ином направлении. Раствор одного стереоизомера данной аминокислоты вращает плоскость поляризации света влево; такой стереоизомер называется левовращающим изомером[перед названием ставят знак(-)]. Другой стереоизомер поворачивает поворачивает плоскость поляризации света точно на такой же угол, но вправо[в этом случае вперед ставят знак(+)]. Эквимолярная смесь(+)- и (-)-форм не способна вращать плоскость поляризации света. Поскольку все аминокислоты, выделенные из белков в мягких

условиях, вращают плоскость поляризации света, ясно, что в составе белковых молекул они присутствуют только в какой – либо одной стереоизомерной форме. Если соединения содержат два или более хиральных центров, оно может иметь 2^n стереоизомеров, где n-число хиральных центров. Глицин не содержит асимметрического атома углерода, и по этому у него нет стереоизомеров. Все другие аминокислоты, обычно встречающиеся в белках, содержат по одному асимметрическому атому углерода. Исключения составляют треонин и изолейцин, каждый из которых имеет по два таких атома и $2^n = 2^2 = 4$ стереоизомера.

Почти все природные биологический соединения, содержащие хиральный центр, встречаются только в какой-нибудь одной стереоизомерной форме – D или L. В живой природе встречаются также и некоторые D-аминокислоты, но они никогда не входят в состав белков. Живые клетки обладают уникальной способностью синтезировать L-аминокислоты с помощью стереоспецифических ферментов. Стереоспецифичность этих ферментов обусловлена асимметрическим характером их активных центров. Характерная трехмерная структура белков, благодаря которой они проявляют самые разные виды биологической активности, возникает только в том случае, если все входящие в их состав аминокислоты принадлежат одному стереохимическому ряду. Рассмотрим теперь структуру 20 аминокислот, встречающихся в белках. Дело облегчается тем, что все аминокислоты можно сгруппировать на основе признаков, свойственных их R-группам, в частности их полярности, т.е. способности R-групп к взаимодействию с водой при биологических значениях pH. Имеется четыре основных класса аминокислот, содержащих R-группы следующих типов: 1 - неполярные, или гидрофобные, 2 - полярные, но незаряженные, 3. - отрицательно заряженные, 4 - положительно заряженные. Внутри каждого класса имеется определенная градация по полярности, размерам и форме R-групп.

R-группы первого класса аминокислот представляют собой углеводороды, и, следовательно, они гидрофобны. К данному классу относят пять аминокислот с алифатическими R-группами (аланин, валин, лейцин, изолейцин и пролин), две аминокислоты с ароматическими кольцами (фенилаланин и триптофан) и одна аминокислота, содержащая серу (метионин). Аминокислоты второго класса лучше растворяются в воде, т.е. они более гидрофильны, чем неполярные аминокислоты, так как их функциональные группы образуют водородные связи с молекулами воды. В этот класс входят глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин. Полярность серина, треонина и тирозина обусловлена их гидроксильными группами, полярность аспарагина и глутамина – их амидными группами, а полярность цистеина – его сульфгидральной, или тиоловой, группой. Аспарагин и глутамин представляют собой амиды двух других аминокислот – соответственно аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Две аминокислоты содержат отрицательно заряженные (кислые) R- группы. К третьему классу относятся аспарагиновая и глутаминовая кислоты, каждая из которых содержит вторую карбоксильную группу и при pH 7 несет суммарный отрицательный заряд. Эти аминокислоты могут быть предшественниками аспарагина и глутамина. Четвертый класс - аминокислоты, у которых R-группы при pH 7,0 несут суммарный поло-

жительный заряд,- это лизин, содержащий вторую аминокгруппу, прикрепленную к алифатической цепи в ϵ -положении, аргинин, имеющий положительно заряженную гуанидиновую группу, и гистидин, содержащий слабо ионизированную имидозольную группу.

При растворении в воде аминокислоты ионизируются и ведут себя как кислоты или основания. В водном растворе аминокислоты, существуют в форме биполярных ионов, которые функционируют либо как кислоты, либо как основания. Вещества с такими двойственными свойствами являются амфотерными и часто называются амфолитами.

4.2. Синтез аминокислот

Процесс биотехнологического производства аминокислот включает прямую микробную ферментацию, микробиологический или ферментативный синтез из предшественников. В настоящее время наиболее распространен микробиологический синтез аминокислот.

В промышленных масштабах аминокислоты получают либо экстракцией из белковых гидролизатов, либо очисткой продуктов метаболизма неспоролирующих грамположительных почвенных бактерий, например *Corynebacterium* или *Brevibacterium spp.* Обычно для повышения их продуктивности используют мутагенез с последующим отбором штаммов - сверхпродуцентов определенных аминокислот.

Альтернативным подходом является выделение и изменение генов, кодирующих ключевые ферменты определенных биохимических реакций. Таков, например, геноинженерный способ получения аминокислоты триптофана, синтезируемой *Corynebacterium glutamicum*. Это достигается введением в клетки дикого типа копии гена, кодирующего атранилатсинтазу – фермент, лимитирующий синтез триптофана. Высокий уровень биосинтеза триптофана достигается также введением в клетки *C. glutamicum* модифицированных генов трех ключевых ферментов его бисинтеза:

3-дезоксид-арабиногептулозанат-7-фосфатсинтазы, атранилатсинтазы и атранилатфосфорибозилтрансферазы. В качестве альтернативы для синтеза аминокислот можно использовать *E. coli*.

Изменение синтеза аминокислот осуществимо генетическими методами, в том числе за счет использования мутантных организмов, таких, как ауксотрофные и регуляторные мутанты. Промышленные штаммы как правило, несут несколько мутаций, затрагивающих механизмы регуляции целевой аминокислоты и ее предшественников.

Среди продуцентов аминокислот – различные микроорганизмы, представители родов *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Microbacterium*, *Escherichia*. Для получения таких аминокислот, как L-глутамат, L-валин, L-аланин, L-глутамин и L-пролин, возможно применение природных штаммов и усиление у них продукции аминокислот условиями ферментации. Например, высокий уровень глутамата возможен при полном или частичном подавлении активности α -кетоглутаратдегидрогеназы, при добавлении в среду ПАВ и антибиотиков.

4.3. Химический синтез аминокислот

Химический синтез более универсален, чем микробиологический, и позволяет получать соединения любой возможной структуры. Здесь используется непищевое минеральное сырье, достигается любая концентрация продукта, однако, как правило, процесс многостадийен и требует более сложной аппаратуры.

Оба способа обеспечивают получение природных аминокислот необходимой степени химической и оптической чистоты. Так что, в конечном счете, когда речь идет о промышленном производстве, последнее слово остается за экономикой: по данным зарубежных специалистов, при больших масштабах химические методы становятся более рентабельными.

Наиболее широко разработан промышленный синтез метионина - аминокислоты, главным потребителем которой является птицеводство. Исходным веществом служит пропилен - продукт крекинга нефти. Пропилен окисляется до акролеина, который в результате серии реакций, превращается в рацемический метионин.

В результате химического синтеза обычно получается смесь равных количеств L и D - изомеров аминокислот, в то время как в состав белков входят исключительно L-изомеры. D-изомеры организмом, как правило, не усваиваются и являются балластом. Следовательно, необходимо разделение, что неминуемо отрицательно сказывается на экономике. В последнее время в области расщепления рацемических смесей аминокислот достигнуты серьезные успехи. В работах С.В. Рогожина и В.А. Даванкова показано, что оптически неактивные аминокислоты, будучи ковалентно присоединены к нерастворимому полимерному носителю, легко образуют комплексы с медью, никелем и т.п. другая рацемическая аминокислота, находящаяся в растворе, занимает два вакантных координационных места у атома металла, причем прочность комплексов L - и D - изомеров различна. Сколь ни мало это различие, будучи повторенным многократно в процессе хроматографии, оно обеспечивает полное или частичное разделение оптических антиподов. Наилучшие результаты получены с D, L - пролином, который может быть препаративно разделен на оптические изомеры

Вопросы для самоконтроля

- 1) Строение и свойства аминокислот. Пептиды, их биологическая роль.
- 2) Основные продуценты аминокислот.
- 3) Преимущества химического синтеза аминокислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.

Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.
2. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162с.
3. *Блинов, В.А.* Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: Полиграфия Поволжья, 2003. – 196 с.
4. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология. Курс лекций. Часть II. / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2004. – 144с.
5. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах / В.А. Блинов. – Саратов: Гарнитура Таймс, 2008. – 102 с.
6. *Волова, Т.Г.* Биотехнология: электронное издание, ссылка доступа:
<http://polnotext.ru/volova-t-g-biotechnologiya/volova-t-g-biotechnologiya-glava-2-promishlennaya-mikrobiologiya-protsessi-proizvodstva-poleznich-veschestv>
7. *Живухина, Е.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для высших учебных заведений / Е.А. Живухина, Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 506 с.
8. *Кузьмина, Н.А.* Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Электронное издание, 2010.
9. *Орехов, С.Н.* Биотехнология: учебное пособие / С.Н. Орехов, Ю.О. Сазыкин, И.И. Чакалева. – М.: Электронное издание, 2006.
10. *Сазыкин Ю.О.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

Лекция 5

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

5.1. Роль ферментов как биокатализаторов

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).

Не гидролитические 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 purpurogenium*; 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*, *Erwinia* образуют пектинолитические ферменты; анаэробные бактерии *Clostridium felsineum* продуцируют полигалактуроназу, пектин эстеразу. 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 ферментов 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, целлюлозы 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 из нее волокна. Амилолитические ферменты используют для удаления 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 смягчение 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 так же 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.

5.2. Микробиологический метод получения ферментов

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. Исключение 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 индуцировано в ответ на заданный субстрат, возможно использование одной культуры для получения различных ферментов. 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. Дерепрессии синтеза ферментов можно добиться, выращивая частичный ауксотрофный 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. Добавление 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.

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.

5.3. Методы выделения и очистки 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 термолабильные компоненты, инокулят (0.02-0.1 % от массы среды), быстро перемешивают ручным 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 скрепляет 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 исполь-

зования 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 препараты ферментов, используемые в текстильной, кожевенной промышленности, упаковывают в бумажные многослойные крафтмешки 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 вытщенный инокулят (2-5 % от объема производственной культуры). Процесс проводят в цилиндрических аппаратах объемом до 100 м³. Синтез фермента в глубинной культуре протекает в течение 3-4 суток при непрерывной подаче стерильного воздуха, стабилизации рН и температуры среды на строго определенных уровнях. Незначительные изменения значений данных параметров могут вызвать многократное снижение ферментативной активности.

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 рН. 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 глюкозоизомеразы с использованием бактериальной культуры *Bacillus coagulans*. Ферментацию проводят при дефиците глюкозы и кислорода в среде (глюкозоизомераза ингибируется кислородом); максимальная продуктивность сохраняется длительное время, до 200 ч.

После завершения ферментации для предотвращения инактивации ферментов культуральную жидкость охлаждают до 3-5°С 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 применения 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 высоко-селективных 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.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Ферменты и их применение.
- 2) Особенности микробиологического синтеза ферментов. Продуценты.
- 3) Методы получения ферментов. Глубинная и поверхностная ферментация.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.

Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.

2. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162с.

3. *Блинов, В.А.* Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: Полиграфия Поволжья, 2003. – 196 с.

4. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах / В.А. Блинов. – Саратов: Гарнитура Таймс, 2008. – 102 с.

5. *Волова, Т.Г.* Биотехнология: электронное издание, ссылка доступа:
<http://polnotext.ru/volova-t-g-biotechnologiya/volova-t-g-biotechnologiya-glava-2-promishlennaya-mikrobiologiya-protsessi-proizvodstva-poleznich-veschestv>

6. *Живухина, Е.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для высших учебных заведений / Е.А. Живухина, Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 506 с.

7. *Кузьмина, Н.А.* Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Электронное издание, 2010.

8. *Орехов, С.Н.* Биотехнология: учебное пособие / С.Н. Орехов, Ю.О. Сазыкин, И.И. Чакалева. – М.: Электронное издание, 2006.

9. *Сазыкин Ю.О.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

Лекция 6

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

6.1. Преимущества иммобилизованных ферментов

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. По образному выражению 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.

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.

6.2. Методы физической и химической иммобилизации

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 иммобилизации 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 аминокетильными группами фермента и карбоксильными группами носителя или, наоборот, - между карбоксильными группами фермента и аминокетильными группами носителя. В качестве водоотнимающего агента используют дициклогексилкарбо-диимид, 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 присо-

единяют 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.

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.

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, 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 Ca^{2+} или Ba^{2+} (для альгината) или Al^{3+} , Fe^{3+} , K^+ или Mo^{2+} (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, полиэфилов, 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 концов. Фермент в полости волокон не претерпевает каких-либо химических модификаций, поэтому сохраняет свою активность и свойства.

Иммобилизация методом поперечных сшивок (или химического присоединения) заключается в химическом связывании молекул ферментов между собой путем образования поперечных сшивок. Для образования сшивок применяют различные агенты, несущие две и более реакционно способные группы, которые осуществляют поперечную сшивку ферментов за счет эпокси- и иминогрупп.

В качестве сшивающих агентов широко применяют также глутаровый альдегид, гексаметилендиизоцианат, хлорпроизводные триазина. Метод отличается простотой реализации и позволяет производить сшивку различных по структуре ферментов, а также ферментов с целыми клетками. Однако часто при сшивке может происходить изменение существенное снижение активности катализатора.

Таким образом, методы иммобилизации достаточно разнообразны, причем имеется возможность использования их в сочетании. Например, адсорбцию на носителе с инкапсулированием, включение в гелиевую структуру и адсорбцию и т. д. Рассмотренные методы применяются не только для иммобилизации ферментов, но также и для других биокатализаторов - целых клеток, клеточных органелл, антител, антигенов и др. Ни один из описанных методов не является универсальным, и для каждого типа катализаторов существуют свои предпочтительные методы. Ферменты иммобилизуют различными адсорбционными методами или методом поперечных сшивок, лучшим методом для иммобилизации целых клеток является включение в полимерные структуры.

Помимо создания устойчивых биокаталитических ферментных систем, важнейшей задачей инженерной энзимологии является изучение физико-химических свойств данных систем и разработка научных основ их функционирования и применения.

6.3. Применение иммобилизованных ферментов

Процессы на основе иммобилизованных ферментов. Сферы применения иммобилизованных ферментов разнообразны - это тонкий органический синтез и преобразование энергии, ферментная аналитика и получение целевых продуктов, конверсия растительного сырья и создание лекарственных препаратов.

Применение иммобилизованных ферментов является сегодня одним из важнейших и динамично развивающихся разделов современной биотехнологии. Объемы выпуска ферментов, применяемых, в промышленных процессах непрерывно возрастают, при этом ведущие западные страны, лидирующие в этой области, ежегодно выпускают ферментов на сотни млн. долларов. Производство протеаз, глюкозоизомераз, ацилтрансфераз достигает сотен и тысяч кг/г.

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 ферментационными 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, псевдо оживленным слоем, а так же в реакторах с полыми волокнами.

Все представленные системы имеют определенные ограничения в части неравномерного распределения катализатора, а также перепадов давления. 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 вращающейся 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 газа- 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 пищевых 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, линейная 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 «Ганабе 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 аминокилазой. Фермент гидролизует L-ацил изомеры, после отщепления объемной ацил-группы более мелкие и растворимые молекулы L-аминокислот выводятся из биореактора через мембрану. В конце концов в реакционной смеси остаются только ацил-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. Пе-

риод 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/1 м³ 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 инертного 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 целлюлоза содержащих 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 техноло-

гический 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 простагланди-нэндопероксидсинтетаза, катализирующая трех-субстратную 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.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Имобилизованные ферменты. Их преимущества.
- 2) Основные способы получения ферментов. Сравнить физический и химический.
- 3) Применение иммобилизованных ферментов в различных отраслях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.

Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.

2. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162с.
3. *Блинов, В.А.* Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: Полиграфия Поволжья, 2003. – 196 с.
4. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах / В.А. Блинов. – Саратов: Гарнитура Таймс, 2008. – 102 с.
5. *Волова, Т.Г.* Биотехнология: электронное издание, ссылка доступа:
<http://polnotext.ru/volova-t-g-biotechnologiya/volova-t-g-biotechnologiya-glava-2-promishlennaya-mikrobiologiya-protsessi-proizvodstva-poleznich-veschestv>
6. *Живухина, Е.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для высших учебных заведений / Е.А. Живухина, Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 506 с.
7. *Кузьмина, Н.А.* Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Электронное издание, 2010.
8. *Орехов, С.Н.* Биотехнология: учебное пособие / С.Н. Орехов, Ю.О. Сазыкин, И.И. Чакалева. – М.: Электронное издание, 2006.
9. *Сазыкин Ю.О.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

Лекция 7

ПОЛУЧЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

7.1. Углеводы: строение и биологические функции

Прежде чем приступить к изучению метаболизма клеток, следует рассмотреть углеводы, поскольку их можно считать основой существования большинства организмов. В таких углеводах, как сахара и крахмал, заключено основное количество калорий, получаемых с пищей человеком, почти всеми животными и многими бактериями. Центральное место углеводы занимают и в метаболизме зеленых растений и других фотосинтезирующих организмов, утилизирующих солнечную энергию для синтеза углеводов из CO_2 и H_2O . Образующиеся в результате фотосинтеза огромные количества крахмала и других углеводов играют роль главных источников энергии и углерода для неспособных к фотосинтезу клеток животных, растений и микроорганизмов.

Углеводам присущи также и другие важные биологические функции. Крахмал и гликоген используются как временные депо глюкозы. Нерастворимые полимеры углеводов выполняют функции структурных и опорных элементов в клеточных стенках бактерий и растений, а также в соединительной ткани и оболочках клеток животных. Углеводы других типов служат в качестве смазки в суставах, обеспечивают слипание клеток и придают биологическую специфичность поверхности животных клеток.

В этой главе мы рассмотрим строение, свойства и функции наиболее важных углеводов. Кроме того, мы остановимся на свойствах сложных соединений, образованных из углеводов и белков, а именно *гликопротеинов* и *протеогликанов*; у животных эти соединения служат необходимыми компонентами клеточных поверхностей и внеклеточных опорных систем.

Углеводы являются полигидроксиальдегидами или полигидроксикетонами либо образуют эти вещества в результате гидролиза. Происхождение названия «углеводы» связано с тем, что, судя по эмпирическим формулам, большинство веществ этого класса представляют собой соединения углерода с водой, поскольку соотношение между числом атомов углерода, водорода и кислорода в молекулах углеводов составляет 1 : 2 : 1. Так, эмпирическая формула D-глюкозы- $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$; по-другому ее можно записать как $(\text{CH}_2\text{O})_6$ или $\text{C}_6(\text{H}_2\text{O})_6$. Большинство распространенных углеводов имеют эмпирическую формулу $(\text{CH}_2\text{O})_n$, однако существуют и углеводы, не удовлетворяющие этому соотношению, а некоторые из них содержат также атомы азота, фосфора или серы.

Различают три основных класса углеводов: *моносахариды*, *олигосахариды* и *полисахариды*. *Моносахариды*, или *простые сахара*, содержат только одну структурную единицу полигидроксиальдегида или полигидроксикетона. Среди природных моносахаридов наиболее распространена D-глюкоза, содержащая шесть атомов углерода.

Олигосахариды (греческое слово «олиго» значит «немного») состоят из коротких цепей, образованных моносахаридными единицами, соединенными ковалентными связями. Наиболее часто встречаются дисахариды, состоящие из двух моносахаридных

единиц. Типичный представитель дисахаридов - сахароза, или тростниковый сахар, молекулы которой содержат остатки двух шестиуглеродных Сахаров-D-глюкозы и D-фруктозы, соединенные ковалентной связью. Большинство олигосахаридов, содержащих три и более остатков, встречаются не в свободной форме, а в виде боковых цепей, присоединенных к полипептидам, входящим в состав гликопротеинов и протеогликанов, что будет рассмотрено несколько ниже. Полисахариды представляют собой длинные цепи, образованные сотнями или тысячами моносахаридных единиц. Некоторые полисахариды, например целлюлоза, имеют линейные цепи, тогда как другие, например гликоген, - разветвленные. Наиболее распространенные в растительном мире углеводы - крахмал и целлюлоза образованы из повторяющихся остатков D-глюкозы; различие между ними состоит лишь в способах связи остатков D-глюкозы между собой. Названия всех обычных моносахаридов и дисахаридов имеют окончание-оза.

7.2. Структурные и защитные полисахариды

Большинство клеток растений окружены жесткой и очень прочной полисахаридной оболочкой, которую можно сравнить с пластиком, армированным стекловолокном. Каркас клеточных стенок растений состоит из перекрещивающихся слоев длинных, вытянутых целлюлозных волокон, прочность которых превышает прочность стальной проволоки того же диаметра. Волокнистый каркас усилен похожим на цемент матриксом, образованным из структурных полисахаридов другого типа и из полимерного вещества лигнина. Очень толстые клеточные стенки древесины в стволах деревьев позволяют им выдерживать чрезвычайно большие нагрузки. Клеточная стенка бактерий располагается снаружи по отношению к клеточной мембране, образуя вокруг клетки жесткую пористую оболочку. Она физически защищает нежную клеточную мембрану и цитоплазму клетки. Структурной основой клеточных стенок большинства бактерий служит пронизанный поперечными ковалентными связями каркас, который почти целиком окружает клетку. Он состоит из длинных, параллельно расположенных полисахаридных цепей, связанных между собой через определенные интервалы поперечными сшивками из коротких полипептидных цепочек. Полисахаридные цепи состоят из чередующихся моносахаридных остатков N-ацетил-D-глюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных друг с другом $\beta(1 \rightarrow 4)$ связями. К каждому остатку N-ацетилмурамовой кислоты присоединена боковая тетрапептидная цепочка. Параллельные полисахаридные цепи сшиваются короткими поперечными полипептидными цепочками, структура которых различна у разных видов бактерий. Некоторые гликопротеины содержат одну или несколько углеводных групп, другие большое число линейных или разветвленных олигосахаридных цепей. Почти все белки на внешней поверхности животных клеток гликопротеины.

В *Staphylococcus aureus*, вызывающих развитие фурункулов и нагноение ран, остатки ацетилмурамовой кислоты в соседних полисахаридных цепях связаны друг с другом пептидными цепочками, состоящими из пяти остатков глицина. Вся эта скрепленная поперечными связями структура, окружающая клетку, называется муреином (от латин-

ского слова murus-стенка) или пептидогликаном: второе название подчеркивает гибридную природу данной структуры, представляющей собой сочетание пептидных и полисахаридных элементов. Тянущийся непрерывно вдоль всей поверхности бактериальной клетки пептидогликан можно рассматривать как одну гигантскую мешковидную молекулу. У грамположительных бактерий (дающих окраску по Граму, т.е. при обработке красителем кристаллическим фиолетовым) пептидогликан образует вокруг клетки несколько концентрических слоев, пронизываемых другими макромолекулярными компонентами. У грамотрицательных бактерий, например у *E. coli*, пептидогликановый каркас покрыт богатой липидами внешней оболочкой, содержащей гидрофобные белки. Целостность клеточных стенок имеет жизненно важное значение для защиты, роста и деления бактерий. Действие пенициллина - одного из наиболее ценных антибиотиков, используемых для борьбы с бактериальными инфекциями, основано на том, что он подавляет последний этап ферментативного синтеза пептидогликанов у чувствительных к нему микроорганизмов; это приводит к формированию неполноценных клеточных стенок и подавлению роста бактерий.

7.3. Способность микроорганизмов сбраживать углеводы

В процессе приготовления пива крахмал расщепляется под действием содержащихся в солоде ферментов α -амилазы и β -амилазы на длинные цепи глюкозы. Один из компонентов крахмала - амилозу, а разветвленные структуры - другой компонент крахмала - амилопектин. β -Амилаза отщепляет сразу два остатка глюкозы, образуя дисахарид мальтозу. Одновременно α -амилаза, действуя на связи, расположенные дальше от конца цепей, отщепляет более крупные фрагменты, на которые в свою очередь действует β -амилаза. Разветвляющий фермент расщепляет связи между отдельными ветвями цепей: амилоглюкозидаза по одному отщепляет от декстринов остатки глюкозы. Методами генетической инженерии удалось повысить способность дрожжевых клеток сбраживать декстрины, что приводит к более полному использованию углеводов в процессе брожения.

До недавних пор сравнительно сложные методы отбора улучшенных штаммов можно было применять только к микроорганизмам, поддающимся генетическому анализу. Так, некоторые штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, участвующие в сбраживании пищи или напитков, можно заставить образовывать половые споры, благодаря чему становится возможным осуществление программы селекции дрожжей на основе гибридизации. Такие программы, неизбежно носящие эмпирический характер, внесли ценный вклад в получение улучшенных штаммов дрожжей, используемых в хлебопечении.

Новые методы генетического манипулирования с *S. cerevisiae* недавно были применены в пивоваренной промышленности. Была сделана попытка изменить способность штаммов сбраживать углеводы. В солодовом сусле содержатся следующие углеводы: мальтоза (53%), глюкоза (12%), мальтотриоза (13%), декстрины (22%) и следовые количества мальтотетраозы.

Низовые и верховые пивные дрожжи способны сбраживать все эти вещества, за исключением декстринов а иногда и мальтотетранозы. Поскольку сейчас все большей популярностью пользуется «светлое» пиво, т.е. пиво с низким содержанием углеводов, были предприняты попытки ввести в пекарские дрожжи генетическую информацию для сбраживания декстринов, которые составляют значительную часть всех углеводов суслу. К счастью, дрожжи *Saccharomyces diastaticus*- вид, родственный пекарским дрожжам, способны сбраживать декстрины. Поэтому основной целью недавно проведенных исследований было введение генов, определяющих сбраживание декстринов, в штаммы *S. cerevisiae* - обычные пивные дрожжи.

Можно считать, что путь к созданию пивных дрожжей, использующих декстрины, открыт. Вероятно, это первая из множества программ, в которых гены будут «вшиваться» специфическим образом, с тем чтобы придать желаемый вкус или какие-либо другие качества пищевым продуктам и напиткам, а также усовершенствовать технологию их производства.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Углеводы: структура и биологическая роль.
- 2) Структурные и защитные полисахариды.
- 3) Биотехнологические аспекты брожения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.

Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.

2. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162с.

3. *Блинов, В.А.* Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: Полиграфия Поволжья, 2003. – 196 с.

4. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах / В.А. Блинов. – Саратов: Гарнитура Таймс, 2008. – 102 с.

5. *Волова, Т.Г.* Биотехнология: электронное издание, ссылка доступа:
<http://polnotext.ru/volova-t-g-biotechnologiya/volova-t-g-biotechnologiya-glava-2-promishlennaya-mikrobiologiya-protsessi-proizvodstva-poleznich-veschestv>

6. *Живухина, Е.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для высших учебных заведений / Е.А. Живухина, Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 506 с.
7. *Кузьмина, Н.А.* Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Электронное издание, 2010.
8. *Орехов, С.Н.* Биотехнология: учебное пособие / С.Н. Орехов, Ю.О. Сазыкин, И.И. Чакалева. – М.: Электронное издание, 2006.
9. *Сазыкин Ю.О.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

Лекция 8

ПОЛУЧЕНИЕ ГОРМОНОВ

8.1. Химический синтез гормонов

Гормоны представляют собой сложные органические соединения, играющие важную роль в животном организме: они регулируют многие жизненно важные процессы - развитие, созревание, рост, процессы, управляющие обменом веществ. Стероидные гормоны влияют на работоспособность организма, сопротивляемость неблагоприятным внешним условиям, препятствуют преждевременному старению.

Благодаря мощному и разнообразному физиологическому действию многие из стероидных гормонов представляют высокую ценность как лечебные препараты.

Для медицинских целей гормоны получают из желез внутренней секреции животных. Но для того чтобы получить 1 г гормона, нужно забить несколько тысяч голов скота.

Химический синтез гормонов очень сложен.

Микробы используются для получения гормонов. Если в среду, где растет микроорганизм, добавить определенное вещество, то уже через несколько часов образуется соединение с гормональными свойствами, обладающее высокой физиологической активностью. Это происходит потому, что микроорганизмы «изменяют» строение молекулы вещества, которое было внесено в среду. С помощью важных химических реакций соединение приобретает ценные биологические свойства. Этот процесс, осуществляемый микробами, называется трансформацией.

Способность к трансформации стероидов обнаружена у многих микроорганизмов: бактерий, актиномицетов, дрожжей, грибов.

Так, с помощью микроорганизмов могут быть получены кортизон и гидрокортизон, преднизон и преднизолон - ценные препараты гормонального действия, широко используемые в лечебной практике.

8.2. Роль генной инженерии в получении продуцентов гормонов

Генная инженерия или технология рекомбинантных ДНК, изменение с помощью биохимических и генетических методик хромосомного материала - основного наследственного вещества клеток.

Раньше гормоны получали из органов и тканей животных и человека (крови доноров, удаленных при операциях органов, трупного материала). Требовалось много материала для получения небольшого количества продукта. Так, человеческий гормон роста (соматотропин) получали из гипофиза человека, каждый гипофиз содержит его не более 4 мг. В то же время для лечения одного ребенка, страдающего карликовостью, требуется около 7 мг соматотропина в неделю; курс лечения должен продолжаться несколько лет. С применением генноинженерного штамма *E. coli* настоящее время полу-

чают до 100 мг гормона роста на 1 л среды культивирования. Открываются перспективы борьбы не только с карликовостью, но и с низкорослостью — более слабой степенью дефицита соматотропина. Соматотропин способствует заживлению ран и ожогов, наряду с кальцитонином (гормоном щитовидной железы) регулирует обмен Ca^{2+} в костной ткани.

Гормон роста или соматотропин принадлежит к семейству гипофизарных белковых гормонов. Этот регуляторный белок, имеющий молекулярную массу около 22000 дальтон, выполняет в организме важную функцию стимулятора соматического роста.

Впервые гормон был выделен и очищен в 1963 году из гипофиза, полученного из трупного материала. Гормон видоспецифичен и является единственным средством лечения детей, страдающих от его недостатка.

Действие соматотропного гормона на костный рост опосредовано через соматомедины - инсулиноподобные ростовые факторы полипептидной природы. Главным источником соматомединов в циркуляции является печень, где их синтез стимулируется соматотропным гормоном. В регуляции гепатической продукции соматомединов участвуют и другие гормоны - инсулин, пролактин, тиреоидные гормоны. Помимо печени, соматомедины синтезируются в других клетках и тканях, в частности в хрящевой ткани, где они могут действовать локально.

Химический синтез гормона сложен и дорог. Именно поэтому соматотропин оказался одним из первых продуктов, полученных методами генной инженерии. Фирмой Genentech Inc.(США) был сконструирован "квазисинтетический" ген соматотропина, построенный из синтетического фрагмента ДНК, кодирующего 23 аминокислоты N-концевой части гормона и фрагмента к ДНК, несущего информацию об остальной части молекулы соматотропина. Введение его в плазмиду, содержащую бактериальный промотор (регуляторный элемент, контролирующий транскрипцию гена) и сигнал инициации трансляции, обеспечивало эффективную экспрессию гена и приводило к синтезу гормона роста.

Соматотропины разной видовой принадлежности, обладая различиями в химической структуре, иногда довольно значительными, тем не менее проявляют четкую структурную гомологию. Все изученные соматотропины млекопитающих, в том числе человека, построены из одной полипептидной цепи, состоящей из 191 аминокислотного остатка. Они содержат по одному остатку триптофана и четыре остатка полуцистина. Два дисульфидных мостика (в соматотропине человека между остатками Цис54-Цис165 и ЦИС182-ЦИС189) формируют две петли полипептидной цепи – большую, включающую центральный участок аминокислотной последовательности, и малую на С-концевом участке.

Пространственная структура соматотропинов характеризуется высокой степенью упорядоченности. Высокое содержание в составе соматотропинов неполярных аминокислот обуславливает их большую склонность к образованию в растворе димеров и более крупных агрегатов.

Отмечая в целом эволюционную консервативность соматотропина в ряду млекопитающих, которая сочетается с консервативностью его биологической функции, следует

сказать, однако, что в этом ряду несколько особняком стоит соматотропин человека. Сохраняя схему строения, общую для других млекопитающих, гормон человека отличается аминокислотной последовательностью от изученных соматотропинов животных на 34-35%. Этим может объясняться неэффективность соматотропинов животного происхождения как стимуляторов роста при введении людям.

Вместе с тем при сравнении аминокислотных последовательностей соматотропинов человека и различных животных во всех этих белках легко выявляются участки, почти идентичные по структуре. Высокая эволюционная консервативность отдельных участков полипептидной цепи может свидетельствовать об их принципиально важной функциональной роли как носителей информации о специфической функции гормонального белка.

Гормон роста, или соматотропный гормон (СТГ), продуцируется специализированными клетками гипофиза - соматотрофами. Содержание соматотропного гормона в одном гипофизе человека составляет около 5 мг и по крайней мере на порядок превышает содержание других гормонов.

Биосинтез и секреция соматотропного гормона находятся под сложным контролем, включающим регуляцию в первую очередь гипоталамическими факторами: ингибирующую регуляцию соматостатином и стимулирующую СТГ-рилизинг фактором, а также гормонами - трийодтиронином и глюкокортикоидами, опиоидными пептидами и т.д.

Секреция соматотропного гормона зависит также от концентрации в плазме крови метаболитов, в регуляции обмена которых участвует СТГ, увеличивается в условиях дефицита энергетических субстратов, а также во время сна и в стрессовых ситуациях.

Продуцируемый гипофизом соматотропный гормон отличается высокой гетерогенностью, являющейся результатом как альтернативного сплайсинга мРНК соматотропного гормона, так и посттрансляционных модификаций - протеолиза, фосфорилирования, гликозилирования, димеризации и олигомеризации. При стимуляции секреции гормона все эти формы высвобождаются из гипофиза в циркуляцию и через 30 мин более 50% соматотропного гормона присутствует в плазме крови в мономерной форме, 27% - в димерной и менее 20% - в олигомерной.

Среди мономерных форм соматотропного гормона доминирует 22 кдальтон СТГ (83%), в меньших количествах присутствует 20 кдальтон СТГ (11%) и около 6% составляют различные кислые формы гормона. Таким образом, реакция организма на соматотропный гормон является результатом суммарного действия белков, несколько различающихся по физико-химическим, биологическим и иммунологическим свойствам.

Несмотря на большой прогресс, достигнутый в исследовании соматотропных гормонов человека и животных, механизм их действия на молекулярном уровне изучен недостаточно. Отсутствие данных о точной пространственной структуре гормонов этой группы затрудняет исследования их взаимодействия с рецепторами, ограничивает возможности изучения структурно-функциональных взаимоотношений различных участков полипептидной цепи, не позволяет в полной мере использовать достижения белковой инженерии для создания аналогов соматотропинов.

Рекомбинантный соматотропин, получивший название соматрем, стал вторым биосинтетическим фармацевтическим препаратом. СТГ, биологически чистый и свободный от вирусных загрязнений, впервые был получен в 1980 году фирмой «Genentech». Гормон, синтезированный в генетически сконструированных клетках кишечной палочки, отличается от гормона, выделенного из гипофиза, дополнительным остатком метионина на NH₂ – конце молекулы.

На первом этапе клонировали двунитевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23 аминокислот. Затем клонировали синтетический полипептид, соответствующий аминокислотам от 1-й до 23-й. Далее два фрагмента объединяли, затем «подстроили» к паре промоторов (промотор – специфическая последовательность в ДНК, необходимая для инициации транскрипции РНК-полимеразы) и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры *E.coli* (100000 молекул гормона на клетку). СТГ, синтезированный в бактериях, обладал нужной м.м. и не связан с каким-либо бактериальным белком, от которого его необходимо было отщеплять.

Изменяя аминокислотную последовательность СТГ посредством модификации кодирующего его гена, в бактериальных клетках можно синтезировать аналоги гормона, очень важные для изучения активных участков молекулы и этиологии карликовости на молекулярном уровне.

Используя методы рекомбинантных ДНК, можно синтезировать и другие факторы роста и факторы дифференцировки тканей, выделив вначале их мРНК, затем получив соответствующие гены. Это относится к соматомедину А, стимулирующему фиксацию серы в хряще, образование которого индуцируется соматотропином.

В 1982 году выделен и синтезирован полипептид, содержащий из 44 аминокислотных остатков, обладающий полной биологической активностью гипоталамического ризинг-фактора соматотропина (СТГ-РФ). Введение СТГ-РФ способно компенсировать недостаток соматотропина. Применение СТГ-РФ возможно не только для лечения гипофизарной карликовости, но и при некоторых формах диабета и для ускорения регенерации тканей у людей, получивших сильные ожоги.

Весь технологический цикл состоит из пяти функционально различных этапов:

- 1) ферментация;
- 2) первичная очистка белка;
- 3) хроматографическая очистка;
- 4) изготовление лекарственной формы;
- 5) анализ качества субстанции и лекарственной формы соматогена.

Важной особенностью технологического процесса является обеспечение апиrogenности при проведении хроматографической очистки белка.

Неотъемлемой составной частью каждого технологического цикла промышленного производства является проведение сложного комплекса анализов качества продукта. В основе объема и номенклатуры этих анализов лежат соответствующие рекомендации ВОЗ.

В настоящее время разработан более совершенный препарат СТГч из ГТЧ, лишенный агрегированных форм и консерванта, - аусоматин. При производстве мономерных препаратов СТГч (например, аусоматина) получают значительные количества агрегированных форм соматотропина в виде отходов производства. Разработан оригинальный способ превращения нековалентно связанного димера и полимера в мономер. Кроме того, во время этого процесса получается ковалентно связанный димер и полимер СТГч - мало изученные компоненты.

Интересны разработки по получению 20К варианта СТГч. Перспективной задачей является получение и изучение не только различных форм СТГ, но и иммобилизованного СТГ с целью получения пролонгированного действия гормона. Разработан оригинальный способ получения иммобилизованного СТГч, обладающего пролонгированным действием.

Параллельно с получением СТГч была создана оригинальная комплексная технология получения гормонов аденогипофиза, в том числе всех видоспецифических, и некоторых их модификаций из ГТЧ. Важное значение имеет реализация целевой программы по созданию лечебного препарата СТГ (соматогена), полученного методом генной инженерии.

Клинический опыт показал, что, оптимизируя лечение низкорослости, целесообразно иметь в арсенале несколько аналогичных фармацевтических препаратов, получаемых различными технологиями или даже методами (СЧ, аусоматин, соматоген). Длительное лечение (годами) одним препаратом СТГч вызывает в организме уменьшение чувствительности в нему. Частично это может быть результатом образования антител, однако основную причину надо искать на уровне рецепторов и процессинга гормона.

Работа с ГТЧ, а также комплексные исследования выделяемых гормонов и их различных форм дают возможность изучать созданные природой системы и лучше их понять. Существование различных нативных форм СТГч в организме свидетельствует об их целесообразности и о возможном применении, например, в клинике.

При производстве препаратов СТГч из ГТЧ успешно реализуется комплексная промышленная технология получения и других гормонов аденогипофиза (ЛГч, ФСГч, ТТГч и др.). Необходимо оптимизировать производство, внедряя новые прогрессивные методы (аффинную хроматографию и др.); получать особочистые гормоны по комплексной технологии. Надо расширить производство и применение наборов иммуномикроанализа гормонов аденогипофиза для диагностики и биотехнологии, осуществить регламентированное производство стандартизированных антител различной гаммы, создавать новые препараты СТГч, в том числе иммобилизованные.

8.3. Получение генно-инженерного инсулина

Биотехнологическое получение инсулина человека было осуществлено в 1980-е года, что имело большое значение для практической медицины. В качестве компетентных клеток использовали *E.coli*, а гены обеих цепей молекулы человеческого инсулина были получены путем химического синтеза. Эти гены присоединяли к 3- концу

гена кодирующего белок галактозидазу, и вводили в векторную плазмиду. Трансформированные клетки *E.coli*, синтезировали химерные белки, состоящие из А или В-цепи инсулина. С помощью бромцианина, специфически расщепляющего белки по остатку метионина, выделяли индивидуальную цепь инсулина. Однако образование дисульфидных цепей *in vitro* стало лимитирующей стадией всего процесса: выход биологически активного вещества был незначителен.

Поэтому был разработан метод получения проинсулина человека с последующим созреванием его *in tube*. Были получены двухцепочечные фрагменты ДНК, соответствующие гену, кодирующему человеческий инсулин. Они были встроены в плазмиду и перенесены в *E.coli*. Полученные рекомбинантные клетки синтезировали проинсулин, который затем превращали в зрелый инсулин. Инсулин стал первым препаратом, созданным с помощью технологии рекомбинантных ДНК. В настоящее время именно такой инсулин широко применяется в медицинской практике.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Дайте определение генной инженерии.
- 2) Получение соматотропина, его биологическая роль.
- 3) Получение генно-инженерного инсулина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.

Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.

2. Блинов, В.А. Общая биотехнология / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162с.

3. Блинов, В.А. Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: Полиграфия Поволжья, 2003. – 196 с.

4. Блинов, В.А. Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах / В.А. Блинов. – Саратов: Гарнитура Таймс, 2008. – 102 с.

5. Волова, Т.Г. Биотехнология: электронное издание, ссылка доступа:
<http://polnotext.ru/volova-t-g-biotechnologiya/volova-t-g-biotechnologiya-glava-2-promishlennaya-mikrobiologiya-protsessi-proizvodstva-poleznich-veschestv>

6. *Живухина, Е.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для высших учебных заведений / Е.А. Живухина, Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 506 с.
7. *Кузьмина, Н.А.* Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Электронное издание, 2010.
8. *Орехов, С.Н.* Биотехнология: учебное пособие / С.Н. Орехов, Ю.О. Сазыкин, И.И. Чакалева. – М.: Электронное издание, 2006.
9. *Сазыкин Ю.О.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

Лекция 9

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ

9.1. Продуценты антибиотиков

Как известно, каждый антибиотик играет специфическую роль в метаболизме своего продуцента. Японский исследователь Умегава, открывший несколько ценных для практики антимикробных и противоопухолевых антибиотиков, даже выдвинул гипотезу об антибиотиках как о случайных для штамма веществах. Он предположил, что гены биосинтеза антибиотиков могут быть локализованы во внехромосомных генетических элементах - плазидах и передаваться от одного вида микроорганизма другому путем конъюгации или, например, переноситься с помощью умеренных фагов широкой специфичности. В настоящее время гипотеза Умегавы отвергнута: гены биосинтеза антибиотиков считаются локализованными только в хромосомах.

Внимание привлекла новая концепция: у микроорганизмов, особенно это относится к актиномицетам, часть генов в геноме находится в «молчащем» состоянии. Они не экспрессируются, т.е. продукты, кодируемые этими генами, в том числе антибиотики, не синтезируются. Однако под влиянием различных воздействий тот или иной участок «молчащего» генома начинает работать. В результате получают объяснение причины образования различными штаммами одного вида разных антибиотиков, а также образование близких антибиотиков микроорганизмами разных видов. Конечно, это не означает, что любой актиномицет может образовать любые антибиотики. Однако концепция «молчащих» генов заставляет уже на современном молекулярном уровне вернуться к одному из положений, высказанных классиком науки об антибиотиках американским микробиологом З. Ваксманом. Он утверждал, что, выделив почвенный микроорганизм на искусственных питательных средах и культивируя его в условиях, отличных от природных, нельзя получить представления о полном биосинтетическом потенциале микроорганизма и о перечне образуемых им вторичных метаболитов. Однако моделирование природных условий - исключительно сложная задача. Во-первых, на микроуровне они мало изучены. Во-вторых, их разнообразие должно быть очень велико.

В лабораториях разных стран мира выделены и охарактеризованы десятки тысяч продуцентов антибиотиков. Как правило, продуцентами антибиотиков являются такие почвенные микроорганизмы как плесневые грибы, актиномицеты и спорообразующие бактерии.

Плесневые или «низшие» мицелиальные грибы отличаются от «высших» грибов отсутствием плодового тела. Плесневые грибы широко распространены в почве. Их относят к микроорганизмам эукариотам, имеющим оформленное, окруженное мембраной ядро. Плесневые грибы имеют также субклеточные структуры - митохондрии, где сосредоточены ферменты, катализирующие биоэнергетические процессы. Клеточная стенка грибов состоит из хитина - полимера, содержащего остатки аминокислот. В целом клетки грибов отличаются сложной организацией и большими размерами по сравнению с бактериальными клетками.

Плесневые грибы – многоклеточные микроорганизмы со сложным циклом развития. Они формируют разные виды мицелия, спораносцы со спорами и другие морфологические образования. Цикл развития грибов 6 - 7 сут. Плесневые грибы образуют сотни разных антибиотиков, однако в медицинской практике применяются лишь отдельные из них. Важнейшая группа антибиотиков, образуемых грибами, - пенициллины и

цефалоспорины. Их объединяют под названием беталактамные антибиотики, так как важнейшая часть их молекулы, от которой зависит антимикробная активность, реакционно-способное четырехчленное беталактамное кольцо (циклический амид).

Беталактамное кольцо получило свое название ввиду того, что при его образовании происходит замыкание связи между углеродом карбоксильной группы аминокислоты и азотом аминогруппы, находящейся при бетауглеродном атоме. Беталактамные антибиотики образуются двумя родами плесневых грибов: *Penicillium* (отсюда - пенициллины) и *Cephalosporium* (цефалоспорины). В настоящее время предпочитают вместо *Cephalosporium* использовать название *Acremonium*. Широко известны два продуцента беталактамов: *Penicillium chrysogenum* и *Acremonium chrysogenum*.

У пенициллинов с беталактамной структурой сконденсировано пятичленное кольцо, содержащее серу, а у цефалоспоринов — шестичленное. К грибам относится продуцент еще одного антибиотика, применяемого в медицинской практике. Представитель рода *Fusidium*, а именно *Fusidium coccineum* образует антибиотик стероидной структуры — фузидиевую кислоту.

Необходимо отметить еще один ценный лекарственный препарат, образуемый грибами. На рубеже 1970—1980-х гг. из гриба рода *Tolurocladium* был выделен циклопептид, проявлявший слабую антимикробную активность, поэтому «забракованный» как антибиотик. Однако он оказался высокоэффективным в качестве иммуносупрессора. Циклопептид, получивший название циклоспорин (точнее циклоспорин G), широко используется при пересадке органов и тканей, а также при лечении некоторых аутоиммунных заболеваний.

Название «актиномицеты» отражает распространенное ранее неправильное представление об этих микроорганизмах как о лучистых грибах.

Установлено, что актиномицеты стоят гораздо ближе к бактериям, чем к грибам. Они являются прокариотами. Их геном не заключен в ядро, а представляет кольцевую хромосому, не отделенную от цитоплазмы ядерной мембраной.

Клетки актиномицетов не содержат также и митохондрий. Их клеточная стенка построена из гетерополимера - пептидогликана. Все это сближает актиномицеты с бактериями. Однако актиномицеты в отличие от «истинных» бактерий (эубактерий) являются многоклеточными организмами со сложным циклом развития. Обычно за 5—6 сут. актиномицеты образуют спороносны и споры.

Актиномицеты являются продуцентами огромного количества (около 4000) разнообразных антибиотиков.

Актиномицетами образуется большинство антибиотиков, применяемых в медицинской практике. Ряд видов, относящихся к родам *Streptomyces* и *Micromonospora*, образуют антибиотики аминогликозидной структуры, к которым принадлежат: стрептомицин, гентамицин, неомицин, канамицин и ряд других антибиотических веществ с широким спектром антибактериального действия, получивших широкое распространение в клинике. В молекуле аминогликозидов обязательно присутствуют:

- остаток шестичленного аминоклиптола;
- остатки сахаров и/или аминсахаров.

Кроме природных аминогликозидов в медицинской практике в настоящее время используются и полусинтетические аминогликозидные антибиотики, т.е. продукты химической модификации природных аминогликозидов.

Все они близки по спектру антибактериального действия, все всасываются при приеме внутрь, однако некоторыми преимуществами (лучшей переносимостью) обладает

тетрациклин. Как видно из их формул, они содержат структуру из четырех циклов и разнятся только по «верхней», но не по «нижней» периферии молекулы.

Верхняя периферия тетрациклиновой молекулы была модифицирована химическим путем, что позволило получить полусинтетические тетрациклины - доксициклин, миноциклин и метациклин (первый из них длительно циркулирует в крови, второй обладает повышенной антибактериальной активностью).

Широко известны образуемые актиномицетами антибиотики макролидной структуры, содержащие макроциклическое лактонное кольцо и сахара и/или аминсахара. В частности, к ним относится эритромицин А (продуцент *Streptomyces erythraeus*);

Эти антибиотики хорошо всасываются при приеме внутрь. Они высокоэффективны только против грамположительных бактерий, так как являются антибиотиками узкого спектра действия.

Из актиномицета, первоначально названного *Streptomyces mediterranei*, а позднее отнесенного к виду *Nocardia mediterranea*, выделены антибиотики сложной анзамииновой структуры. У них имеется нафталиновое «ядро» и длинная алифатическая цепь, соединенная с ароматической частью эфирной и амидной связями. Наибольшую известность из них получил рифампицин, или рифампин, который является, однако, полусинтетическим антибиотиком.

Рифампицин успешно применяется в лечении туберкулеза. Актиномицеты, помимо антибактериальных антибиотиков, образуют также и антибиотики, подавляющие рост грибов и дрожжей, в том числе патогенных. Представители рода *Streptomyces*, например, *Streptomyces noursei*, являются продуцентами противогрибковых антибиотиков, относящихся к полиеновым макролидам. Макроциклическое лактонное кольцо содержит у этих антибиотиков ряд сопряженных двойных связей.

В молекулу полиеновых антибиотиков входят и аминсахара. Полиеновые антибиотики широко известны в медицинской практике. Вследствие их высокой токсичности полиены применяются в основном наружно или перорально.

Нередко при пероральном применении их используют вместе с антибактериальными антибиотиками для того, чтобы предотвратить быстрое размножение дрожжей после подавления роста бактерий. Актиномицеты образуют ряд противоопухолевых антибиотиков. Из них свыше десяти нашли применение при лечении некоторых форм рака. Так, *Streptomyces verticillius* образует антибиотик блеомицин сложного гликопептидного строения. Наиболее важной в настоящее время считается группа антрациклинов.

Аэробные спорообразующие грамположительные бактерии (бациллы) относятся к собственно бактериям. Как и все бактерии, они не имеют ядра. Их кольцевая хромосома имеет меньшие размеры, чем у актиномицетов. Их геном соответственно более прост, т.е. содержит меньшее, чем у актиномицетов количество генов, и тем более, у грибов. Бактерии не имеют митохондрий. Их клеточная стенка близка по составу к клеточной стенке актиномицетов и состоит из пептидогликана. Жизненный цикл бактерий значительно короче жизненного цикла грибов и актиномицетов - около полутора суток.

Открыто более тысячи антибиотиков бактериального происхождения. Большинство из них представлены пептидами и циклопептидами.

Позднее из другого вида почвенных споровых бактерий (*Bacillus polymyxa*) был выделен также нашедший применение в медицинской практике антибиотик полимиксин В - представитель ряда полимиксинов, в который входят свыше 20 соединений, различающихся по отдельным аминокислотным остаткам, а также по входящему в их молекулу остатку жирной кислоты. В структуре полимиксина В присутствуют три фрагмента:

циклопептид, линейный трипептид, остаток 6-метил октановой кислоты (непептидная часть молекулы).

В отличие от грамицидина полимиксин В используется не только для местного, но и для внутримышечного введения. В целом антибиотики, образуемые почвенными споровыми бактериями, не столь разнообразны, как антибиотики актиномицетов, и в медицинской практике они играют меньшую роль.

9.2. Механизмы биосинтеза антибиотиков

Три основных обстоятельства определяют особенности биосинтеза, общие для всех антибиотиков:

- антибиотики не относятся к прямым продуктам трансляции или вообще матричного синтеза;
- антибиотики как вторичные вещества образуются из первичных метаболитов;
- биосинтез молекулы любого антибиотика происходит с участием ряда ферментов.

Координация действия ферментов, т.е. обеспечение правильной последовательности ферментативных реакций, обеспечивается разными путями. Один путь, доказанный на примере биосинтеза циклопептидных и некоторых других антибиотиков, связан с тем, что синтез или сборка антибиотической молекулы происходит в мультиферментных комплексах с упорядочением расположенными ферментами. Первичные метаболиты «входят» в мультиферментный комплекс, в котором происходит ряд их превращений. Из комплекса «выходит» или завершенная молекула антибиотика, или ее крупный фрагмент, например, специфический агликон того или иного антибиотика и т. п. При «сборке» углеродного скелета молекулы антибиотика могут происходить различные реакции: метилирование или деметилирование; карбоксилирование или декарбоксилирование; аминирование или дезаминирование.

Предшественниками беталактамных антибиотиков являются аминокислоты. Началом формирования беталактамной молекулы является синтез так называемого LLD-трипептида из трех L-амино-кислот - первичных метаболитов - L-аминоадипиновой кислоты, L-цистеина и L-валина.

Затем LLD-трипептид превращается в моноциклический беталактам, т.е. происходит замыкание беталактамного кольца. Следующий этап — появление пятичленного серосодержащего кольца, сконденсированного с беталактамным. Все это означает участие в биосинтезе антибиотика новых ферментов. В случае образования бензилпенициллина необходимо присутствие фенилуксусной кислоты (в активированной форме), в результате чего освобождаются аминокислоты и кофермент А.

Во втором случае происходит «экспансия» - расширение пятичленного кольца до шестичленного, что катализируется специфическим ферментом, получившим название «экспандаза». Далее, в результате еще ряда реакций формируется молекула цефалоспорины С.

Вышеперечисленные реакции биосинтеза демонстрируются как пример, чтобы еще раз подчеркнуть основополагающий тезис: молекула любого антибиотика синтезируется с обязательным участием ряда (5-10 и более) ферментов.

На основании анализа структурных формул аминогликозидов — стрептомицина и гентамицинов и других можно предположить, что их предшественником является глюкоза. Действительно, как показали многочисленные исследования, из глюкозы синтезируются не только остатки сахаров в молекулах аминогликозидов, но и **их** аминокислоты.

тольный фрагмент. Два других фрагмента молекулы стрептомицина - пентоза (стрептоза) и L-глюкозамин так же образуются из глюкозы за счет ряда ферментативных реакций. Наконец, сборка молекулы стрептомицина из трех компонентов - стрептидина, стрептозы и L-глюкозамина (замыкание между ними гликозидных связей) требует специфических ферментов. В биосинтезе стрептомицина и большинства других аминогликозидных антибиотиков участвуют не менее 20 ферментов.

Описывая ферментативные реакции биосинтеза тетрациклиновой структуры, обычно проводят аналогию с биосинтезом первичных метаболитов - жирных кислот, из остатков ацетатных или пропионатных единиц по принципу «голова к хвосту», когда формируется связь между углеродом карбоксильной группы и углеродом метильной группы (или метиленовой группы) следующей единицы. В этих ферментативных реакциях участвует кофермент А.

Существуют и принципиальные отличия между синтезом жирных кислот и антибиотиков - вторичных метаболитов. При биосинтезе антибиотиков не происходит восстановления карбонильных групп после реакции конденсации или такое восстановление происходит до образования гидроксильной группы или двойных связей. При полном восстановлении образуются ароматические структуры; при неполном - макроциклические лактоны. Таким образом, имеется определенная связь между «биогеозом» таких соединений, как тетрациклины и антибиотики-макролиды. Скелет молекулы тетрациклинов строится из одной малонамидной единицы и восьми малонатных.

Основа структуры лактонного макроциклического кольца эритромицина образуется как результат ферментативной полимеризации одной единицы пропионата и шести единиц метилмалоната. Сахара эритромицина происходят из глюкозы за счет ряда ферментативных превращений. В биосинтезе участвуют ферменты сборки молекулы из макроциклического лактона и *сахаров*.

Методы генной инженерии с успехом используются при создании продуцентов рекомбинантных белков, так как белки - прямые продукты трансляции. В целом остается справедливым правило: один ген - один белок, т.е. один «структурный» ген определяет структуру (последовательность аминокислот) одного белка.

Антибиотики не являются прямыми продуктами трансляции в отличие от ферментов биосинтеза антибиотиков. Количество таких ферментов достигает нескольких десятков. Таким образом, в биосинтезе молекулы антибиотика принимают участие десятки «структурных» генов.

9.3. Биотехнология антибиотиков

Фактически ни один продуцент, выделенный из почвы или другого природного источника, непосредственно в производстве использован быть не может. Природный штамм образует лишь незначительные количества антибиотиков. Обработкой мутагенами и многоступенчатым отбором (селекцией) активных вариантов обычно удается повысить активность штамма, так как количество образуемого им антибиотика увеличивается в тысячи и даже десятки тысяч раз. Например, у продуцента пенициллина в результате десятков лет селекционной работы во многих лабораториях разных стран мира активность повысилась от десятков микрограммов до десятых долей грамма антибиотика в миллилитре среды.

У промышленных мутантных штаммов (рабочий термин «суперпродуценты») антибиотик, образуемый в огромном количестве, не должен влиять: на собственный биосинтез; жизнедеятельность своего продуцента.

Как известно, избыточное образование метаболита ведет к прекращению его биосинтеза по принципу обратной связи. В случае суперпродуцентов механизм обратной связи исключен.

Жизнедеятельность суперпродуцентов сохраняется в результате разных причин: максимум концентрации антибиотика достигается, когда рост культуры либо завершается, либо практически уже завершен; антибиотик синтезируется в местах клетки, отделенных от мест локализации жизненно важных метаболических процессов; после выхода антибиотика из мицелия в среду вновь в мицелий он не проникает, т.е. транспорт антибиотика через оболочку продуцента имеет одностороннее направление.

Однако свойство образовывать избыточные количества антибиотиков нестойко, оно легко теряется полностью или частично, поэтому промышленные продуценты хранят в особых условиях, периодически проверяя их активность. При необходимости их рассеивают на отдельные колонии, из которых затем отбираются наиболее активные.

При разработке биотехнологии антибиотиков учитываются общие свойства продуцентов, а также, что каждый антибиотик является конечным продуктом длинной цепи специфических ферментативных реакций.

Продуценты большинства антибиотиков, в том числе важнейших для медицинской практики, являются аэробами или (реже) факультативными анаэробами. В связи с этим в первые годы после получения пенициллина, грамицидина С и некоторых других веществ их продуценты выращивали на поверхности жидкой питательной среды в стационарных условиях в микробиологических матрацах или колбах, помещаемых в термостат или термостатные комнаты. Культура продуцента росла только на поверхности среды. Этот способ был трудоемок, не экономичен и не позволял нарабатывать антибиотик в больших количествах. Очень скоро поверхностная ферментация была заменена на глубинную. Через питательную среду пропускали воздух и среду непрерывно перемешивали. Это позволило использовать для роста продуцента весь объем среды.

Только глубинная ферментация создала возможность современного биотехнологического производства с выпуском конечного продукта в большом количестве.

Кривые накопления биомассы продуцента и антибиотика в культуральной жидкости, а также и в мицелии продуцента, не совпадают во времени. Вторая кривая значительно запаздывает.

Это относится к продуцентам всех важнейших антибиотиков: грибам, актиномицетам, споровым бактериям. Первая фаза развития культуры продуцента во время ферментационного процесса была названа «трофофаза» - фаза сбалансированного роста. Вторая - «идиофаза» или фаза несбалансированного роста. В течение трофофазы антибиотик в культуральной жидкости не обнаруживается или обнаруживается в незначительных количествах. Во время идиофазы прирост биомассы замедляется. Наступает быстрое накопление антибиотика в культуральной жидкости. В трофофазе источники углерода и азота в среде быстро потребляются, и количество их в среде уменьшается. В идиофазе их потребление замедляется, а в конце идиофазы происходит частичный лизис густой культуры мицелия.

Одновременно в культуре можно обнаружить и некоторое количество новых нитей молодого мицелия, который находится уже в условиях среды, обедненной питательными веществами, и участвует в биосинтезе антибиотика.

Таким образом, интенсивному биосинтезу антибиотика способствует значительное уменьшение в среде источников углерода и азота, особенно легко усваиваемых. Происходит дерепрессия ферментов синтеза антибиотика. Однако выращивание продуцентов

с самого начала ферментации на обедненных средах нецелесообразно, так как незначительное накопление биомассы в течение трофофазы ведет в конечном счете и к незначительному накоплению антибиотика малым количеством клеток продуцента.

Для высокопродуктивной ферментации необходимо соблюдать определенные условия. Продуценты антибиотиков выращивают на разных средах как относительно простого состава, так и сложного. Последние получили название комплексных сред. В них могут входить соевая или хлопковая мука, кукурузный экстракт и другие природные многокомпонентные источники питательных веществ. Также в среды вносят индивидуальные органические соединения и минеральные соли. Для каждого штамма-продуцента состав оптимальной для биосинтеза антибиотика среды подбирается отдельно. Это относится даже к штаммам одного вида, продуцирующим один и тот же антибиотик. Существуют и некоторые общие закономерности, учитываемые при работе с большинством продуцентов.

Углеродкатаболитная регуляция является одним из механизмов, воздействующих на биосинтез вторичных метаболитов. Известно, что глюкоза - лучший источник углерода и энергии для любых организмов. Однако быстрый катаболизм глюкозы резко снижает биосинтез антибиотиков. Показано, что глюкоза ослабляет биосинтез беталактамов, аминогликозидов и многих других антибиотиков, образуемых разными продуцентами. Относительно биосинтеза антибиотиков отметим, что глюкоза, фруктоза, сахароза и галактоза - сильные репрессоры этого процесса. Необходимо подчеркнуть, что продукты катаболизма глюкозы подавляют не активность ферментов биосинтеза антибиотиков, а сам синтез этих ферментов. Медленно утилизирующиеся полисахариды (крахмал и др.) более благоприятны для биосинтеза антибиотиков. Не является репрессором биосинтеза и лактоза, которая также медленно утилизируется: при ее гидролизе освобождающаяся глюкоза репрессирует бетагалактозидазу и, в результате, гидролиз лактозы (появление в среде глюкозы) замедляется.

Высокое содержание в среде фосфора (в виде неорганических фосфатных солей) неблагоприятно для биосинтеза большинства антибиотиков. Общая причина этого - обогащение клетки макроэргическими фосфорными соединениями (прежде всего АТФ), что повышает скорость роста мицелия. Накапливается много биомассы, но относительно мало антибиотика. Например, высокоактивные штаммы продуцентов тетрациклиновых антибиотиков содержат в мицелии меньше АТФ и растут медленнее, чем исходные низкоактивные продуценты тетрациклинов. Неблагоприятное действие фосфора на биосинтез беталактамных антибиотиков объясняется на биохимическом уровне следующим механизмом: образование LLD-трипептида - ключевого соединения, с которого начинается синтез пенициллинов и цефалоспоринов, ингибируется глюкозо-6-фосфатом. Взаимодействие легкоокисляемого сахара и фосфата оказывает отрицательный эффект на биосинтез. Однако все вышеизложенное не означает, что фосфор может быть полностью исключен из среды. Биосинтез антибиотиков снижается при его избыточном количестве, поэтому для каждого штамма-продуцента подбирается оптимальное содержание фосфора в среде.

Аммоний и другие легкоутилизуемые источники азота подобно легкоокисляемым углеводам усиливают рост продуцентов беталактамных, полиеновых антибиотиков (эритромицина, рифамицинов и др.), но отрицательно влияют на их биосинтез. Соевая и хлопковая мука, БВК (белково-витаминный концентрат) медленно расщепляются в процессе ферментации, т.е. из них медленно высвобождаются аминокислоты и ионы аммония, поэтому их используют в качестве компонентов питательных сред, что позволяет получать высокий выход антибиотиков. Механизм отрицательного действия

легкоусвояемых источников азота на биосинтез антибиотиков не ясен. Есть данные, что у продуцентов беталактамов он связан с уровнем глутаминсинтетазы в мицелии. Известно, что глутамин является донором аминогрупп для ряда аминокислот, а сами аминокислоты, в свою очередь, являются предшественниками беталактамных антибиотиков. Вероятно, что у разных продуцентов механизм этого действия на биосинтез различен. В любом случае неблагоприятное действие легкоусвояемых источников азота на биосинтез обязательно учитывается при подборе сред, а также осуществляется контроль количества таких соединений.

Некоторые первичные метаболиты являются прямыми предшественниками антибиотиков, например, валин включается в трипептид, из которого формируются беталактамные структуры. При избытке валина и высокой концентрации его в мицелии происходит подавление валином собственного биосинтеза по принципу обратной связи. Находясь в избытке, он подавляет активность ацетогидроксисинтетазы — первого фермента своего биосинтетического пути. Однако в результате снижается и образование трипептида, т.е. в конечном счете и беталактамного антибиотика.

Некоторые же первичные метаболиты являются конечными продуктами разветвленного метаболического пути. Одно «ответвление» или один конец этого пути заканчивается первичным метаболитом, другое «ответвление» - антибиотиком. Так, альфа-аминоадипиновая кислота является, с одной стороны, прямым предшественником лизина, с другой - беталактамного антибиотика, так как включается в исходный для его синтеза трипептид. При избытке лизина происходит подавление образования альфа-аминоадипиновой кислоты по принципу обратной связи и, таким образом, снижается синтез не только лизина, но и беталактамного антибиотика.

Эти примеры показывают, что у высокоактивных штаммов продуцентов антибиотиков, полученных генетическими методами, должны быть нарушены механизмы обратной регуляции биосинтеза тех первичных метаболитов, которые необходимы для образования антибиотической молекулы. Можно отметить, например, что лизин подавляет биосинтез пенициллина у низкоактивных продуцентов. Полученные из них же «изогенные» высокоактивные штаммы уже не отвечают на избыток лизина в среде снижением биосинтеза антибиотика.

Важность аэрации для обеспечения роста продуцентов на стадии ферментации обусловлена тем, что большинство из них - аэробы. Кислород необходим для биосинтеза ряда антибиотиков, так как последний расходуется при замыкании беталактамного и тиазолидинового колец во время биосинтеза беталактамной структуры. Например, для образования изопенициллина-*N* из LLD-три-пептида молекулярный кислород необходим в стехиометрическом отношении 1: 1 (предельное насыщение кислородом культуральной жидкости 30%). Когда ферментация идет успешно, кислород потребляется со скоростью 1 ммоль/(л * мин). В целом потребность в кислороде зависит от концентрации биомассы и ее метаболической активности. Оптимизация снабжения кислородом достигается увеличением скорости его переноса.

После стадии ферментации культуральная жидкость содержит растворенный антибиотик, мицелий продуцента, продукты его лизиса, ряд компонентов неиспользованной питательной среды, в том числе высоко- и низкомолекулярные органические вещества и неорганические соли.

Иногда антибиотик содержится не только в культуральной жидкости, но и в мицелии. Культуральная жидкость нередко отличается высокой вязкостью. Поэтому выделить антибиотик из столь сложной гетерогенной системы непросто.

В историческом аспекте можно отметить, что именно неудача химиков при выделении и очистке пенициллина отдалила на десятилетие его внедрение в медицинскую практику. Используемые в настоящее время методы и последовательность операций выделения и очистки разрабатываются применительно к конкретному антибиотику и определяются его физико-химическими свойствами: локализацией, составом культуральной жидкости, ее реологическими и другими характеристиками.

На стадии предварительной обработки культуральной жидкости отделяют растворенный антибиотик от суспензии мицелия и компонентов культуральной жидкости, находящихся в коллоидном состоянии. Если часть антибиотика находится в мицелии, его переводят в водную фазу, например, изменяя рН культуральной жидкости (в случае тетрациклинов). Иногда, наоборот, растворенный и связанный с мицелием антибиотик объединяют в общем осадке, из которого антибиотик затем экстрагируют. Отделяют нативный раствор от мицелия и коллоидных частиц методами фильтрации или центрифугирования, для чего используют барабанные вакуум-фильтры, фильтр-прессы, сепараторы разных конструкций и т.д.

На следующей стадии ставится задача получения антибиотика в виде индивидуального вещества. При этом необходимо учитывать довольно высокую лабильность многих антибиотиков, что ограничивает условия их выделения.

Принцип экстракции органическим растворителем используется при очистке таких важнейших антибиотиков, как пенициллин, эритромицин и некоторых других. При переходе в органический растворитель соответствующие антибиотики освобождаются сразу от многих примесей. Варьируя рН и меняя таким образом растворимость антибиотика в воде (точнее, в буферном растворе), можно многократно переводить антибиотик из одной фазы в другую, освобождаясь каждый раз от определенного количества примесей.

Один из примеров окончания процесса при экстракционном методе выделения и очистки — извлечение пенициллина из органического растворителя бутилацетата, где он находится в виде свободной кислоты: к бутилацетату добавляют насыщенный водный раствор ацетата калия. Выпадает калиевая соль пенициллина. Кристаллы промывают бутанолом и высушивают.

Также при очистке антибиотиков широко используются ионообменные смолы (катиониты и аниониты). Особое значение эти сорбционные методы сыграли в свое время в решении проблемы получения в высокоочищенном виде аминогликозидных антибиотиков - стрептомицина и других, имеющих свойства оснований. Аминогликозиды слаборастворимы в органических растворителях, и вследствие этого экстракционный метод применительно к ним не может быть использован. В производстве стрептомицина могут быть, например, успешно использованы карбоксильные катиониты в натриевой форме. Десорбция осуществляется раствором серной кислоты. После дополнительной процедуры, связанной с пропусканием стрептомицина через сульфокатионит (для удаления ионов натрия), получают сульфат стрептомицина.

Помимо традиционных экстракционных и сорбционных методов при выделении и очистке антибиотиков все большее значение приобретает комплекс приемов, объединяемых под названием мембранной технологии.

При обезвоживании препаратов антибиотиков в зависимости от свойств антибиотика используют лиофильную или распылительную сушку. В последнем случае раствор антибиотика распыляется из форсунок до частиц диаметром 5 - 25 мкм в токе нагретого до 160 °С воздуха. Сушка происходит в течение долей секунды. Затем препарат фасуют в стерильные флаконы с соблюдением условий, гарантирующих стерильность.

Так как биосинтез антибиотиков ведется в асептических условиях, то при выделении, очистке и получении лекарственных форм также соблюдаются максимально возможные предосторожности против контаминации. Тем не менее проблема стерильности инъекционных препаратов и обсемененности препаратов для наружного применения остается одной из самых сложных для производства как антибиотиков, так и лекарственных средств в целом. Поэтому при обнаружении расфасованных, нестерильных серий препаратов иногда применяют метод радиационной стерилизации, учитывая нестандартность сложившейся ситуации. Определенные виды ионизирующей радиации допустимы для стерилизации лекарственных средств. Соответствующие указания имеются в официальных фармакопейных документах.

Хорошо известно, что ионизирующей радиацией стерилизуются хирургические инструменты, резиновые перчатки, шприцы одноразового пользования и т.п. Следует подчеркнуть, что при такой стерилизации (в минимальных дозах) загрязняющие препарат микроорганизмы теряют способность к размножению и гибнут вследствие повреждения ДНК (происходят сшивки между нуклеотидами, а также разрывы ДНК). При термической стерилизации в отличие от радиационной происходит денатурация многих белков клетки, в результате чего ее повреждения становятся более многочисленными; при стерилизации путем мембранной фильтрации микробные клетки не погибают, а удаляются из лекарственного препарата.

Как уже отмечалось, радиационная или лучевая (жаргонный термин) стерилизация используется на отдельных производствах ввиду объективных трудностей при внедрении технологии получения нового препарата, а иногда и по экономическим причинам. Установлено, что стерилизующая доза ионизирующего облучения составляет 2,5 Мрад (1 рад = 100 эрг/г).

Специалист с высшим фармацевтическим образованием должен занимать четкую и грамотную позицию в отношении бытующей радиофобии, выражающейся в том, что радиационная стерилизация может якобы привести к наведенной радиоактивности облученных препаратов. Разрешенные для стерилизации лекарств гамма-лучи изотопа кобальта (^{60}Co) и быстрые электроны с энергией не выше 5 МэВ, получаемые на ускорителях, не могут вызвать наведенной радиации у обработанных ими препаратов независимо от поглощенной дозы облучения, так как неспособны расщепить атомное ядро.

Гамма-лучи (^{60}Co) в воздухе распространяются на несколько десятков метров, в воде - на несколько десятков сантиметров, в свинце - на несколько сантиметров. На промышленной установке защитный слой воды, окружающий герметичную стерилизационную камеру, где находятся стандартные стержни с ^{60}Co длиной до 1 м и упаковки со стерилизуемым лекарственным препаратом, должен составлять несколько метров. Стерилизационная камера снабжена автоматизированным дистанционным управлением, позволяющим вдвигать в нее и удалять из нее стержни с кобальтом, разъединяя таким образом источник облучения и упаковки со стерилизуемым препаратом. Режим стерилизации обычно подбирается с таким расчетом, чтобы стерилизующая доза (2,5 Мрад) набиралась облучаемым препаратом примерно за сутки. При этом следует иметь в виду, что период полураспада ^{60}Co составляет около пяти лет. Естественно, что работа на установках с радиоактивным кобальтом постоянно требует особых мер предосторожности.

Установка, где для стерилизации используются быстрые электроны, во многом принципиально отличается от рассмотренной. Проникающая способность электронов, разогнанных до разрешаемого для стерилизации лекарств показателя, невелика. Электроны не могут «пронизать» несколько рядов флаконов или ампул. Чтобы набрать сте-

рилизующую дозу в 2,5 Мрад, требуются секунды или доли секунд. Поэтому флаконы подают по одному с помощью транспортера к соответствующему «окошку», через которое в них набирается стерилизующая доза. После выключения такая стерилизационная установка становится абсолютно безопасной в радиационном отношении.

Значительный опыт по использованию радиационной стерилизации биотехнологических препаратов накоплен при обработке антибиотиков: стерилизации подвергались расфасованные по флаконам лиофильно высушенные субстанции, соли антибиотиков и их препараты с разными наполнителями.

В ряде случаев препараты искусственно заражали микроорганизмами разных видов и их спорами. Стерилизующая доза в 2,5 Мрад обуславливала гарантированную стерильность. При этом облученные препараты — большинство антибиотиков (природные и полусинтетические пенициллины, аминогликозиды, тетрациклины и ряд других) сохраняли активность и удовлетворяли фармакопейным тестам. Исключение составляли полиены, т.е. структуры с сопряженными двойными связями (например, нистатин, который при облучении заметно терял активность).

При сравнении их с необлученными препаратами можно было выявить некоторые отличия: белые (бесцветные) порошки теряли «блестящий» оттенок, приобретая матовый, а порошки красного (актиномицины) и желтого (тетрациклины) цвета тускнели.

Под влиянием облучения изменяется и кристаллическая решетка стекла. Оно темнеет, мутнеет и приобретает, таким образом, непривлекательный с коммерческой точки зрения вид, хотя полностью сохраняет свои функциональные качества. Потемнение обратимо, но при комнатной температуре исчезает медленно (в течение нескольких месяцев). Не выпускать облученные препараты в течение такого срока в аптечную сеть — значит сократить для потребителя срок годности облученных серий. Теоретически для изготовления флаконов и ампул можно использовать стекло с некоторыми редкоземельными элементами, однако это стекло слишком дорого для изготовления из него сотен миллионов единиц стандартных изделий.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Продуценты антибиотиков, их морфология.
- 2) Биотехнологические аспекты получения антибиотиков.
- 3) Механизмы биосинтеза антибиотиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.

Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.

2. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162с.

3. *Блинов, В.А.* Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: Полиграфия Поволжья, 2003. – 196 с.

4. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах / В.А. Блинов. – Саратов: Гарнитура Таймс, 2008. – 102 с.

5. *Волова, Т.Г.* Биотехнология: электронное издание, ссылка доступа:

<http://polnotext.ru/volova-t-g-biotechnologiya/volova-t-g-biotechnologiya-glava-2-promishlennaya-mikrobiologiya-protsessi-proizvodstva-poleznich-veschestv>

6. *Живухина, Е.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для высших учебных заведений / Е.А. Живухина, Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 506 с.

7. *Кузьмина, Н.А.* Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Электронное издание, 2010.

8. *Орехов, С.Н.* Биотехнология: учебное пособие / С.Н. Орехов, Ю.О. Сазыкин, И.И. Чакалева. – М.: Электронное издание, 2006.

9. *Сазыкин Ю.О.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

Лекция 10

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИТАМИНОВ

10.1. Биологическая роль витаминов

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 микробными 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.

10.2. 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 слабым 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 (NH)₄ОН. 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 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, взаимосвязано расщепляющих органический субстрат до СО₂ и СН₄: углеводосбраживающих, аммонифицирующих, сульфатовосстанавливающих и собственно метанобразующих бактерий. В качестве субстрата используют декантированную ацетонобутиловую барду, содержащую 2.0-2.5 % сухих веществ. Брожение проходит при 55-57°C 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.

10.3. 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 синтезированная 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 течение 7 суток при 28°C 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 рН 4.0-4.5. После утилизации углеродного субстрата продуцент начинает утилизировать кислоты; рН 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 генно-инженерным методом штамм *Bacillus subtilis* образует за 35 суток ферментации до 4 г/л рибофлавина.

10.4. Получение эргостерина

Эргостерин - (эргоста-5,7,22-триен-3 β -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. Спиртовой экстракт сгущают до 50 % концентрации сухих веществ, омыляют щелочью. Полученные кристаллы витамина очищают перекристаллизацией и

сушат в эфире. Кристаллический осадок растворяют в масле. Данный препарат используют в медицинских целях, эргостерин является также исходным продуктом для получения ряда стероидных гормонов, пищевых и лекарственных препаратов.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Роль витаминов в организме человека.
- 2) Получение водорастворимых витаминов.
- 3) Получение жирорастворимых витаминов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.

Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.

2. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162с.

3. *Блинов, В.А.* Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: Полиграфия Поволжья, 2003. – 196 с.

4. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах / В.А. Блинов. – Саратов: Гарнитура Таймс, 2008. – 102 с.

5. *Волова, Т.Г.* Биотехнология: электронное издание, ссылка доступа:
<http://polnotext.ru/volova-t-g-biotechnologiya/volova-t-g-biotechnologiya-glava-2-promishlennaya-mikrobiologiya-protsessi-proizvodstva-poleznich-veschestv>

6. *Живухина, Е.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для высших учебных заведений / Е.А. Живухина, Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 506 с.

7. *Кузьмина, Н.А.* Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Электронное издание, 2010.

8. *Орехов, С.Н.* Биотехнология: учебное пособие / С.Н. Орехов, Ю.О. Сазыкин, И.И. Чакалева. – М.: Электронное издание, 2006.

9. *Сазыкин Ю.О.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

Лекция 11

ПОЛУЧЕНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

11.1. Вторичные метаболиты

Характерной особенностью клеток растений является способность к синтезу соединений так называемого вторичного метаболизма, к которым относятся терпеноиды, полифенолы, алкалоиды, стероиды и др. Они синтезируются, как правило, в меньших количествах, чем вещества основного первичного обмена, и, кроме того, не участвуют в нем.

Впервые термины «первичные соединения» и «вторичные соединения» ввел немецкий биолог А. Коссель (1891). В своей лекции «О химическом составе клеток», прочитанной для Берлинского общества физиологов, он говорил: «Предлагаю называть соединения, имеющие важность для каждой клетки, первичными, а соединения, не присутствующие в любой растительной клетке, - вторичными».

Долгое время считалось, что вторичные метаболиты отличаются от первичных тем, что они:

- распространены в ограниченном числе видов растений;
- являются «конечными» продуктами первичного обмена;
- не имеют значения для образующей их клетки, но могут быть необходимы для целого растения.

В настоящее время установлена важная роль вторичных метаболитов в жизни растений. Они обнаружены у 20-30 тыс. их видов, т. е. у 10-15 % всей флоры Земли. Установлена структура уже около 100 тыс. индивидуальных веществ. Выяснено участие 15-25 % генов растительных организмов в их вторичном метаболизме. Все это свидетельствует о том, что считать эти соединения синтезированными «случайно» - неправильно.

Ученые-биологи достаточно долго не уделяли должного внимания вторичным соединениям. Гораздо больше знали о них провизоры, фармацевты и криминалисты, поскольку лекарственные и ядовитые свойства растений чаще всего обусловлены этими соединениями.

Вторичные соединения придают также вкус и аромат растениям. От их присутствия зависят окраска цветков многообразие «расцветки» окружающего нас мира. Многие из вторичных соединений используются в качестве лекарственных препаратов, вкусовых и ароматических добавок для пищевой и парфюмерной промышленности.

Все это свидетельствует о важном народнохозяйственном значении вторичных соединений, они могут найти широкое применение в биотехнологическом производстве. Рассмотрим основные классы вторичных соединений, синтезирующихся в клетках высших растений.

11.2. Терпены

Терпены (старое название - *изопреноиды*) – одни из наиболее распространенных в растениях вторичных веществ. Свое название получили от немецкого слова *terpentin* (скипидар), означающего смесь этих веществ.

К настоящему времени известно более 30 тыс. соединений данной группы вторичных метаболитов. Основным их структурным элементом является пятиуглеродное соединение – изопрен. Общая формула всех терпенов выражается как $(C_5H_8)_n$.

Все терпены подразделяют по единому структурному признаку - числу изопреновых единиц, входящих в состав их молекулы.

Среди терпенов встречаются также смешанные вещества, молекула которых состоит из терпеноидной и нетерпеноидной частей. Последняя может быть представлена тетрапирролом, как это характерно для хлорофилла и цитохрома, бензохиноном, что наблюдается в структуре убихинонов, а также аденином - в случае цитокининов. Такие соединения называют *меротерпенами*.

Большинство терпенов имеет название, отражающее тот растительный источник, откуда они были выделены впервые. Так, например, ментол впервые получили из растений мяты (*Mehta*), бетулапrenoлы - из листьев березы (*Betula*), авенастерин - из зерен овса (*Avena*).

Функции, выполняемые терпенами в клетках растений, чрезвычайно разнообразны. Так, важную физиологическую активность проявляют такие их представители, как цитокинины, гиббереллины и абсцизовая кислота. Моно- и сесквитерпеноидам часто приписывают аллелопатическую роль. Аллелопатия - это вредное действие одного растения (донора) на другое (реципиент). Стероиды, локализованные в клеточных мембранах растений, по-видимому, выполняют такую же функцию, как холестерин в мембранах животных клеток. Существует предположение, что стероиды стабилизируют мембраны и контролируют их проницаемость. Каротиноиды защищают клетки от фотодинамического повреждения и, кроме того, участвуют в поглощении света при фотосинтезе. Смешанные терпеноиды также играют ключевую роль в обмене веществ у растений: хлорофилл, лишенный своей фитольной боковой цепи, не эффективен; пластохинон участвует в фотосинтетическом транспорте электронов, а убихинон - в митохондриальном транспорте электронов. Полипренилпирофосфаты участвуют в процессе гликозилирования при образовании клеточных стенок.

11.3. Полифенолы

Фенольные соединения, или **полифенолы**, являются вторыми по распространенности в растительном мире представителями вторичных соединений. Эти вещества, так же как и терпены, обнаружены не только во всех растениях, но даже в каждой растительной клетке. В настоящее время число известных фенольных структур превышает девять тысяч.

Фенольные соединения содержат в своей молекуле бензольное ядро с одной или

несколькими гидроксильными группами. Их классификация зависит от числа ароматических колец (одно или два), а также от количества присоединенных к ним атомов углерода.

Фенольные соединения с одним ароматическим кольцом подразделяют на следующие классы:

- *соединения C₆-ряда* - не содержат в своей структуре дополнительных атомов углерода. К ним относятся *простые фенолы*, представителями которых являются фенол (в малых количествах образующийся в хвое сосны), пирокатехин (найден в листьях тополя) и флороглюцин (чешуя лука);

- *соединения C₆-C₁-ряда* - имеют в своей структуре один дополнительный атом углерода. К ним относятся *оксibenзойные кислоты* и их производные, которые часто называют фенольными кислотами или фенолокислотами, а также *лишайниковые кислоты* - специфические фенольные соединения, синтезируемые лишайниками;

- *соединения C₆-C₂-ряда* - соответствующие *альдегиды* и *спирты оксibenзойных кислот*, в их структуре присутствует два дополнительных атома углерода;

- *соединения C₆-C₃-ряда* — имеют три дополнительных атома углерода и составляют наиболее многочисленную и важную группу веществ, часто называемых *фенилпропаноидами*. К ним относятся *оксикоричные* (по международной номенклатуре - *гидроксикоричные*) *кислоты*, *оксикоричные* (гидроксикоричные) *спирты*, *фенилпропены*, а также *кумарины*, *изокумарины* и *хромоны* - соединения, у которых дополнительные атомы углерода замыкаются в конденсированное лактонное кольцо; некоторые фенилпропаноиды образуют димеры, т. е. соединения типа (C₆-C₃)₂, которые называют *лигнанами*.

Фенольные соединения с двумя ароматическими кольцами подразделяют на:

- *соединения C₆-C₁C₆-ряда* - имеют два ароматических кольца, соединенных мостиком из одного углеродного атома. К ним относятся *бензофеноны* и *ксантоны*;

- *соединения C₆-C₂-C₆-ряда* - имеют два ароматических кольца, соединенных двумя атомами углерода. К ним относятся *стильбены* (два ароматических кольца соединяются цепочкой из двух атомов углерода) и *антрахиноны* (дин ароматических кольца соединяются двумя атомами углерода с образованием центрального конденсированного (трегъего кольца);

- *соединения C₆-C₃-C₆-ряда* - имеют два ароматических кольца, соединенных тремя атомами углерода. Наиболее многочисленная группа фенольных соединений, представленная прежде всего *флавоноидами*, которые, в свою очередь, включают целый ряд подгрупп, в зависимости от степени окисления трехуглеродного кислородсодержащего (пиранового) кольца. К ним относятся *флавоны*, *антоцианы*, *флавононы*, *флавонолы*, *изофлавоноиды* и *неофлавоноиды*.

В особые группы выделяют димерные и полимерные фенольные соединения. Это *дубильные вещества* (таннины) и *лигнин*. Термин «таннины» был впервые использован для описания веществ, которые превращали сырые животные шкуры в кожу в процессе дубления (tannin). Связываясь с белками коллагена шкуры животных, таннины повышают устойчивость получаемой кожи к жаре, воде и микроорганизмам.

Наиболее распространенным полимером фенольных соединений в растениях является *лигнин*. В его образовании принимают участие три оксикоричных спирта: *кониферилловый*, *пара-кумаровый* и *синаповый*. В результате биохимических превращений они и образуют лигнин, который представляет собой сильно разветвленный полимер.

Для фенольных соединений характерно формирование огромного числа соединений за счет модификаций молекулы и образования конъюгатов с разнообразными структурами. Это может происходить за счет различного замещения в бензольных кольцах (к которым в различных положениях могут присоединяться группы -ОН, -ОСН₃), способности образовывать гликозиды с широким набором моно- и дисахаридов, а также наличия асимметричных атомов углерода. Фенольные соединения могут также связываться с органическими кислотами, растительными аминами, алкалоидами. Помимо этого, растительные фенолы взаимодействуют с изопреноидами, образуя большую группу *пренилированных фенолов*. Такие свойства фенольных соединений обеспечивают огромное разнообразие структур, характерное для растительных фенолов.

Фенольные соединения играют важную роль в самых различных физиологических процессах - фотосинтезе, дыхании, росте и защитных реакциях растительного организма. Кроме того, они выполняют механические и структурные функции (лигнин), а также являются аттрактантами для насекомых-опылителей и животных - распространители семян. Многие представители фенольных соединений обуславливают вкусовые качества растений. Особенно часто это отмечается для флавоноидов. Например, флавонон *нарингенин* придает горький вкус кожуре грейпфрута, тогда как другой флавоноин - *гесперидин*, обнаруженный в кожуре апельсина и мандарина, таких свойств не проявляет.

Во многих плодах (яблоки, груши, вишня, айва, персики, абрикосы) и ягодах (ежевика, земляника, брусника, смородина, малина, виноград) содержатся *катехины*, также относящиеся к соединениям флавоноидной природы. Наибольшее их содержание было отмечено в молодых побегах чайного растения (до 30 % на сухой вес). Катехины широко применяют в производстве какао, виноделии и особенно в чайной промышленности. Это связано с тем, что продукты окисления катехинов обладают характерной окраской и приятным слабоязвучившим вкусом. Кроме того, они проявляют Р-витаминную активность. Часто в растениях встречается рамноглюкозид кверцетина - *рутин*, используемый в медицине как капилляроукрепляющее средство.

У 200 природных флавоноидных веществ выявлено 40 видов биологического действия. В основном оно связано с их антиоксидантным и мембраностабилизирующим действием, а также влиянием на ферментные системы. Благодаря такой разнообразной активности флавоноидсодержащие растения служат сырьем для производства препаратов желчегонного, противоязвенного, капилляроукрепляющего, гипотомического действия. Флавоноиды применяют как антимуагены, противоопухолевые и антиаллергические препараты. Так, препарат *ревенол*, получаемый из коры приморской сосны, виноградных зерен и куркумы, обладает антиоксидантной активностью, в 50 раз превышающей таковую у α -токоферола. Разработанный на основе экстракта виноградных косточек французский препарат *эндотелон* используют для лечения онкологических заболеваний.

11.4. Алкалоиды

Алкалоиды представляют собой большую группу азотсодержащих вторичных ве-

шеств, найденных у 20 % видов сосудистых растений.

Термин «алкалоид» введен в 1819 г. немецким фармакологом В. Майсснером. Чтобы особая группа азотсодержащих веществ с щелочными свойствами не была классифицирована как щелочи (*alkali*), он предложил назвать её алкалоидами. Название происходит от арабского слова *alkali* – щелочь и греческого *eidos* - подобный.

Алкалоиды содержат азот, чаще всего в составе гетероциклического кольца. В настоящее время известно около 10 тыс. индивидуальных веществ.

Согласно *химической классификации*, алкалоиды - это соединения, содержащие один или несколько атомов азота в молекуле, что и придает им щелочные свойства. Обычно их подразделяют на две подгруппы: *протоалкалоиды*, которые содержат азот не в гетероцикле, и *истинные алкалоиды*, содержащие азот в гетероцикле.

Биохимическая классификация алкалоидов основана на их метаболизме. *Гликоалкалоиды*, а также ряд других алкалоидов (например, алкалоиды аконита) по типу синтеза и структуре фактически являются изопреноидами, поэтому было решено выделить их в особую группу - *изопреноидных псевдоалкалоидов*. В связи с этим сейчас принято подразделять алкалоиды на три подгруппы: *протоалкалоиды* (азот не в гетероцикле); *истинные алкалоиды* (азот в составе гетероцикла; *псевдоалкалоиды* (синтез не из аминокислот). Каждая подгруппа, в свою очередь, подразделяется на 3-10 классов.

Наиболее широко алкалоиды распространены среди покрытосеменных растений. Особенно богаты ими семейства маковых, пасленовых, бобовых, кутровых, мареновых, лютиковых. Во мхах, папоротниках и голосеменных алкалоиды встречаются относительно редко. Разные органы и ткани растения могут содержать разные алкалоиды. Обычно их концентрация невелика и составляет десятые и сотые доли процента. При содержании алкалоидов около 1-3 % растение считается богатым этими соединениями (алкалоидоносным). Только немногие растения, например культивируемые формы хинного дерева, могут накапливать до 15- % алкалоидов.

Алкалоиды могут оказывать токсическое действие на человека. Однако их малые дозы используют в качестве эффективных фармакологических препаратов (морфин, кодеин, эфедрин, атропин). Некоторые алкалоиды (никотин, кофеин) применяют как стимуляторы или седативные средства.

11.5. Гликозиды

Цианогенные гликозиды и глюкозинолаты также являются азотсодержащими веществами. Их иногда называют прототоксинами или фитоантисипинами. Они принимают непосредственное участие в защите растений от травоядных животных. При гидролизе цианогенных гликозидов специфичной гликозидазой выделяется синильная кислота.

Цианогенные гликозиды широко распространены в растительном царстве и часто встречаются у представителей бобовых, розоцветных и некоторых злаков. Их много также в крахмалистых клубнях маниока *Manihot esculenta*. Это важный пищевой продукт в ряде тропических стран. Клубни и мука маниока - обычная пища для аборигенов, которые научились в процессе приготовления избавляться от токсичных соедине-

ний.

Вторая важная группа растительных прототоксинов - *глюкозинолаты* - впервые была выявлена у растений семейства крестоцветных *Cruciferae*. В растении глюкозинолаты, так же как и цианогенные гликозиды, пространственно отделены от гидролизующих их ферментов. При повреждении растительных тканей происходит смешивание глюкозинолатов с соответствующими ферментами и превращение их в летучие токсичные вещества с горчичным запахом - *изотиоцианаты* и *нитрилы*. Образующиеся вещества функционируют как токсины и репелленты для травоядных животных. Большинство исследований, посвященных глюкозинолатам, выполнено на рапсе *Brassica napus*, коюрый служит важным источником для получения пищевого растительного масла в Северной Америке и Европе. Одна из основных задач селекционеров состоит в получении семян рапса с резко сниженным содержанием глюкозинолатов.

Таким образом, в растениях синтезируются различные соединения вторичного метаболизма. Их группы находятся в растении в динамическом состоянии, а содержание меняется от органа к органу в ходе онтогенеза. Поэтому, с одной стороны, при проведении скрининга желательнее собрать как можно больше образцов разных частей растений на разных фазах развития, а с другой - при интерпретации полученных данных необходимо сравнивать данные о содержании изучаемого соединения в сходных частях растений, отобранных на одной и той же фазе развития. Очевидно, что данные о динамике содержания вторичных метаболитов представляют непосредственный интерес при проведении хемотаксономических исследований.

Поскольку многие из вторичных метаболитов обладают высокой биологической активностью, они находят широкое практическое применение. И в этом плане перспективным источником их получения могут быть каллусные и суспензионные культуры высших растений.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Какие соединения относят к вторичным метаболитам?
- 2) Терпены, их структура и функции.
- 3) Перечислите основные классы фенольных соединений.
- 4) Перечислите основные группы алкалоидов.
- 5) Цианогенные гликозиды, их распространение и роль.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.

Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.
2. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162с.
3. *Блинов, В.А.* Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: Полиграфия Поволжья, 2003. – 196 с.
4. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах / В.А. Блинов. – Саратов: Гарнитура Таймс, 2008. – 102 с.
5. *Волова, Т.Г.* Биотехнология: электронное издание, ссылка доступа:
<http://polnotext.ru/volova-t-g-biotechnologiya/volova-t-g-biotechnologiya-glava-2-promishlennaya-mikrobiologiya-protsessi-proizvodstva-poleznich-veschestv>
6. *Живухина, Е.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для высших учебных заведений / Е.А. Живухина, Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 506 с.
7. *Кузьмина, Н.А.* Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Электронное издание, 2010.
8. *Орехов, С.Н.* Биотехнология: учебное пособие / С.Н. Орехов, Ю.О. Сазыкин, И.И. Чакалева. – М.: Электронное издание, 2006.
9. *Сазыкин Ю.О.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

Лекция 12

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКТИНОВ

12.1. Понятие “лектины”

Термин лектин был впервые предложен У. Бойдом в 60-х годах прошлого столетия. Лектин от латинского слова “legere” (выбирать), т.е. способность избирательно связываться с теми или иными углеводными рецепторами клеток. *Лектины* – это белки, не относящиеся к классу иммуноглобулинов, способные к обратимому связыванию с углеводной частью гликоконъюгатов без нарушения ковалентной структуры любых из узнаваемых гликозильных лигандов (от лат. “ligo” – связываю; в химии молекулы или ионы, принимающие участие в связывании). Первый лектин был выделен из клешевины (*Ricinus communis*) д-ром Германом Петером Штильмарком (1888 г.) в Дерпском университете (университет Российской империи конца позапрошлого века) и назван рицином. Г. В настоящее время растительные лектины найдены более чем у 800 видов растений в семенах листьях и др. частях.

Микробные лектины (агглютинины, адгезины, преципитины, некоторые микробные токсины и ферменты, белковые факторы, фимбрии) исследованы у более 130 видов (вирусы, бактерии, простейшие, грибы, причем у 100 видов изучена моносахаридная специфичность). Бактериальные лектины в настоящее время получены и изучены у представителей более 70 видов. Первая работа по обнаружению бактериальных лектинов (гемагглютининов) некоторых видов стафилококка и *Vibrio* относится к 1902 г. (Kraus, Ludwig). И лишь спустя десятки лет из этих бактерий были выделены и охарактеризованы различные лектины. Лектины найдены в различных тканях человека и млекопитающих (плаценте, гипофизе, поджелудочной железе, печени и т.д.). Т.е. лектины были обнаружены, выделены и охарактеризованы практически из всех живых организмов от вирусов до человека.

12.2. Классификация лектинов

Известны различные классификации лектинов в основе которых лежат следующие принципы:

- 1 – соотношение белка и углеводов в молекуле лектина,
- 2 – биологическая активность,
- 3 – происхождение,
- 4 – валентность и число субъединиц,
- 5 – домены (функциональные и структурные),
- 6 - антигенная специфичность,
- 7 – специфичность к моно- и дисахарам,
- 8 – специфичность к олисахаридам.

Существуют и другие классификации лектинов – по содержанию ионов металлов, S-S связей и т.д., однако наиболее важной является классификация по углеводной специфичности.

12.3. Роль лектинов в растениях

Лектины могут принимать участие в регуляции деления клеток при прорастании, в том числе в процессе органогенеза, при котором из семян формируется растение; лектины корневой системы выполняют роль защитников растений от болезнетворных микроорганизмов и низших грибов; лектины участвуют в углевод-белковом узнавании в системе азотфиксирующих систем (бактерия-растение).

12.4. Роль лектинов в организме животных

- Лектины – адгезины (лектины, находящиеся на поверхности бактерий и вирусов служат для того, чтобы избирательно связываться с клетками макро- и микроорганизмов и инфицировать их),

- исследование структуры клеточной поверхности (на поверхности мембраны расположены разнообразные углеводные рецепторы, их детекция специфическими лектинами – важный элемент в диагностике физиолого-биохимического состояния клетки),

- имея препараты с различной специфичностью, их можно использовать для исследования клеточной поверхности,

- эндогенные лектины могут менять функционирование в мембране ионных каналов т. о. воздействуют на серию метаболических реакций,

- способность лектинов взаимодействовать с ферментами или модуляторами ферментов в организме,

- лектины-ферменты (бифункциональные лектины),

- лектины являются митогенами, т.е. веществами, влияющими на циклы клеточного деления,

- лектины способны индуцировать синтез лимфоцитами разнообразных лимфокинов, биологически активных соединений, способных регулировать иммунологические реакции, рост клеток, миграцию макрофагов, цитотоксическое действие,

- лектины способны индуцировать образование интерферона Т-лимфоцитами, элиминировать из печени высших организмов гепатоциты и купферовские клетки, измененные в процессе старения,

- сигнальная роль лектинов,

- лектины семян бобовых (лейкоагглютинин фасоли) способны выступать в качестве пребиотика, повышающего накопление биомассы “полезных” микроорганизмов в кишечном тракте,

- лектины, поступающие с пищей можно рассматривать как структуры, способные модифицировать функции практически всех присутствующих в организме физиологически активных гликопептидов и др.

12.5. Получение и применение лектинов

Для получения ряда лектинов из предварительно очищенных препаратов белков используют аффинные сорбенты. Возможен путь отбора мутантных клеток растительного, животного происхождения, и особенно, микроорганизмов по признаку максимального продуцирования в среду того или иного лектина, или группы лектинов. Перспективным является получение лектинов на основе протопластов растительных клеток – продуцентов лектинов. Ряд наиболее важных в практическом отношении лектинов уже получают генно-инженерным путем (фитогемагглютинин (ФГА), лектин гороха (ЛГ), и др.).

Лектины выступают в качестве чувствительных биосенсоров, детектирующих определенные углеводные последовательности в олигосахаридах, которые являются специфическими лигандами в углевод-белковом взаимодействии. В последние годы лектины все шире находят применение в различных медико-биологических исследованиях. Рядом авторов отмечены противоопухолевый, митогенный, инсулиноподобный, противовирусный эффекты лектинов. Весьма перспективным является использование лектинов для диагностики онкопатологий, иммунодиагностики, заболеваний ЖКТ, мочеполовой системы, легких. Однако, в преобладающем большинстве проводимых исследований, в настоящее время используют лектины растительного происхождения. Изучение свойств и функций лектинов бактерий, и в частности непатогенных бактерий, открывает возможность использования их в качестве своеобразных структурных и функциональных зондов в изучении углеводсвязывающих рецепторов клеточных мембран, характер гликозилирования которых, как известно, играет важную роль в регуляции различных метаболических процессов в организме.

Лектины в биотехнологии.

1. Для диагностики тех или иных заболеваний.
2. Идентификации некоторых микроорганизмов.
3. Специфические реагенты, избирательно сорбирующие те или иные сложные вещества: гликопротеиды, гормоны, сиалопротеиды и т.д. (Т.е можно получить ценные вещества, используемые при лечении многих тяжелых заболеваний).
4. Создание нового поколения препаратов – своеобразных гибридов лектинов и антител для воздействия на те органы и ткани, где действие лектина полезно. Например, в Кёльне д-р Андреас Энгерт для лечения рака лимфатических узлов использовал ризин “сшитый” с антителами, избирательно доставляющими этот токсичный лектин к опухоли.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что такое лектины ?
- 2) Роль лектинов в растениях, в организме животных?
- 3) Классификация лектинов.
- 4) Способы получения лектинов.

- 5) Применение лектинов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.

Дополнительная

1. *Лахтин В.М.* Лектины в исследовании белков и углеводов /В.М. Лахтин. Итоги науки и техники. ВИНТИ. Биотехнология.- М., 1987. –Т.2. – 288 с.

2. *Луцки М.Д.* Лектины / М.Д. Луцки, Е.Н. Панасюк, А.Д. Луцки. – Львов: Вища школа, 1981. – 156 с.

3. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2005. –262 с.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.
2. Биотехнология: Учебник / А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева, В.И. Еремец, А.А. Раевский, И.Л. Боро, Ф.Я. Дадасян / Под ред. А.Я. Самуйленко. – М., 2013. – 746 с.
3. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 162с.
4. *Блинов, В.А.* Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: Полиграфия Поволжья, 2003. – 196 с.
5. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология. Курс лекций. Часть II. / В.А. Блинов. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2004. – 144с.
6. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах / В.А. Блинов. – Саратов: Гарнитура Таймс, 2008. – 102 с.
7. *Волова, Т.Г.* Биотехнология: электронное издание, ссылка доступа: <http://polnotext.ru/volova-t-g-biotechnologiya/volova-t-g-biotechnologiya-glava-2-promishlennaya-mikrobiologiya-protsessi-proizvodstva-poleznich-veschestv>
8. *Живухина, Е.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для высших учебных заведений / Е.А. Живухина, Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 506 с.
9. *Кузьмина, Н.А.* Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Электронное издание, 2010.
10. *Лахтин В.М.* Лектины в исследовании белков и углеводов /В.М. Лахтин. Итоги науки и техники. ВИНТИ. Биотехнология.- М., 1987. –Т.2. – 288 с.
11. *Луцик М.Д.* Лектины / М.Д. Луцик, Е.Н. Панасюк, А.Д. Луцик. – Львов: Вища школа, 1981. – 156 с.
12. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2005. –262 с.
13. *Орехов, С.Н.* Биотехнология: учебное пособие / С.Н. Орехов, Ю.О. Сазыкин, И.И. Чакалева. – М.: Электронное издание, 2006.
14. *Сазыкин Ю.О.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений /Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Лекция 1. Основы промышленной биотехнологии	4
1.1. Первичные и вторичные метаболиты.....	4
1.1. Основные методы и подходы, используемые в биотехнологических производствах.....	
Вопросы для самоконтроля.....	8
Список литературы.....	8
Лекция 2. Биотехнологическое оборудование и продукты промышленного назначения	10
2.1. Биотехнологическое оборудование, условия культивирования	10
2.2. Продукты биотехнологии и блок-системы их производств	13
Вопросы для самоконтроля.....	15
Список литературы.....	15
Лекция 3. Биотехнология получения белков	16
3.1. Структура белка.....	16
3.2. Биосинтез белка.....	18
3.3. Применение белка одноклеточных.....	19
Вопросы для самоконтроля.....	20
Список литературы.....	20
Лекция 4. Получение аминокислот	22
4.1. Аминокислоты	22
4.2. Синтез аминокислот.....	24
4.3. Химический синтез аминокислот	25
Вопросы для самоконтроля.....	25
Список литературы.....	25
Лекция 5. Получение ферментов	27
5.1. Роль ферментов как биологических катализаторов	27
5.2. Микробиологический метод получения ферментов	29
5.3. Методы выделения и очистки ферментов	31
Вопросы для самоконтроля.....	34
Список литературы.....	34
Лекция 6. Иммобилизация ферментов	35
6.1. Преимущества иммобилизованных ферментов	35
6.2. Методы иммобилизации	36
6.3. Применение иммобилизованных ферментов	40
Вопросы для самоконтроля.....	44
Список литературы.....	44
Лекция 7. Получение углеводов	46
7.1. Углеводы: строение и биологическая роль.....	46

7.2. Структурные и защитные полисахариды.....	47
7.3. Способность микроорганизмов сбрасывать углеводы.....	48
Вопросы для самоконтроля.....	49
Список литературы.....	49
Лекция 8. Получение гормонов	51
8.1. Химический синтез гормонов	51
8.2. Роль генной инженерии в получении продуцентов гормонов.....	51
8.3. Получение генно-инженерного инсулина	55
Вопросы для самоконтроля.....	56
Список литературы....	56
Лекция 9. Получение антибиотиков	58
9.1. Продуценты антибиотиков	58
9.2. Механизмы биосинтеза антибиотиков	61
9.3. Биотехнология антибиотиков	62
Вопросы для самоконтроля	68
Список литературы.....	68
Лекция 10. Технология получения витаминов	70
10.1. Биологическая роль витаминов	70
10.2. Получение витамина В ₁₂	70
10.3. Получение витамина В ₂	71
10.4. Получение эргостерина.....	72
Вопросы для самоконтроля..	73
Список литературы	73
Лекция 11. Получение вторичных метаболитов	74
11.1. Вторичные метаболиты.....	74
11.2. Терпены	75
11.3. Полифенолы	75
11.4. Алкалоиды.....	77
11.5. Гликозиды.....	78
Вопросы для самоконтроля...	79
Список литературы	79
Лекция 12. Биотехнологические аспекты получения и применения лектинов	81
12.1. Понятие ”лектины”	81
12.2. Классификация лектинов	81
12.3. Роль лектинов в растениях	82
12.4. Роль лектинов в организме животных	82
12.5. Получение и применение лектинов	83
Вопросы для самоконтроля	83
Список литературы.....	84
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	85
СОДЕРЖАНИЕ	86

