



УДК 637.01:637.02:637.03  
М.Н. МАНАКОВ, Д.Г. ПОБЕДИМСКИЙ  
**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ  
ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ  
ПРОИЗВОДСТВ**





М. Н. МАНАКОВ, Д. Г. ПОБЕДИМСКИЙ

# ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Допущено Государственным комитетом  
по народному образованию в качестве учебного пособия  
для студентов высших учебных заведений, обучающихся  
по специальности «Биотехнология»



МОСКВА  
ВО «АГРОПРОМИЗДАТ»  
1990

БИБЛИОТЕКА

Бух. тип и лп

№ 65096

почти исключительно основной протекающей в биореакторе стадии биотехнологических процессов, в которой принимают непосредственное участие клетки микроорганизмов или ферменты. Авторы старались максимально иллюстрировать излагаемые теоретические положения примерами из практики, поскольку именно применение известных научных положений из различных областей знания к биотехнологическим объектам вызывает зачастую определенные трудности на практике.

Понятию, что биотехнологический процесс как единое целое не ограничивается одной, пусть и важнейшей, стадией. При создании промышленных производств значительного внимания заслуживают все остальные стадии — подготовка сырья, поддержание в активном состоянии продуцента или биокатализатора, различные мероприятия по асептике, в том числе стерилизация жидких и газовых потоков, оборудования и коммуникаций.

Не меньшее внимание приходится уделять и последующим операциям по переработке продуктов, которые зачастую оказываются сложными и многостадийными, особенно если приходится иметь дело с выделением и очисткой малых количеств биологически активных веществ, находящихся наряду с биомассой или нативными ферментами в многокомпонентной смеси продуктов.

Важную роль в промышленной биотехнологии играют и тепловые процессы, включающие подогрев и охлаждение, выпарку, грануляцию, сушку и т. д.

В той или иной мере затронутые вопросы рассматриваются в учебных пособиях по процессам и аппаратам химической технологии и микробиологических производств, а также в периодической научной печати. Тем не менее приходится с сожалением констатировать, что по мере развития биотехнологии и создания новых биотехнологических промышленных производств все более остро ощущается отсутствие учебников, в которых различные стадии сложного биотехнологического процесса были бы рассмотрены достаточно глубоко с учетом их взаимосвязи и специфики. Предлагаемая вашему вниманию книга поможет частично ликвидировать этот пробел.

Учебник предназначен для студентов вузов, готовящих инженеров-технологов по специальности 25.09 «Биотехнология», может быть полезен аспирантам и специалистам, работающим в области создания новых и эксплуатации существующих промышленных биотехнологических производств в микробиологической, медицинской, химической, пищевой и лесной отраслях народного хозяйства.

Раздел 1 написан Д. Г. Победимским, разделы 2—3 — М. Н. Манаковым.

## **БИОХИМИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ПРОМЫШЛЕННЫМИ ПРОЦЕССАМИ**

### **Глава 1. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РЕГУЛЯЦИИ МИКРОБНОГО МЕТАБОЛИЗМА**

Для реализации ферментационного процесса необходимо выполнить следующее:

- провести размножение продуктивного штамма (генотипическая оптимизация);

- разработать оптимальные условия ферментации при использовании дешевого сырья для питательных сред (фенотипическая оптимизация);

- осуществить реализацию процесса в опытных условиях с последующим его масштабированием;

- разделить продукты и провести их стабилизацию.

Наиболее существенными представляются гено- и фенотипическая оптимизации, поэтому далее мы рассмотрим биохимию и регуляцию процессов обмена веществ (микробного метаболизма).

#### **§ 1.1. Классификация продуктов метаболизма**

Для многих микробиологических процессов синтез продукта связан с размножением клеток. При получении биомассы микроорганизмов на источнике углерода (*n*-парафин, этанол и др.) клетки могут быть целевым продуктом. Клетки репродуцируются и размножаются благодаря автокаталитическому процессу роста. С ростом связано образование конечных продуктов энергетического обмена. Рост и образование продуктов происходят не всегда одновременно: ряд ферментационных процессов характеризуется сдвигом фаз роста и образования продукта. Связь синтеза продуктов с конструктивным метаболизмом в упрощенной форме показана на рис. 1.1.

Накопление биомассы отождествляется с ростом микроорганизмов. Рост — необратимое увеличение живой клеточной массы. Рост и размножение связаны друг с другом: при росте происходит увеличение клеточной массы, при размноже-

**Ферменты** — вещества белковой природы, катализируют обмен веществ в клетках. Их разделяют на два больших класса: однокомпонентные, которые состоят исключительно из белка, обладающего каталитическими свойствами, и двухкомпонентные, которые состоят из белковой части (апофермент) и небелковой (кофактор, афон), называемой простетической группой. Вследствие высокой субстратной специфичности метаболические превращения катализируются специальными ферментами. Белковая часть фермента, ее структура и расположение молекулы фермента в пространстве в значительной степени определяют активность ферментов.

Типичная бактериальная клетка обладает генетическим потенциалом к продуцированию более 1000 различных ферментов. При этом метаболическая координация обеспечивает синтез только необходимых на данный момент ферментов в строго определенных количествах. Преобладающее число ферментов локализовано в клетке. Ферменты, которые катализируют катаболизм нерастворимых субстратов (крахмала, целлюлозы, белка), чаще всего выделяются из клеток в окружающую среду (внеклеточные ферменты).

При микробных трансформациях используют свойство клеток осуществлять одну или несколько ферментативных стадий перегруппировки функциональных групп в молекуле предшественника продукта. Клетки после культивирования смешивают с конвертируемым веществом, благодаря чему ценный предшественник не используется как источник энергии и углерода.

В ряде случаев превращение веществ связано с ростом микроорганизмов, например, при синтезе уксусной кислоты. Этот вид трансформации предполагает неполное окисление субстрата.

## **§ 1.2. Характеристики роста микроорганизмов. Методы культивирования**

Цикл роста и деления микробных клеток называется клеточным циклом. Иными словами, цикл включает серию индивидуальных событий, завершающихся отпочкованием дочерней клетки. Эти события строго организованы и повторно (множественно) воспроизводимы. Из рис. 1.2 видно, как строго периодически «вырисовываются» пики выделения  $\text{CO}_2$  синхронно растущей дрожжевой культурой. Этот факт указывает на то, что генетически кодированные события во время цикла деления протекают по строго фиксированной («врожденной» для клетки) схеме. Результат клеточного цикла — образование дочерней клетки, функции которой будут в большой степени за-

висеть от параметров окружающей среды, где происходит процесс репродукции.

Применение микробиологических систем высокой продуктивности в биотехнологии требует (кроме переноса теплоты) адекватного переноса массы между жидкостью, твердой фазой (клетка) и газовой фазой для непрерывного развития клеточной популяции.

В природных условиях (экологических нишах) имеет большое значение концентрация основных питательных компонентов; именно она влияет на свойства микробных клеток. Следовательно, микробный рост практически всегда лимитирован по питательному компоненту, поэтому для понимания поведения микробных популяций в условиях технического эксперимента или промышленного производства изучают влияние вариаций питания на экспрессию (проявление) генетически кодированных свойств растущих клеток. Физические и химические параметры среды будут окончательно определять характеристики микробной популяции.

Для оценки влияния параметров окружающей среды на микробную культуру важно иметь возможность точного анализа физиологии роста. Обычно применяют: а) аналитические методы выявления отклика культуры на вариации параметров; б) системы культивирования, которые позволяют выполнять анализ определенного параметра. Определение *in situ* отклика системы на изменение условий культивирования является научной и технической задачей, поэтому должны быть обеспечены возможности для измерения роста и изучения физиологии микроорганизмов, являющейся основой роста. Информацию о внутриклеточном обмене веществ, регуляторных явлениях можно получить в устойчивой системе культивирования клеток путем регистрации параметров, характеризующих физиологическое состояние клеток.

Влияние изменения параметров окружающей среды на развитие клеток лучше всего оценивать в системе непрерывного культивирования, в ней поддерживается постоянство определенного физиологического состояния во времени.

При периодическом культивировании реагенты (компонен-

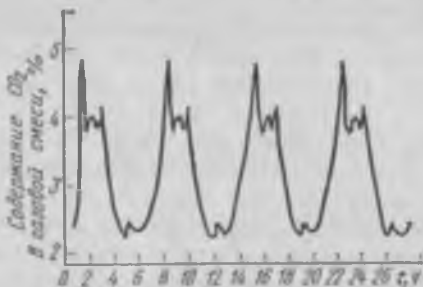


Рис. 1.2. Выделение  $\text{CO}_2$  синхронно растущей культурой *Saccharomyces cerevisiae*. Повторяющиеся пики указывают на строгую периодичность биохимических превращений в цикле клеточного воспроизводства

ты питательной среды, клетки) взаимодействуют для того, чтобы индуцировать рост. Этот режим моделирует закрытую систему (исключая поток газа), в которой клетки делятся, а значит, растут, до тех пор, пока некий питательный компонент не исчезнет или некий метаболит не накопится до токсичного уровня: культура вступает в стационарную фазу. Хотя в этой фазе накопления клеток более не происходит, но они еще метаболически активны. Характерным для растущей периодической культуры является то, что постепенно, с изменением концентрации питательного компонента и продукта, меняются и параметры окружающей среды. Так, если преднамеренно не контролировать и не регулировать состав среды, pH может существенно измениться.

Согласно многим кинетическим моделям, скорость роста зависит исключительно от одного лимитирующего компонента (см. раздел III). В непрерывной культуре (хемостате), которая представляет собой открытую систему, для контроля роста лимитируют питательный компонент.

В отличие от периодической культуры в условиях стационарного состояния могут быть легко исключены все временные изменения в окружающей клетки среде. В системе непрерывного культивирования микроорганизмы могут развиваться в режимах, различающихся по лимитирующему питательному компоненту. В этих условиях часто проявляются такие свойства, которые остаются скрытыми в периодической культуре. Так, аэробный рост дрожжей *S. cerevisiae* в периодической культуре проходит две фазы. В первой ростовой фазе глюкоза утилизируется на получение биомассы, этанола и  $\text{CO}_2$ . Этанол, образовавшийся во время начального роста, последовательно используется клетками как субстрат во второй фазе.

В дрожжах рода *Saccharomyces* такая «диауксия» имеет место и в периодической культуре. В непрерывной культуре, лимитированной по углероду, окислительную деструкцию глюкозы в этанол и  $\text{CO}_2$  наблюдали лишь при низких по глюкозе скоростях разбавления. Биомасса и  $\text{CO}_2$  оказались единственными углеродсодержащими продуктами роста, и в интервале малых скоростей разбавления обнаруживались высокие стационарные концентрации биомассы. При увеличенных по глюкозе скоростях разбавления наблюдали изменение в метаболизме: стационарная концентрация биомассы уменьшалась, а клетки продуцировали этанол. Это физиологическое состояние близко к таковому, наблюдаемому в первой ростовой фазе периодической культуры. Следовательно, окислительная деструкция глюкозы возможна и у дрожжей рода *Saccharomyces*, но она реализуется только в непрерывной культуре или при отъемно-доливном культивировании.

## 1.1. Принципы параметрического анализа в непрерывной культуре

| Независимый параметр   | Пример манипуляции                                                           | Зависимый параметр                                                      |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Скорость разбавления   | Сдвиг в скорости разбавления                                                 | Продуктивность процесса<br>Концентрации метаболитов<br>Экспрессия генов |
| Лимитирующий компонент | Сдвиг в концентрации лимитирующего компонента, импульсное введение субстрата | То же                                                                   |
| Температура            | Сдвиг в температуре опыта                                                    | »                                                                       |

Таким образом, реализовать разнообразные потенциальные пути метаболических превращений можно лишь при использовании метода непрерывного культивирования. Определенный параметр процесса может быть принят в качестве независимого переменного для оценки его влияния на микробный рост (табл. 1.1) и изучения кинетики изменения зависимых от этого параметра переменных (т. е. метаболических функций).

Различают две группы биосинтетических процессов:

образование продуктов связано с ростом (продукты энергетического метаболизма — спирты, кислоты, первичные метаболиты, продукты переноса генетической информации — белки, ферменты). Синтез этих продуктов происходит во время роста и может продолжаться после его завершения (рис. 1.3);

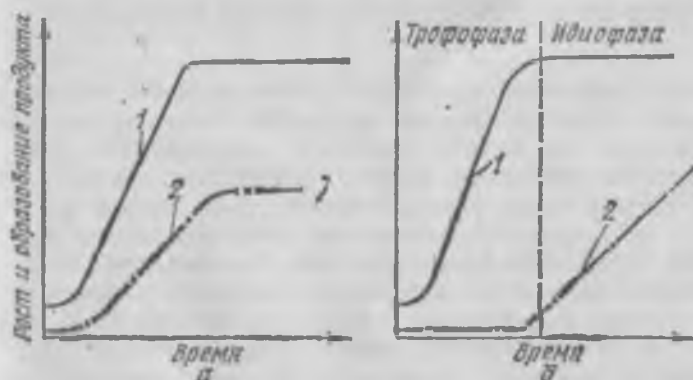


Рис. 1.3. Кинетика роста биомассы и накопления продукта:

а — рост биомассы и образование продукта синхронны во времени,  
б — образование продукта происходит после роста биомассы; 1 — рост,  
2 — продукт

образование продуктов не связано с ростом (вторичные метаболиты); стадия синтеза их (идиофаза) происходит, как правило, после завершения стадии роста (трофофаза).

Биосинтез аминокислот происходит как во время роста клеток, так и после его завершения. Синтез многих ферментов не протекает параллельно с ростом, однако наибольшее содержание накопившегося фермента может быть связано с определенной стадией ростового цикла.

При интенсификации промышленных ферментаций с помощью факторов роста, или стимуляторов, поддерживают режим повышенной и длительной продуктивности. Чем больше выход целевого продукта, короче продолжительность процесса и меньше объем ферментатора, тем эффективнее процесс ферментации. Продуктивность может быть отнесена к объему ферментатора (объемная скорость образования продукта в граммах на 1 л за 1 ч) или к высушенной клеточной массе (удельная скорость образования продукта в граммах на 1 г СВ за 1 ч). Мерой степени конверсии служит выход продукта  $Y$  от субстрата:

$$Y = \frac{\text{Количество образовавшегося продукта}}{\text{Количество израсходованного субстрата}}.$$

Выявление оптимальных условий культивирования — состава среды, pH, температуры, скорости перемешивания, аэрации, стимулирующих биосинтез добавок — существенный аспект развития биотехнологии. Второй аспект связан с генотипической оптимизацией деятельности микроорганизмов.

### **§ 1.3. Контроль роста микробной культуры и экспрессия генов**

Микроорганизмы, встречающиеся в природе, обычно вырабатывают внутриклеточные продукты обмена в количествах, достаточных для конструирования всех клеточных структур, даже при изменении параметров окружающей среды. Такую высокую координацию метаболических превращений и, следовательно, экономичность клеточного обмена обеспечивают контрольные механизмы регуляции микробного метаболизма. Если происходят нарушения регуляции, например вследствие мутаций, мутанты с дефектами обмена вырабатывают избыточные количества некоторых продуктов обмена по сравнению с исходными («дикими») штаммами, хотя, как правило, нуждаются в факторах роста. Обычно биотехнологи не интересуются эффективностью регуляторных механизмов и после обработки диких штаммов мутагенами с высокой частотой мутации и при изменении условий окружающей среды селекционируют и куль-

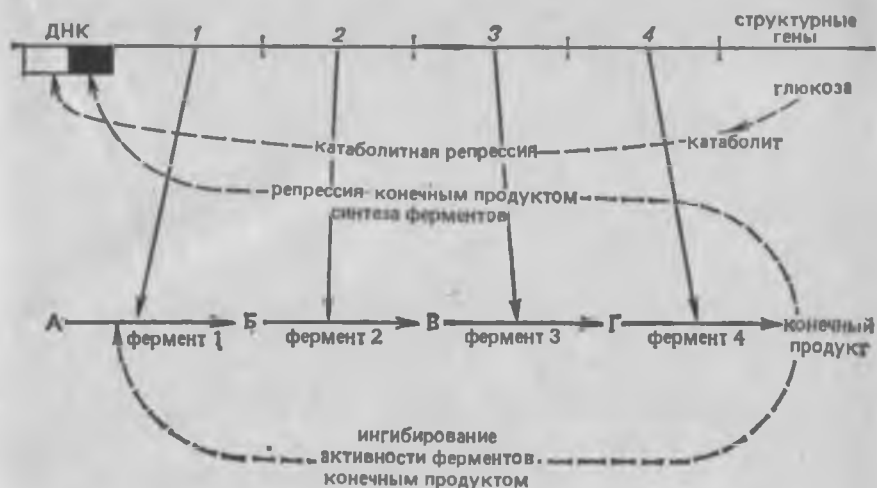


Рис. 1.4. Принципы регуляции синтеза ферментов. Накопление конечного продукта цепи биосинтеза вызывает ингибирование его дальнейшего синтеза

тивируют новые, модифицированные штаммы с дефектами регуляции. Последние можно применять в промышленности в качестве рабочих культур для процессов ферментации.

Прежде чем перейти к сверхпродуктивности, рассмотрим вкратце принципы метаболической регуляции: они полезны для понимания обратной задачи — выяснения причин репрессии генов.

**Принципы метаболической регуляции.** Для координации метаболических превращений существенными являются три механизма:

ингибирование ферментативной активности конечным продуктом (метаболитом), или ингибирование по принципу обратной связи;

регуляция скорости синтеза ферментов через репрессию (подавление синтеза) или, наоборот, индукцию (увеличение скорости синтеза) конечным продуктом;

уменьшение скорости синтеза ферментов метаболизма одного источника углерода другим, присутствующим в среде (катаболитная репрессия).

Как показано на рис. 1.4, при ингибировании по принципу обратной связи биосинтез конечного продукта приводит к торможению его собственного синтеза. При таком механизме конечный метаболит в цепи биохимических превращений ингибирует действие фермента, «работающего» на более ранней (обычно первой) стадии этой цепи. При этом равнозначно, об-

разуется ли конечный метаболит в клетке или утилизируется из питательной среды. Первый, ключевой, фермент является аллостерическим белком. Он способен изменять свою конформацию в присутствии конечного продукта — ингибитора, что приводит к уменьшению каталитической активности. Такое ингибирование действует быстро и очень эффективно.

Репрессия по принципу обратной связи относится к процессам, которые идут при подавлении самого синтеза фермента, а именно блокируется «считывание» генетической информации, необходимой для синтеза ферментов (транскрипция). Транскрипция структурного гена блокируется чаще всего продуктом, производным от конечного продукта цепи биохимических превращений (корепрессором). При высокой концентрации корепрессора останавливается или сильно замедляется синтез ферментов, включенных в реакцию цепь. Если концентрация падает до определенного минимального значения, происходит дерепрессия, т. е. ферменты снова образуются с высокими скоростями и в нужном количестве. Регуляция этого вида протекает медленно, так как она связана с синтезом ферментов.

Отметим, что цель обоих механизмов регуляции по типу обратной связи состоит в приближении скоростей продуцирования конечных продуктов цепи биохимических превращений к скоростям синтеза макромолекул. Репрессия по принципу обратной связи — широко распространенное явление, регулирующее синтез аминокислот, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов и других молекул, которые образуют структурные блоки макромолекул.

Репрессия кодирования синтеза ферментов регулирует образование анаболических ферментов, ответственных за конструктивный обмен в клетке. Синтез катаболических ферментов, катализирующих расщепление субстрата, регулируется индукцией ферментов. Ее можно характеризовать как относительное увеличение скорости синтеза специфического фермента в результате экспонирования клетки к воздействию определенного химического агента в среде — индуктора. Индукторами могут служить производные субстрата, например, для лактозы это изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозид, которые не способны выполнять функции собственно субстрата. При наличии индуктора ген-оператор не блокирован белком-репрессором, происходит транскрипция структурных генов и далее — синтез ферментов в соответствии с информацией, переданной мРНК на рибосомы. Термину «индукция» адекватен термин «дерепрессия». Иными словами, дерепрессированный ген-оператор обеспечивает процесс транскрипции. Индуцибельные ферменты необходимы тогда, когда микроорганизмы в качестве своего единственного и лимитирующего рост источника углерода и

энергии используют, например, поли- или олигосахарид либо аминокислоту. Индукция обеспечивает такое состояние клетки, при котором энергия и аминокислоты не расходуются на синтез ненужных в данный момент ферментов, но, когда это необходимо, такие ферменты могут быть выработаны очень быстро.

Когда в питательной среде находится несколько различных источников углерода, клетка, вместо того, чтобы катаболизировать их все, вырабатывает ферменты, которые необходимы для утилизации лишь одного, наилучшего из субстратов. Таким субстратом обычно служит глюкоза. Только после того как запас основного, быстроассимилирующего субстрата будет исчерпан, «снимается» катаболитная репрессия и образуются ферменты для катаболизма следующего вида субстрата. Классическим примером такой катаболитной репрессии является последовательность использования глюкозы и уксусной кислоты *E. coli*.

Катаболитная репрессия зависит от уровня (дефицита) внутриклеточного нуклеотида — циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). На рис. 1.5 показан возможный механизм влияния дефицита цАМФ на катаболитную реPRESSION («глюкозный эффект»). Нуклеотид связывается с геном-активатором (р) специальным белком (цАМФ-связывающий белок — сокращенно ЦСБ) и увеличивает сродство РНК-полимеразы к р-гену, повышая вследствие этого частоту транскрипции вдоль цепи структурных генов *z* (например, у лактозного оперона в клетках *E. coli*), *y* и *a*. Предполагают, что ген-активатор в таком случае оказывается состоящим из двух элементов (участков), один из которых связывает РНК-полимеразу, а другой — комплекс, состоящий из ЦСБ и цАМФ. Уровень цАМФ в клетке является функцией активности аденилатциклазы (фермента, превращающего АТФ в цАМФ). Если к клеткам, растущим на лактозе, добавить глюкозу, происходит подавление синтеза этого фермента глюкозой, комплекс ЦСБ не образуется, транскрипция блокируется, микроорганизм теряет способность к росту или растет очень медленно на этом субстрате и, как следствие, прекращает продуцирование метаболита.

Клетка обладает и более сложными механизмами регуляции в тех случаях, когда в результате общей последовательности метаболических реакций образуется не один, а несколько конечных продуктов и цель биосинтетических превращений становится разветвленной.

В рамках рассмотренных механизмов регуляции приведем несколько примеров фактического отклика биологических систем на изменение параметров окружающей среды.

**Роль внутри- и внеклеточных ферментов.** В дрожжевых клетках *Trichosporon cutaneum* была замечена дерепрессия (индукция) синтеза цитохрома P450, когда клетки были выращены

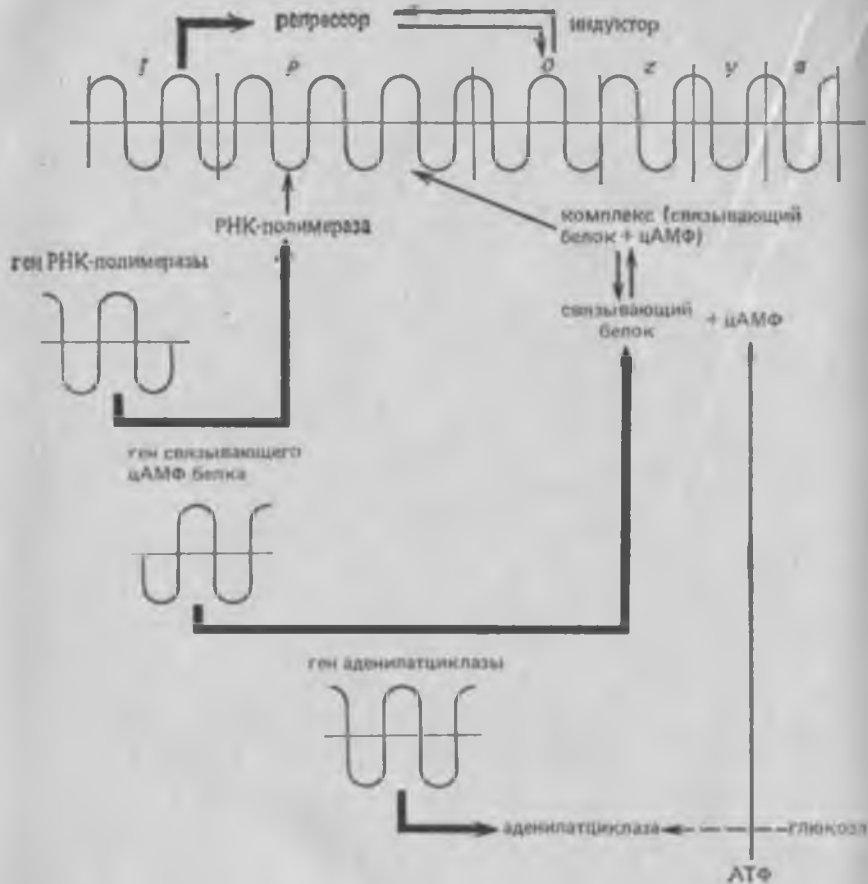
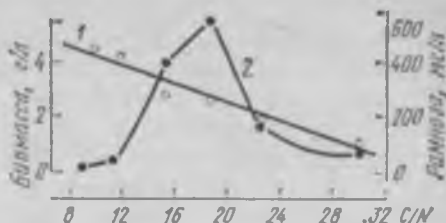


Рис. 1.5. Схема действия циклического АМФ на лактозный *lac*-оперон *E. coli*, ответственный за синтез  $\beta$ -галактозидазы на лактозе

в периодической культуре при лимите кислорода. При переходе в непрерывную культуру, когда скорость подачи  $O_2$  была достаточно низкой, эффекты дерепрессии проявлялись при синтезе всех индивидуальных ферментов монооксигеназного комплекса, а также цитохрома Р450. Хотя кислород сам по себе, возможно, не является индуктором системы, клетки с высокой монооксигеназной активностью были продуцированы именно при условиях низкой скорости подачи кислорода. Аналогичное поведение было отмечено и у других дрожжей. Было доказано, что в непрерывной культуре максимальная продуктивность биосинтеза ферментов не всегда коррелирует с максимальной продук-

Рис. 1.6. Влияние С/Н на образование рамнолипида (выраженное через концентрацию рамнозы) бактериями *Pseudomonas aeruginosa*:

1 — биомасса; 2 — рамноза



тивностью по биомассе. Так, для биосинтеза внеклеточных ферментов целлюлаз (продуцент *Trichoderma viride*) наиболее эффективно непрерывное культивирование, поскольку продуцирование целевых ферментов происходит только в узком интервале скоростей роста.

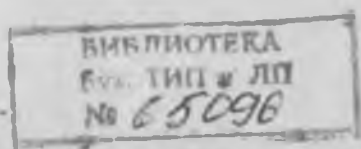
Другим известным примером служит получение глюкозо-изомеразы из *Bacillus coagulans*. Эту ферментацию ведут при двойной лимитации — по глюкозе и  $O_2$ ; максимальная продуктивность наблюдается около 200 ч.

**Продукты биосинтеза.** Биосинтетические пути, приводящие к образованию метаболитов, регулируются главным образом через механизм обратной связи, включающий ингибирование активности первого фермента или репрессию синтеза одного или более чем одного фермента конечным продуктом или его производным. Заметим, что образование продуктов часто вызывается варьированием условий культивирования. Синтез поверхностно-активного вещества рамнолипида бактериями *Pseudomonas aeruginosa* сильно зависит от состава среды и происходит при оптимальном С/Н (16—18), а также при условии сведения к минимуму в среде содержания ионов железа и при достаточно высоком содержании фосфатных ионов (рис. 1.6).

Другой пример — синтез некоторых антибиотиков. Эти метаболиты не продуцируются при высоких скоростях роста. Образование антибиотиков обычно происходит при ограничении роста. Фосфат, который оказывает сильный ингибирующий эффект на биосинтез многих антибиотиков, может быть использован в минимальных концентрациях для лимитации роста и включения механизма ингибирования по принципу обратной связи.

#### § 1.4. Мутационные дефекты метаболической регуляции

Как уже отмечалось, метаболическая регуляция может нарушаться вследствие мутаций. Именно последние приводят к сверхсинтезу метаболитов. Для понимания мутационных влияний можно ограничиться рассмотрением следующего упрощенного примера.



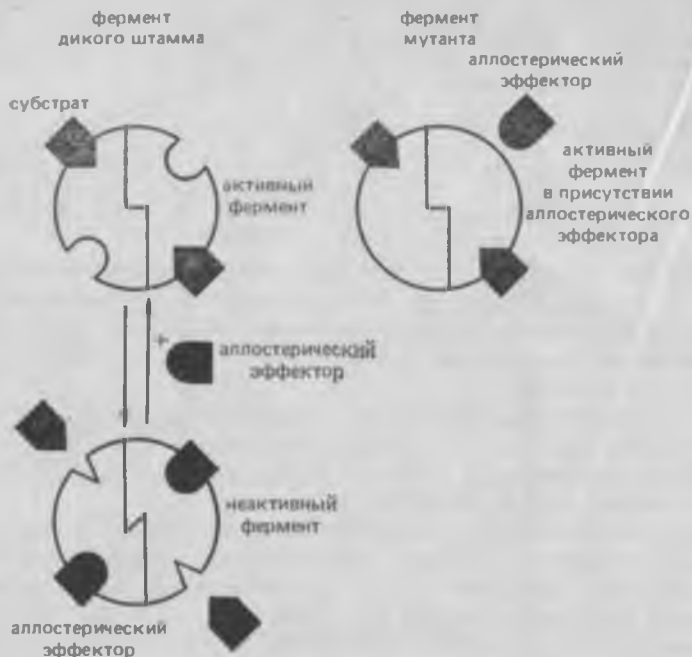


Рис. 1.7. Схема ингибирования синтеза ферментов конечным продуктом

Аллостерические ферменты, подверженные ингибированию по принципу обратной связи, состоят из двух видов белковых субъединиц: субстратсвязывающей, несущей на себе каталитический центр, и регуляционной (аллостерической), служащей центром связывания ингибитора, действующего по принципу обратной связи. Временное занятие центра ингибитором, конечным метаболитом (или аллостерическим эффектором) приводит к конформационному изменению белковой макромолекулы фермента, затрудняющему прикрепление субстрата к центру его связывания (рис. 1.7). Мутация меняет конформацию белка таким образом, что теряется активность по отношению к аллостерическому эффектору, но не каталитическая. Это приводит к образованию избыточного количества соответствующего конечного продукта. Репрессия синтеза ферментов, необходимых, например, для образования аминокислот, обуславливается рядом реакций в специфических генах, детерминирующих синтез этих ферментов. Если ген-регулятор  $i$  закодирован на продуцирование внутриклеточного неактивного белка-репрессора (апо-репрессора), а соответствующий конечный продукт — аминокис-

лота — представлен в клетке в малых концентрациях, то ген-оператор *o* не будет блокирован белком-апорепрессором, РНК-полимераза сможет перемещаться от гена-промотора *p* и транскрибировать структурный ген. Следовательно, будут образовываться необходимые для синтеза аминокислоты ферменты, например аспараткиназы — конститутивные ферменты (рис. 1.8, вверху слева).

Напротив, при высоких концентрациях в клетке аминокислоты или когда она содержится в питательной среде, апорепрессор активируется аминокислотой или продуктом ее превращения, например комплексом аминоацил-тРНК (рис. 1.8, внизу слева). Затем активированный апорепрессор (холорепрессор) взаимодействует с геном-оператором и предотвращает транс-

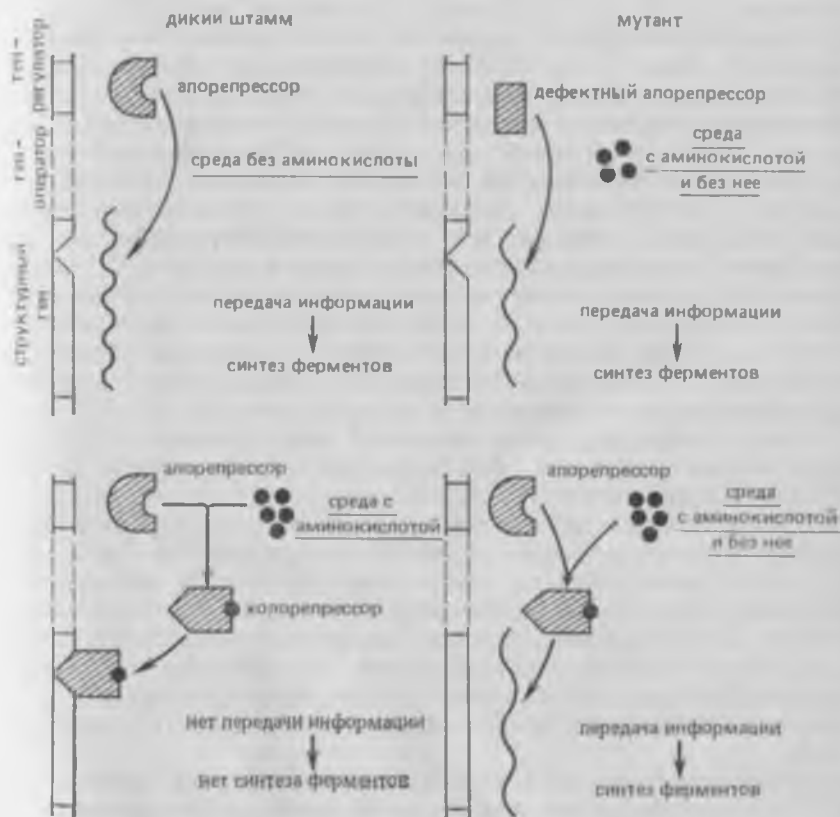


Рис. 1.8. Схема репрессии конечным продуктом для ферментов аминокислотного биосинтеза

крипцию структурного гена в мРНК; следовательно, ферменты образовываться не будут.

Мутации (дефект) генов *i* или *o* приводят либо к образованию дефектного апорепрессора, не способного взаимодействовать даже с избытком аминокислоты, или к возникновению неактивной в отношении к холорепрессору конформации структурного гена; в обоих случаях эффект одинаков (рис. 1.8, справа). В таких мутантах наблюдают, как правило, сверхпродукцирование ферментов, а значит, целевой аминокислоты. Следствием этих дефектов может быть индукция ферментов. При этом индуцибельные ферменты становятся конститутивными, т. е. не зависят от наличия субстрата в клетке, а катаболитная репрессия исчезает. Мутанты с дефектами регуляции принято называть регуляторными мутантами; их функцией является синтез конститутивных ферментов.

Наконец, включение механизма ингибирования по принципу обратной связи — еще одного регуляционного способа контроля жизнедеятельности микроорганизма (см. рис. 1.4) — достигается при наличии в штамме-продуcente мутационного нарушения регуляции, дефекта (разрыва) в биохимической последовательности образования конечного продукта. Способность клетки к образованию и накоплению внутриклеточных конечных продуктов — ингибиторов ограничивается, поскольку отсутствует (или выключен) соответствующий фермент. При ограничении накопления конечного продукта становится возможным рост клеток продуцента. В то же время в клетке накапливаются высокие концентрации промежуточного целевого продукта. Мутанты с ограничением накопления конечных продуктов метаболизма принято называть ауксотрофными.

Часто сверхпродуценты являются многократными мутантами, которые имеют оба вида дефектов (ауксотрофно-регуляторные мутанты).

Для получения мутантных штаммов разрабатывают эффективные методы селекции. Для обогащения культуры бактерий (грибов) ауксотрофными мутантами применяют пенициллин, нистатин или другие антибиотики. Подбирают условия, когда клетки дикого штамма, которые растут без определенной аминокислоты, погибают в присутствии антибиотика; последний действует только на растущие клетки. Ауксотрофные мутанты, которые нуждаются в этой аминокислоте, не растут и сохраняются.

Применяя мутагены, можно повысить частоту мутаций до  $10^5$ — $10^8$  клеток. Для получения мутантов можно применять ультрафиолетовое и  $\gamma$ -облучение, химические мутагены — нитриты, гидроксилламин, нитрозометилгуанидин, этилметансульфонат. В последнем случае среди выживших клеток оказывается

1—10% ауксотрофных мутантов. Хотя индуцированный мутагенез и ступенчатая селекция чрезвычайно трудоемкие методы, а результаты непредсказуемы, успехи в создании высокопродуктивных мутантных штаммов впечатляют, что видно на примере селекции продуцентов пенициллина. Если природные штаммы могли синтезировать около 100 ед/мл антибиотика, то современные промышленные штаммы синтезируют до 40000 ед/мл. Преимуществом ступенчатого отбора мутантов является то обстоятельство, что часто успеха добиваются без знания о путях биосинтеза целевого продукта и генетического обмена. Недостатком метода является неспецифичность мутации, что приводит к возникновению, помимо нужных мутаций, вредных, снижающих жизнеспособность штаммов и требующих витаминов, аминокислот и пр. для роста, что удорожает питательную среду.

Для отбора мутантов с дефектом регуляции используют два надежных приема современной селекции. Первый — получение штаммов, устойчивых к структурным аналогам целевого продукта («антиметаболитов»), второй — выделение ревертантов из ауксотрофных мутантов.

Антиметаболиты — соединения, структурно аналогичные целевому метаболиту, как, например, метионин и этионин —  $\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{—CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$  и  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{—CH}(\text{NH}_2)\text{X}$   $\text{XCOOH}$ , — а также токсичные для продуцентов целевых соединений. Клетка «путает» антиметаболит с метаболитом. Механизм токсичности антиметаболита может включать нарушение и снижение скорости синтеза белка ферментами (антиметаболит подавляет синтез аминокислоты, входящей в состав белка), конкурентное связывание ферментов, катализирующих превращение метаболитов, снижение активности аллостерических ферментов, торможение или прекращение роста нормальной клетки (так как аналог включает синтез метаболита по обычной схеме) и т. д. Экспонирование мутагенезированной популяции клеток с антиметаболитами приведет к гибели большинства клеток и к отбору, выживанию резистентных (устойчивых) мутантов; те из них, которые преодолели барьер регуляции, будут способны к сверхсинтезу целевого метаболита. Селекция с аналогами обычно дает очень хорошие результаты. В табл. 1.2 приведены некоторые примеры антиметаболитов, которые были применены для селекции мутантов, сверхпродуцентов аминокислот.

Второй метод предусматривает использование ауксотрофных мутантов, которые при выращивании на недостаточно сбалансированной питательной среде становятся ревертантами вследствие восстановления (реверсии) у них потребности к синтезу конечного продукта. В ревертантах синтезируются ферменты с

## 1.2. Образование первичных метаболитов (аминокислот) мутантами, резистентными к их аналогам

| Метаболит   | Микроорганизм — продуцент         | Аналог для селекции                                                     | Субстрат | Концентрация аминокислоты, г/л |
|-------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------|--------------------------------|
| L-Аргинин   | <i>Corynebacterium glutamicum</i> | D-Аргинин, аргинингидро-ксаминовая кислота                              | Глюкоза  | 20,0                           |
| L-Гистидин  | То же                             | 2-Тиазоланин, 1,2,4-триазол-3-атанин                                    | »        | 8,0                            |
| L-Изолейцин | <i>Brevibacterium flavum</i>      | $\alpha$ -Амино- $\beta$ -оксивалериановая кислота, валин, метилтреонин | »        | 15,0                           |
| L-Треонин   | То же                             | $\alpha$ -Амино- $\beta$ -оксивалериановая кислота                      | »        | 14,0                           |

таким изменением структуры, что они, сохраняя каталитическую активность, теряют способность к аллостерической регуляции. Иначе говоря, модифицированные ферменты уже не связывают ингибитор (конечный продукт), функционирующий по принципу обратной связи (дефект в аллостерических ферментах). Можно изменить и регуляторные элементы (сайты) генов так, что избыток продукта не будет влиять на интенсивность их синтеза. Таким образом, ауксотрофная мутация и реверсия (с помощью вторичных мутаций) ведут к продуцированию и выделению в культуральную среду большего количества целевого продукта.

## § 1.5. Элементы методологии генетической инженерии

Выше мы вкратце рассмотрели принципы классической селекционной работы с микроорганизмами на базе мутационной методологии. В сущности, это техника эмпирической перестройки генома микроорганизма для сверхпродуцирования метаболита. Однако наилучших результатов добиваются в настоящее время, используя эти же подходы в сочетании с новейшими методами, включающими операции с генами, — генетическая инженерия, слияние протопластов, генетический обмен, локализованный и сайт-специфический мутагенез и др. Современная методология создания промышленного штамма — запрограммированная реорганизация генома микроорганизма, только ее применение может обеспечивать решение все возрастающих задач промышленной биотехнологии. Сегодня биотехнологи добились огромных успехов в технике изоляции генов, их модификации *in vitro*, внедрении в чужеродные, быстро растущие микроорганизмы и проявление. Техника генетической инженерии достаточно подробно описана в ряде отечественных и зару-

бежных обзоров. Тем не менее применение генетических манипуляций с целью конструирования промышленных штаммов-сверхпродуцентов все еще имеет ряд ограничений из-за: а) недостаточного знания путей биосинтеза многих метаболитов, особенно путей регуляции активности генов соответствующих ферментов; б) недостаточной разработки методов генетического обмена и систем клонирования промышленно важных микроорганизмов.

Техника генетической манипуляции (рекомбинации) такова:

- 1) введение в векторные молекулы, обладающие собственным аппаратом репликации — плазмиды или фаги, — фрагмента гена чужеродной ДНК, в том числе ДНК высших эукариот;

- 2) трансформация гибридной (рекомбинантной) плазмиды в клетку бактерии — хозяина (реципиента);

- 3) клонирование, т. е. выделение бактерий, включивших вектор;

- 4) размножение этих бактерий.

Все это трудоемкие, прецедентные операции, но достаточно хорошо освоенные молекулярными биологами. Основная трудность конструирования штаммов-продуцентов белков человека связана часто с тем, что выход белка оказывается намного ниже ожидаемого. Ряд причин объясняет это несоответствие: токсичность некоторых белков для микробной клетки, нестабильность тРНК и активный протеолиз белков. Последний снижается введением мутаций в гены, кодирующие синтез протеаз, или введением в состав гибридной плазмиды функционирующего гена *pin* (*proteolysis inhibition*) ффага Т4, кодирующего образование ингибитора протеолиза.

Используя клонирование гибридных ДНК, уже получают коммерческие терапевтические препараты — соматостатин (гормон роста), инсулин и интерфероны. Ранее их обычно выделяли экстракцией из культур тканей или клеток человека или животных.

Не следует забывать, что экспрессия генов осуществляется в живой клетке, и особенности хозяина, его генотип, физиологическое состояние и условия культивирования могут решающим образом сказаться на экспрессии клонированного гена, а следовательно, и целевого белка. Так, при культивировании геино-инженерного штамма *E. coli* в режиме высоких скоростей роста наблюдали образование уксусной кислоты и синхронное уменьшение количества лейкоцитарного  $\alpha_2$ -интерферона. В другом случае для стимуляции синтеза лейкоцитарного интерферона клонированными клетками *Bacillus subtilis* вызывали их рост со скоростью, составляющей  $1/3$  от максимальной удельной скорости роста.

### 1.3. Непрерывное культивирование *Bacillus subtilis* в комплексной среде, содержащей крахмал

| $D, \text{ч}^{-1}$ | $OD$ | Биомасса, г<br>абс. СВ<br>на 1 л | Активность<br>интерферона<br>$\cdot 10^{-4}$ , ед/л | Остаточная<br>концентрация<br>крахмала, г/л | $q_P, \text{ч}^{-1}$ | $q_S, \text{ч}^{-1}$ | $Y^{*}_{X/S}$ | $Y_{P/X} \cdot 10^3$ |
|--------------------|------|----------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------|----------------------|
| 0,057              | 17,4 | 5,3                              | 3                                                   | 0                                           | 0,2                  | 0,11                 | 0,5           | 0,3                  |
| 0,14               | 14,4 | 4,5                              | 100                                                 | 0,5                                         | 15,0                 | 0,28                 | 0,5           | 10,0                 |
| 0,17               | 14,6 | 4,7                              | 80                                                  | 0,8                                         | 14,0                 | 0,34                 | 0,5           | 8,5                  |
| 0,26               | 9,6  | 2,8                              | 30                                                  | 2,7                                         | 14,0                 | 0,65                 | 0,4           | 5,4                  |
| 0,33               | 5,5  | 1,8                              | 10                                                  | 5,1                                         | 6,0                  | 0,82                 | 0,4           | 2,8                  |
| 0,36               | 7,3  | 2,3                              | 7                                                   | 4,4                                         | 6,0                  | 0,90                 | 0,5           | 1,5                  |
| 0,45               | 6,2  | 2,2                              | 4                                                   | 5,3                                         | 5,0                  | 0,90                 | 0,5           | 0,9                  |
| 0,57               | 5,2  | 1,6                              | 3                                                   | 6,5                                         | 5,0                  | 1,14                 | 0,5           | 0,9                  |
| 0,73               | 3,3  | 1,2                              | 1                                                   | 9,2                                         | 3,0                  | 0,52                 | 1,4           | 0,4                  |
| 0,93               | 0,5  | 0,1                              | 0                                                   | 10,0                                        | 0,0                  | 9,30                 | 0,1           | —                    |

\* Начальное давление кислорода составляло менее 10% уровня равновесного насыщения.  $D$  — скорость разбавления;  $OD$  — оптическая плотность культуральной жидкости при  $\lambda_{\text{макс}} = 650 \text{ нм}$ ;  $q_P$  — удельная скорость образования интерферона;  $q_S$  — удельная скорость потребления субстрата;  $Y_{X/S}$  — выход биомассы от массы субстрата;  $Y_{P/X}$  — выход интерферона от количества биомассы. Для вычисления  $Y_{P/X}$  использовали  $\alpha 2$ -интерферон, удельная активность которого  $2 \cdot 10^5$  ед/мг.

Из табл. 1.3 видно, что интервал скоростей продуктивного роста очень мал, причем быстрый рост наблюдали вновь только при удалении продукта. Наконец, лимитация по кислороду возбуждала вместе с низкими скоростями роста синергический (неаддитивный) эффект увеличения титра активности интерферона. Таким образом, оптимизация экспрессии человеческих белков в бактериях не обходится без оптимизации системы культивирования этих микроорганизмов. Иными словами, важно создать оптимальные условия, при которых успешно функционируют клетки с запрограммированными генетическими дефектами регуляции микробного метаболизма.

### § 1.6. Контроль клеточного метаболизма и эффекты проницаемости мембран

Наряду с метаболической регуляцией клетки обладают еще одним регуляторным механизмом, в основе которого лежат эффекты проницаемости клеточных мембран. Если метаболическая регуляция предотвращает сверхпродуцирование низкомолекулярных и высокомолекулярных метаболитов, важных для жизнедеятельности клетки, цитоплазматическая мембрана, как основной барьер для проницаемости, позволяет клетке удерживать концентрированные растворы этих веществ и селективно переносить внутрь клетки те из них, которые являются элементами питания.

Транспорт питательных компонентов из окружающей среды в микробную клетку осуществляется следующими механизмами:

пассивная диффузия — ввод веществ в клетку путем обычной молекулярной диффузии (движущая сила — в направлении градиента концентраций), не требующей энергии или переноса против градиента концентраций;

облегченная (или факультативная) диффузия — обратимая комбинация растворенного вещества с молекулой специфического переносчика, мигрирующего в мембране. Переносчик акцептирует субстрат из внешней среды и освобождается от него на внутренней стороне мембраны; этот путь также не требует затрат энергии или переноса против градиента концентраций. Именно так дрожжи получают углеводы из питательной среды;

активный транспорт — перенос, характеризующийся аномально высоким накоплением вещества против градиента концентрации. В этот процесс вовлекается сложный специфический мембранный белок-переносчик (пермеаза), который требует расхода энергии метаболизма. Степень накопления иногда до 10 000. Сложные пермеазные системы, осуществляющие процессы переноса, во многих случаях контролируются индукцией или репрессией, поскольку одновременное образование всех пермеаз может оказаться для клетки истощающим. Именно таким путем бактериями отбираются лактоза и галактоза из среды;

групповое перемещение — перенос через мембрану, сопровождающийся реакцией обмена группами атомов и требующий затрат энергии. Переносимое растворенное вещество, например сахар, химически модифицируется (фосфорилируется) на стадии прохода молекул через мембрану и, поступая в клетку, присутствует в ней уже в виде производного — сахарофосфата. Перенос фосфатных групп происходит с участием белков, связывающих субстрат, и ферментов, катализирующих образование сахарофосфата. Именно таким путем бактерии отбирают глюкозу, фруктозу и другие углеводы, т. е. посредством системы, известной как фосфоенолпируватзависимая фосфотрансфераза.

С помощью мутаций или изменения состава питательной среды может быть изменена проницаемость клеточной мембраны. Второй случай реализуется либо при культивировании микроорганизмов в среде, дефицитной по биотину, либо при добавлении в среду антибиотиков или детергентов.

Например, для получения больших количеств глутаминовой кислоты необходимо облегчить ее вывод из клетки в среду. При дефекте проницаемости клеточной мембраны, возникающем в условиях дефицита биотина, а также при добавлении

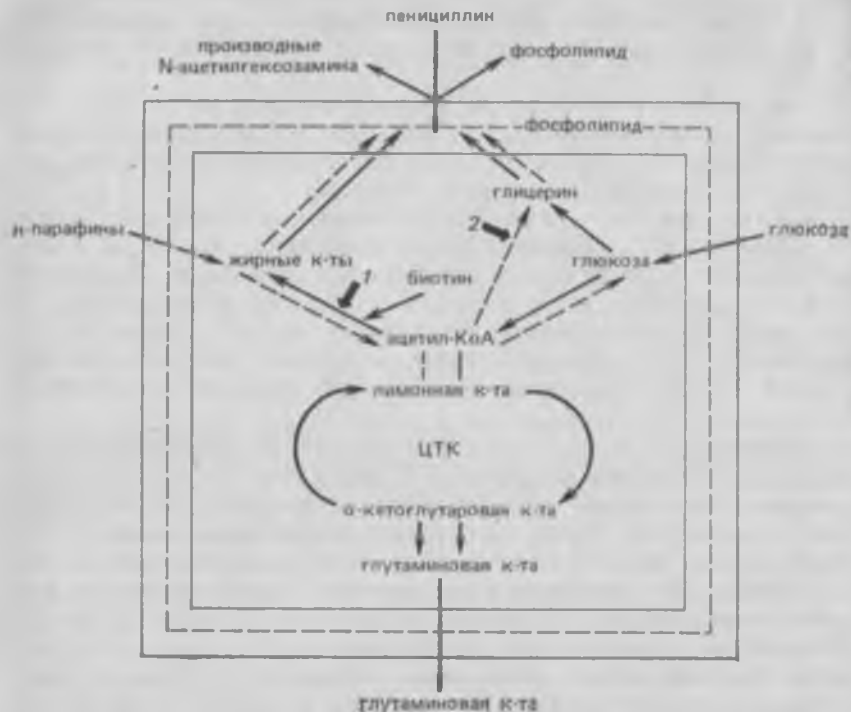


Рис. 1.9. Выделение глутаминовой кислоты и контроль биосинтеза фосфолипидов:

1 — для олеат-ауксотрофа; добавки  $C_{16}$ — $C_{18}$ -насыщенных жирных кислот—ингибирование биосинтеза; добавки биотина—ускорение биосинтеза фосфолипидов; 2 — для глицеринового ауксотрофа

пенициллина или производных жирных кислот (стеаратов, пальмитатов) происходит облегченная диффузия аминокислоты в среду. Такая «утечка» стимулирует постоянный синтез аминокислоты. При отсутствии дефекта проницаемости высокие концентрации глутаминовой кислоты (до 50 мг/г в пересчете на СВ) ингибируют глутаматдегидрогеназу, катализирующую превращение α-кетоглутаровой кислоты в глутаминовую, и аккумуляция последней прекращается. На рис. 1.9 показаны пути утилизации глюкозы или *n*-парафинов при биосинтезе глутаминовой кислоты и механизмы, контролирующие проницаемость клеточных мембран.

Добавление регуляторов проницаемости — биотина (1—5 мкг/л), пенициллина (2—4 мкг/л), детергентов (твин-60 и твин-40) — в экспоненциальной фазе роста позволяет метабо-

литу «выходить» из клетки, вследствие чего внутриклеточный уровень аминокислоты быстро снижается до 5 мг/г в пересчете на СВ. Как видно из рис. 1.9, биотин контролирует проницаемость мембран путем влияния на биосинтез жирных кислот, что вызывает снижение содержания фосфолипидов в клеточных мембранах микроорганизмов-продуцентов. Повышение концентрации биотина более 5 мкг/л способствует увеличению скорости роста биомассы бактерий и практически устраняет выделение в среду аминокислоты.

Способы преодоления барьера проницаемости путем ограничения роста микроорганизма биотином или выделения из клеток фосфолипидов при добавлении пенициллина используют для синтеза микробных метаболитов, когда последние выходят из клеток и не могут далее служить внутриклеточными предшественниками других метаболитов.

### **§ 1.7. Секреция ферментов микроорганизмами**

Перенос белковых соединений из клетки, по-видимому, затрагивает не только собственно транспортные системы, но и связан также с диффузией таких соединений через поры в клеточной мембране. При этом метаболиты выделяются из клетки. Рассмотрим в качестве примера секрецию ферментов микробными клетками.

Внеклеточные ферменты имеют промышленное значение, поэтому изучение механизма их секреции из микробных клеток представляет определенный интерес. Внеклеточные ферменты выделяются (секретируются) в среду без каких-либо нарушений структуры мембраны в процессе нормального роста и развития микроорганизмов.

Белки, обладающие ферментативной активностью, могут синтезироваться вначале в виде своих неактивных предшественников, затем под действием специфических ферментов или в результате внутримолекулярной модификации подвергаются так называемому процессингу, в результате которого формируется молекула активного фермента. Поэтому механизм секреции и процессинга ферментов можно рассматривать как часть общего механизма регуляции биосинтеза ферментов.

Белки, предназначенные для секреции, синтезируются на рибосомах, связанных с мембранами, тогда как белки, предназначенные для нужд самой клетки, образуются в свободных рибосомах. Однако не все белки, образующиеся на рибосомах, связанных с мембранами, обязательно секретируются.

Процесс выделения белка через мембрану является одним из решающих этапов в формировании молекулы внеклеточного фермента. Предполагают, что секретируемый белок должен

иметь «сигнальный пептид», обеспечивающий акт секреции. Согласно «сигнальной» модели молекулы мРНК для синтеза секретирующихся белков несут информацию об аминокислотной сигнальной последовательности. Подобные сигнальные пептиды отсутствуют в мРНК, кодирующих синтез внутриклеточных белков.



В заключение этой главы отметим, что использование методов селекции штаммов по устойчивости к аналогам и конечным продуктам в сочетании с методами генетической инженерии, а также оптимизация факторов окружающей среды чрезвычайно эффективны для интенсификации промышленных биотехнологических процессов.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каким образом можно разделить целевые продукты ферментации с точки зрения метаболизма?

2. С какой целью изучают влияние условий и метода культивирования на характеристики микробной культуры?

3. Имеется ли связь между кинетикой микробного роста и кинетикой образования продукта — метаболита? Когда продукты можно считать первичными метаболитами?

4. Почему синтез продуктов метаболизма в клетках происходит без их накопления в избыточном количестве?

5. Чем различаются репрессия синтеза ферментов и индукция их синтеза, репрессия и ингибирование? В чем состоит сущность катаболической репрессии на молекулярном уровне?

6. Что собой представляет модель аллостерического ключевого фермента в штамме-мутанте и его «диком» предшественнике?

7. Как отражается репрессия и дерепрессия синтеза ферментов на образовании аминокислот — целевых продуктов культивирования микроорганизмов?

8. В чем заключаются различия регуляторных и ауксотрофных мутантов?

9. Как можно получить мутантные штаммы, не прибегая к методам генетической инженерии?

10. Что такое антиметаболиты? В чем состоит их роль в ступенчатой селекции микроорганизмов?

11. Конкурируют или дополняют друг друга методы ступенчатой селекции и генетической инженерии? В чем заключаются основные трудности генетической инженерии штаммов микроорганизмов?

12. Можно ли в принципе улучшать технологические показатели культивирования генетически модифицированных штаммов?

13. Можно ли вызвать нарушения регуляции метаболизма в результате изменения мембранной проницаемости и какими приемами?

14. Как предположительно переносятся белки из клетки в раствор?

Развитие потенциала биотехнологии как отрасли народного хозяйства определяется успехами химической технологии и биохимии. Среди основных направлений использования достижений биохимии, микробиологии, селекции и техники генетической инженерии, химической технологии особое внимание уделяется биотехнологическим процессам получения метаболитов — незаменимых аминокислот, антибиотиков, ферментов, витаминов, полисахаридов, органических кислот и т. п.; высокоэффективным безотходным процессам инженерной энзимологии, связанным с биоконверсией возобновляемого сырья и получением альтернативных энергетических и пищевых источников (спирт, глюкоза и т. п.).

Выпуск микробиологических препаратов постоянно увеличивается, поэтому в настоящее время актуальной задачей является создание высокоэффективных штаммов-продуцентов первичных и вторичных метаболитов. Основным действующим методом продолжает оставаться индуцированный мутагенез и ступенчатая селекция. В последние годы широко разрабатывают и используют методы генетической инженерии, генетического обмена, слияния протопластов, селекции с аналогами и т. п. Поэтому далее мы рассмотрим пути и регуляцию биосинтеза важнейших метаболитов и генетического обмена, знание которых лежит в основе управляемого культивирования микроорганизмов — сверхпродуцентов.

### **§ 2.1. Микробный синтез аминокислот и его регуляция**

Возможность получения биологически активных L-аминокислот на основе возобновляемого сырья составляет главное преимущество микробиологического способа получения аминокислот по сравнению с методами их химического синтеза. Способность штаммов микроорганизмов продуцировать аминокислоты связана с генетическими нарушениями тех систем регуляции клеточного метаболизма, которые предотвращают избыточное образование и выделение клеткой аминокислот. Репрессия и ретронингибирование ферментов, катализирующих специфический путь биосинтеза данной аминокислоты, а также барьер проницаемости, создаваемый клеточной мембраной, составляют основной механизм негативного контроля, обеспечивающего экономный синтез ферментов и промежуточных метаболитов и сохраняющего в клетке уровень аминокислот, необходимый для последующего синтеза макромолекул. Распространенными объектами селекции продуцентов аминокислот являются микроор-

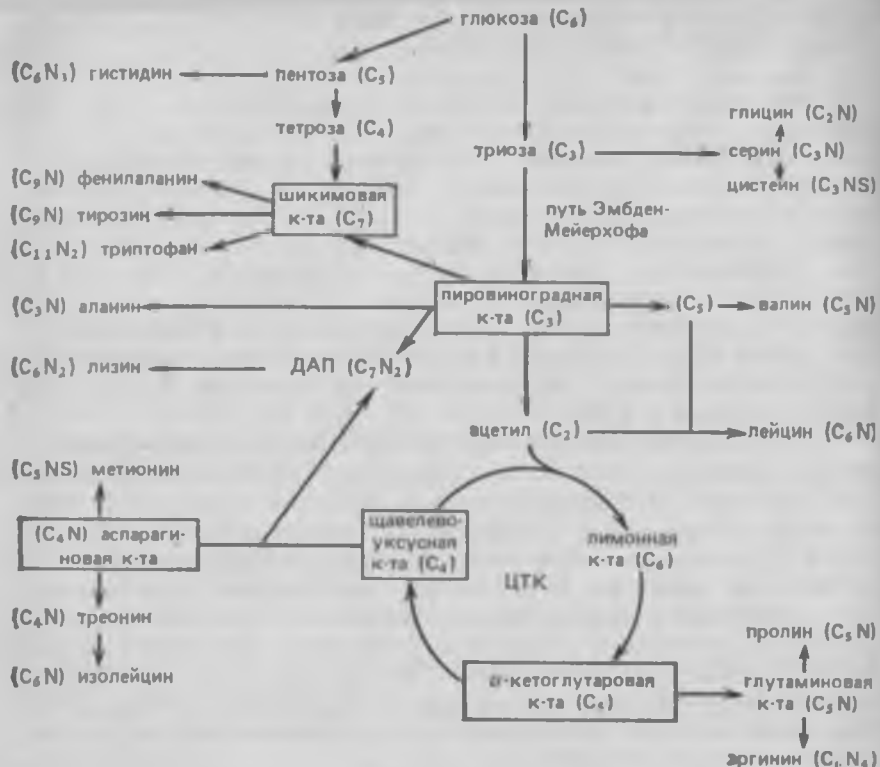
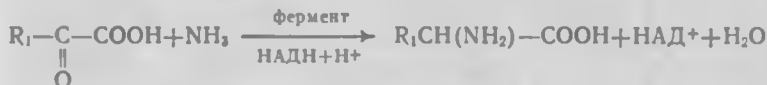


Рис. 2.1. Биосинтетические пути образования различных семейств аминокислот

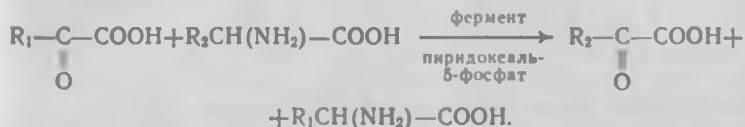
ганизмы рода *Corynebacterium*. Эти бактерии имеют очень простые пути регуляции, мало подвержены фаголизису, имеют ряд других ценных свойств.

Аминокислоты синтезируются коринсбактериями из промежуточных продуктов гликолиза, пептозофосфатного цикла, цикла трикарбоновых кислот, т. е. несколькими биосинтетическими путями и образуют целый ряд семейств (рис. 2.1). Так, биосинтез ароматических аминокислот начинается с конденсации фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата. Аминокислоты с углеводородными заместителями — аланин, лейцин, валин — образуются из пировиноградной кислоты (семейство этой кислоты); серин, глицин, цистеин (семейство серина) — из 3-фосфоглицериновой или глиоксиловой кислот. Глутаминовая кислота, пролин и аргинин образуются на базе α-кетоглутаровой кислоты (семейство этой кислоты), участвующей в ЦТК. Щавелевоуксусная кислота, также входящая в ЦТК, является предшественни-

ком аминокислот семейства аспарагиновой кислоты (лизин, метионин, треонин, изолейцин). В ходе биосинтеза аминокислот азот вводят в аммонийной форме или в форме аминогруппы через реакции ферментативного восстановительного аминирования



или переаминирования



Сверхпродуцирование таких микробных первичных метаболитов, как аминокислоты, может быть вызвано следующими обстоятельствами:

- 1) увеличением степени утилизации субстрата;
- 2) повышением скорости образования и активности ферментов биосинтеза аминокислот;
- 3) ингибированием активности или подавлением синтеза ферментов, связанных с утилизацией культурой продуцируемых целевых аминокислот;
- 4) стимуляцией выделения продукта во внеклеточную среду;
- 5) стимуляцией образования углеродного и азотного предшественников целевых аминокислот.

Обычно штаммы коринебактерий, обладающие способностью к сверхпродуцированию первичных метаболитов, являются мутантами с дефектами регуляции. Скорость биосинтеза метаболитов такими мутантами возрастает в 100—1000 раз по сравнению с таковой для «дикого» штамма. Препятствием для расширения селекционной работы с коринебактериями является отсутствие у них систем трансформации и клонирования.

**Накопление аминокислот ауксотрофными и регуляторными мутантами.** Очень часто наряду с основным целевым продуктом в ходе метаболизма одновременно образуются по разветвленной схеме другие соединения из общих метаболических предшественников. В этом случае удается интенсифицировать синтез целевого продукта путем блокирования стадий, ведущих к синтезу других продуктов разветвления. Примером использования такого метода в биотехнологии служит биосинтез лизина.

L-лизин является представителем семейства L-аспарагиновой кислоты. В отличие от регуляторного механизма у *Escherichia coli*, в котором участвуют три изофермента аспартаткиназы (рис. 2.2), каждый из которых ингибируется или инактиви-

2.1. Производство аминокислот ауксотрофными (А) и регуляторными или ауксотрофнорегуляторными (Б) мутантами

| Аминокислота          | Микроорганизм              | Генетические маркеры                                                  |                                                                                                         | Концентрация продукта, г/л |      |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------|
|                       |                            | А                                                                     | Б                                                                                                       | А                          | Б    |
| L-Аспарагин-<br>новая | <i>B. flavum</i>           | цитрат —<br>синтаза                                                   | —                                                                                                       | 10,6                       | —    |
| L-Аргинин             | <i>Bacillus subtilis</i>   | —                                                                     | arg <sup>+</sup> ГК <sup>+</sup>                                                                        | —                          | 28,0 |
|                       | <i>C. glutamicum</i>       | —                                                                     | D — сер <sup>+</sup> ,<br>D — arg <sup>+</sup><br>arg <sup>+</sup> ГК <sup>+</sup><br>2 TA <sup>+</sup> | —                          | 25,0 |
| L-Цитруллин           | <i>B. flavum</i>           | —                                                                     | —                                                                                                       | —                          | 34,8 |
|                       | <i>C. glutamicum</i>       | arg <sup>+</sup>                                                      | —                                                                                                       | 10,7                       | —    |
|                       | <i>B. subtilis</i>         | arg <sup>+</sup>                                                      | arg <sup>+</sup> ГК <sup>+</sup>                                                                        | 16,5                       | 26,2 |
| L-Изолей-<br>цин      | <i>B. flavum</i>           | —                                                                     | АОВ <sup>+</sup> , ОМТ <sup>+</sup>                                                                     | —                          | 14,5 |
|                       | <i>C. glutamicum</i>       | —                                                                     | мет <sup>+</sup> , АОВ <sup>+</sup> ,<br>АЭЦ <sup>+</sup> , АМК <sup>+</sup>                            | —                          | 9,7  |
| L-Лейцин              | <i>C. glutamicum</i>       | fen <sup>+</sup> , his <sup>+</sup> ,<br>иле <sup>+</sup>             | —                                                                                                       | 16,0                       | —    |
| L-Лизин               | <i>B. lactofermentum</i>   | —                                                                     | мет <sup>+</sup> , иле <sup>+</sup>                                                                     | —                          | 28,0 |
|                       | <i>C. glutamicum</i>       | гом <sup>+</sup>                                                      | АЭЦ <sup>+</sup> , лей <sup>+</sup> ,<br>гом <sup>+</sup>                                               | 13,0                       | 42,0 |
| L-Треонин             | <i>B. flavum</i>           | тре <sup>+</sup> , мет <sup>+</sup>                                   | АЭЦ <sup>+</sup>                                                                                        | 34,0                       | 32,0 |
|                       | <i>B. lactofermentum</i>   | гом <sup>+</sup>                                                      | АЭЦ <sup>+</sup> , ХКЛ <sup>+</sup>                                                                     | 20,2                       | 60,0 |
|                       | <i>Escherichia coli</i>    | ДАП <sup>+</sup> , мет <sup>+</sup> ,<br>иле <sup>+</sup> , ревертант | АОВ <sup>+</sup>                                                                                        | 13,0                       | 6,1  |
|                       | <i>B. flavum</i>           | —                                                                     | мет <sup>+</sup> , иле <sup>+</sup><br>АОВ <sup>+</sup> , мет <sup>+</sup>                              | —                          | 18,0 |
|                       | <i>C. glutamicum</i>       | —                                                                     | АОВ <sup>+</sup> , АЭЦ <sup>+</sup> ,<br>мет <sup>+</sup>                                               | —                          | 14,0 |
|                       | <i>Serratia marcescens</i> | —                                                                     | иле <sup>+</sup> , ДАП <sup>+</sup> ,<br>АОВ <sup>+</sup><br>АЭЦ <sup>+</sup> , трп <sup>+</sup>        | —                          | 25,0 |
| L-Трипто-<br>фан      | <i>C. glutamicum</i>       | —                                                                     | 5MT <sup>+</sup> , трпГК <sup>+</sup> ,<br>АФА <sup>+</sup> , тирГК <sup>+</sup> ,<br>фен <sup>+</sup>  | —                          | 12,0 |

ДАП — ε-диаминопимелиновая кислота; АМК — α-аминомасляная кислота; АЭЦ — S-(β-аминоэтил) цистеин; АОВ — α-амино-β-оксивалериановая кислота; ХКЛ — хлоркапролактат; ГК — гидроксат; МТ — метилтриптофан; ОМТ — o-метилтреонин; АФА — л-аминофенилаланин; ТА — тиазолаланин.

рост добавках изолейцина метионин-изолейциновый двойной ауксотроф продуцирует 4,7 г/л треонина.

В табл. 2.1 суммированы данные по получению аминокислот ауксотрофными мутантами А (клетки выращивались в условиях лимита по необходимому компоненту — конечному метаболиту) и ауксотрофнорегуляторными (двойными) мутантами Б. Наилучшие результаты дает второй метод селекции продуктивного штамма.

**Влияние биосинтетических предшественников.** Если используют биосинтетические предшественники аминокислот как ис-

ходные вещества, регулируя синтеза аминокислот подавляются в значительной мере через ингибирование и репрессию по принципу обратной связи. Этот процесс также ферментационный, однако он основан на шунтировании метаболического контроля добавлением в ростовую среду метаболита — промежуточного в биосинтетическом пути образования целевой аминокислоты.

Предложен способ получения L-изолейцина с использованием штамма *Serratia marcescens*, в котором L-треонин использовали как субстрат. В этом случае L-треониндезаминаза катализирует конверсию L-треонина в  $\alpha$ -кетомасляную кислоту и аммиак, и этот фермент становится индукцибельным при добавлении L-треонина в среду и не ингибируется L-лейцином. В связи с этим биосинтез продолжается без метаболического контроля и L-изолейцин эффективно продуцируется. Наряду с L-треонином в качестве субстратов-предшественников используют  $\alpha$ -аминомасляную,  $\alpha$ -броммасляную и  $\alpha$ -оксимасляную кислоты. Они метаболизируют прямо или косвенно в  $\alpha$ -кетомасляную кислоту, и эта конверсия не ингибируется L-изолейцином по принципу обратной связи. В табл. 2.2 охарактеризованы некоторые аминокислоты, которые продуцируются с использованием предшественников.

Остановимся на микробиологическом синтезе триптофана, поскольку технологический процесс его получения более сложен, чем производство глутаминовой кислоты и лизина, а выход готового продукта значительно ниже. Основное затруднение состоит в том, что проведение ферментации без добавления ме-

## 2.2. Получение некоторых аминокислот микробиологическим способом с использованием метаболических предшественников

| Аминокислота | Микроорганизм                        | Предшественник                     |
|--------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| L-Гистидин   | <i>Brevibacterium flavum</i>         | Гистидиол                          |
| L-Изолейцин  | <i>Serratia marcescens</i>           | D,L- $\alpha$ -Аминномасляная к-та |
|              | <i>Bacillus subtilis</i>             | То же                              |
|              | <i>Corynebacterium sp.</i>           | »                                  |
|              | <i>Serratia marcescens</i>           | D-Треонин                          |
|              | <i>Brevibacterium, Micrococcus</i>   | D,L- $\alpha$ -Оксимасляная к-та   |
|              | <i>Aerobacter</i>                    |                                    |
| L-Метионин   | <i>Pseudomonas denitrificans</i>     | 2-Окси-4-метилтиомасляная к-та     |
| L-Серин      | <i>Corynebacterium glucinophilum</i> | Глицин                             |
|              | <i>Pseudomonas sp.</i>               | »                                  |
|              | <i>Sarcina albidia</i>               | »                                  |
|              | <i>Nocardia butanica</i>             | »                                  |
| L-Треонин    | <i>Bacillus subtilis</i>             | L-Гомосерин                        |
| L-Триптофан  | <i>Hansenula anomala</i>             | Антраниловая к-та                  |
|              | <i>Claviceps purpurea</i>            | Индол                              |

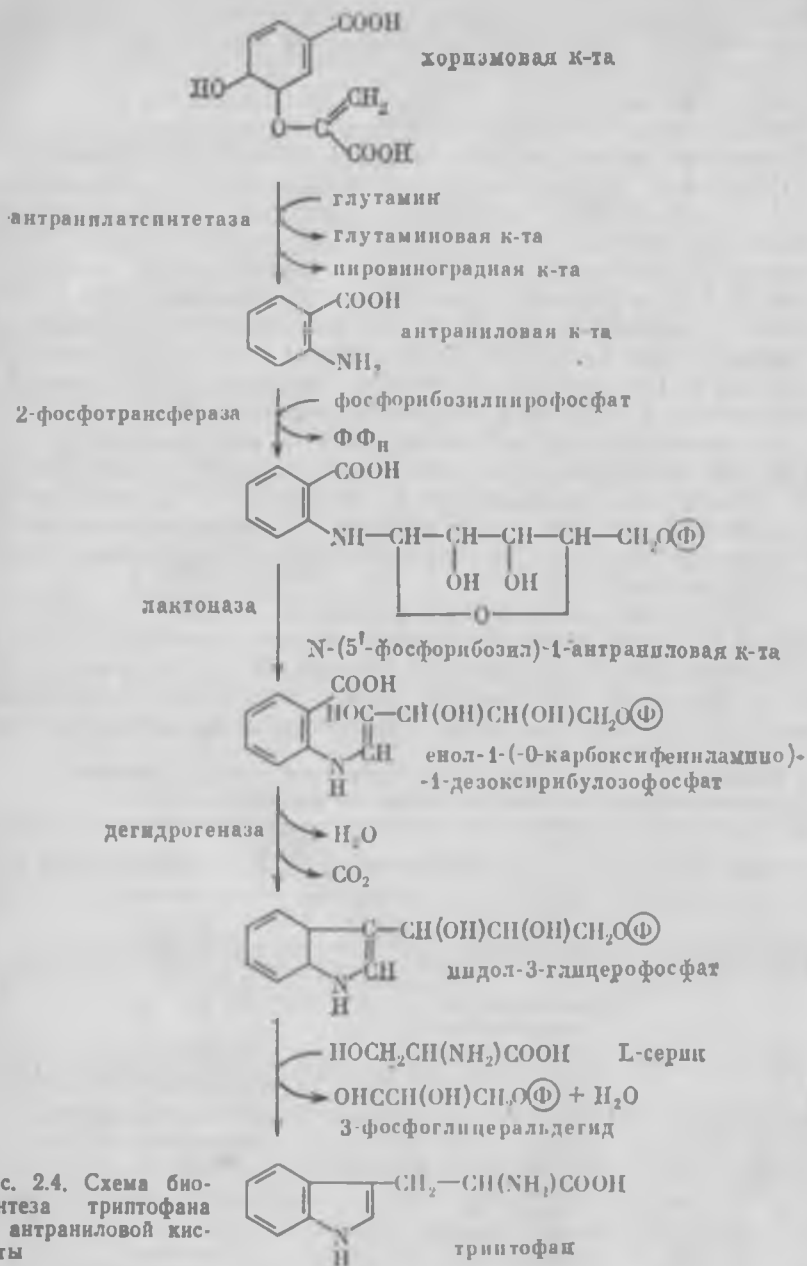


Рис. 2.4. Схема биосинтеза триптофана из антрапиловой кислоты

таболического предшественника — анраниловой кислоты — практически невозможно. Ключевые стадии биосинтеза триптофана заложены в гексозомонофосфатном пути утилизации углеводов, одним из продуктов которого является шикимовая кислота (см. рис. 2.1), дающая в результате ряда энзиматических превращений хоризмовую кислоту. Последняя может под действием анранилатсинтетазы превращаться в анраниловую кислоту. Как видно из рис. 2.4, анраниловая кислота действительно служит метаболическим предшественником при синтезе триптофана. Основным этапом этого пути следует считать формирование пиррольного цикла и присоединение боковой цепи к индольному ядру. Поскольку триптофан оказывает ингибирующее действие на анранилатсинтетазу, синтез последней индуцируют дробным введением анраниловой кислоты по ходу ферментации (0,1—0,3%). Заметим, что анраниловая кислота относительно недорога и ее легко синтезировать химическим путем из фталевого ангидрида.

## **§ 2.2. Ферментативные процессы синтеза аминокислот и разделения их рацематов**

Многие аминокислоты получают с помощью ферментов: гидролаз, аммиаклиаз, пиридоксаль-5'-фосфатзависимых ферментов и др. Отдельные аминокислоты синтезируют, используя индивидуальные ферменты (например, получение L-аспарагиновой кислоты из фумаровой с помощью аспартазы), для получения других применяют комбинации ферментов (например, получение L-цистеина из 2-амино- $\Delta^2$ -тиазолин-4-карбоновой кислоты с экстрактом *Pseudomonas thiazolinophilum*). Источником большинства таких ферментов являются микроорганизмы. Известные недостатки ферментативных методов получения аминокислот компенсируются иммобилизацией ферментов или клеток на подходящих носителях.

Заметим, что химические асимметрические синтезы аминокислот пока еще недостаточно исследованы, а технологические методы на основе химических реакций обычно приводят к образованию рацематов. В связи с этим разделение рацематов аминокислот на оптические изомеры имеет промышленное значение. Используют следующие методы разделения: химические, ферментативные и микробиологические. Из них наиболее экономичными являются ферментативный метод разделения рацематов с применением стереоспецифичных ферментов или его комбинация с некоторыми дополнительными химическими реакциями. Далее будут рассмотрены примеры, иллюстрирующие эту биотехнологию аминокислот.

меров (рис. 2.5).  $\alpha$ -Амино- $\epsilon$ -капролактам-гидролаза (лактамаза) обнаружена в клетках *Candida laurentii* и других дрожжах, и ее синтез может быть индуцирован добавлением D,L- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактама (или L- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактама), а активность — ионами  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ .  $\alpha$ -Амино- $\epsilon$ -капролактам-рацемиза найдена в *Alcaligenes obae* и других бактериях. При получении L-лизина воздействуют двумя ферментами на субстрат. В водный раствор D,L- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактама вводят необходимое количество дрожжевых и бактериальных клеток, обладающих гидролазной и рацемизной активностью. При pH 8,0—8,5 и температуре 30—50 °C D,L- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактама количественно переходит в L-лизин. Отметим, что оба фермента (точнее, оба вида клеток) можно получить в иммобилизованном виде.

Получение L-аспарагиновой кислоты. В настоящее время разработан и успешно реализован в промышленном масштабе метод получения аспарагиновой кислоты на основе рекомбинантных и иммобилизованных клеток продуцентов — аспартатаминнаклизы (аспартазы). Клетки *E. coli*, содержащие аспартазу, катализировали присоединение аммиака к фумаровой кислоте с образованием L-аспарагиновой кислоты (рис. 2.6). Аспартаза — внутриклеточная лиаза — синтезируется не только клетками *E. coli*, но и некоторыми другими микроорганизмами и растениями. Глюкоза репрессирует синтез фермента, и эта репрессия снимается циклическим АМФ. Органические соединения азота, включая аминокислоты, усиливают образование фермента. Анаэробное культивирование предпочтительно для синтеза фермента. Активность иммобилизованных в полиакриламидный гель клеток сохранялась при повышенной температуре (37 °C) в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  в течение 40 сут при pH 8,5, причем выход аспарагиновой кислоты составлял 95—100 % (при концентрации фумаровой кислоты 1—

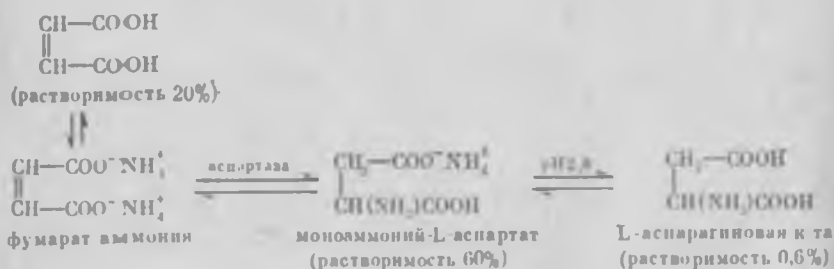


Рис. 2.6. Ферментативный синтез L-аспарагиновой кислоты из фумаровой с помощью аспартазы

1.0 составляла 500 г сырой биомассы на 1 л среды.

Технология получения L-аспарагиновой кислоты — один из первых примеров использования в промышленности иммобилизованных живых клеток микроорганизмов, содержащих аспартазу.

Получение триптофана, фенилаланина и цистеина. Весьма перспективным является получение оптически чистых аминокислот путем энантиоселективного превращения в аминокислоты ряда циклических производных, химической синтез рацематов которых представляет более легкую задачу, чем получение рацемата самой аминокислоты. К таким удобным для модификации циклическим соединениям следует отнести 5'-замещенные гидантоины и 2-амино- $\Delta^2$ -тиазолин-4-карбоновую кислоту.

Бактерии *Klebsiella*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, актиномицеты *Streptomyces* и *Actinoplanes* проявляют высокую активность в отношении D,L-5'-замещенных гидантоинов. Образование клетками гидантоиназ (дигидропиримидиназ) индуцируется незамещенным гидантоином. Схема энзиматического гидролиза с раскрытием дигидропиримидинового кольца D,L-5'-замещенных гидантоинов, которые являются промежуточными продуктами в традиционных химических синтезах аминокислот (метод Бухерера — Бурга), приведена на рис. 2.7. Эта схема реализована при получении триптофана и фенилаланина.

Схема мультиферментативного образования L-цистеина представлена на рис. 2.8. Отметим, что D,L-2-амино- $\Delta^2$ -тиазолин-4-карбоновая кислота является промежуточным продуктом в химическом синтезе D,L-цистеина. Три фермента ответственны за конверсию D,L-2-амино- $\Delta^2$ -тиазолин-4-карбоновой кислоты в L-цистеин: L-2-амино- $\Delta^2$ -тиазолин-4-карбоновая кислота-гидролаза, S-карбамоил-L-цистеингидролаза, 2-амино- $\Delta^2$ -тиазолин-4-карбоновая кислота-рацемаза. Они выделены из почвенных микроорганизмов *Pseudomonas thiazolinophilum*. Бюсинтез ферментов индуцируется добавками D,L-2-амино- $\Delta^2$ -тиазолин-4-карбоновой кислоты.

Триптофан получают прямой конденсацией индола, аммиака и пировиноградной кислоты. Синтез осуществляют с помощью L-триптофаниндолизасы (триптофаназы), которая нуждается в специфическом коферменте — пиридоксаль-5'-фосфате. Триптофаназа найдена в бактериях *E. coli*, *Bacillus albei*, *Proteus rettgeri*. Триптофан индуцирует образование фермента клетками; индол ингибирует рост бактерий и продуцирование фермента. Механизм действия пиридоксаль-5'-фосфатсвязанного фермента, включающий первичное взаимодействие с аммиаком,

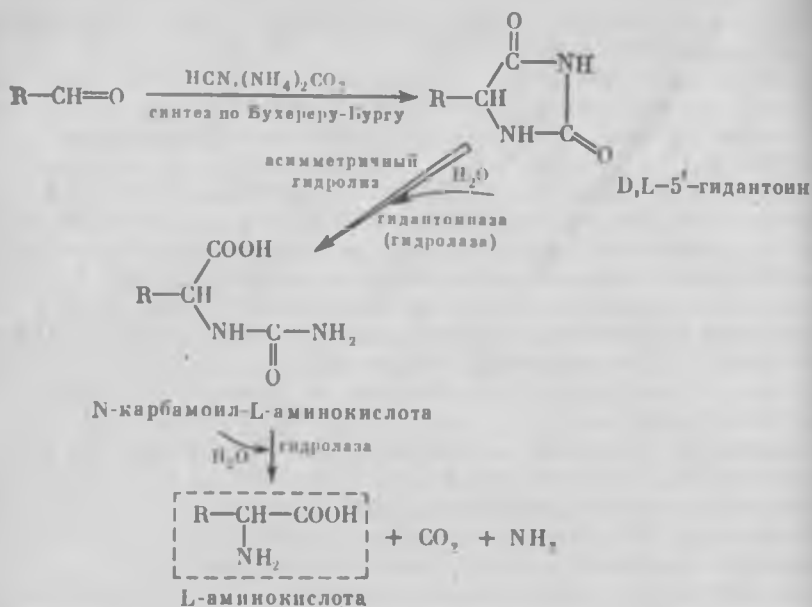


Рис. 2.7. Ферментативный синтез триптофана или фенилаланина из D,L-5'-замещенного гидантоина

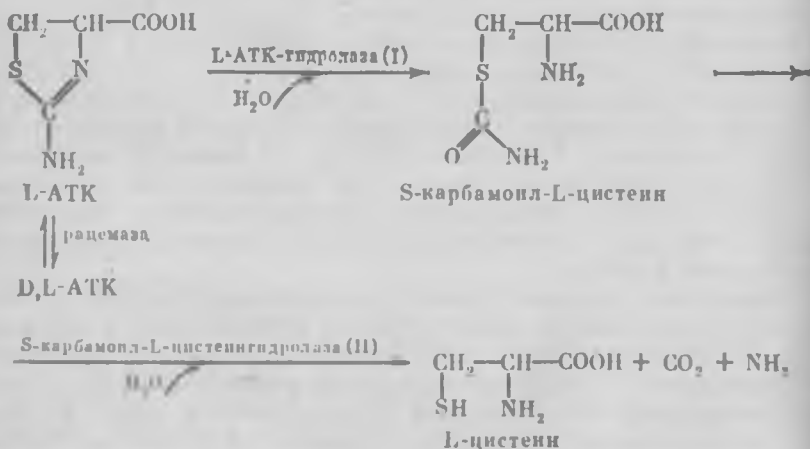


Рис. 2.8. Ферментативный синтез L-цистеина из D,L-2-амино- $\Delta^1$ -тиазолин-4-карбоновой кислоты (АТК)

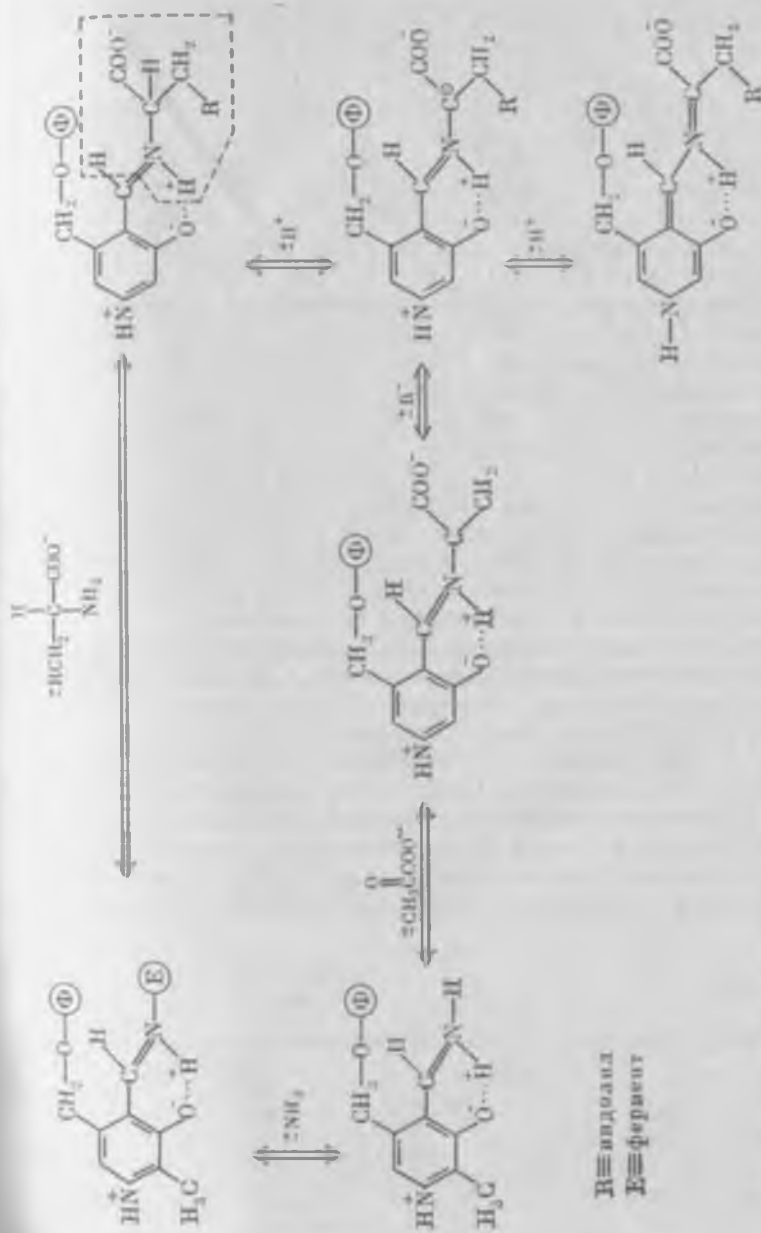


Рис. 2.9. Механизм биосинтеза триптофана

а затем участие пировиноградной кислоты и индола, представлен на рис. 2.9. Так как триптофаназа гидролизует триптофан до аммиака, пировиноградной кислоты и индола, а индол в низких концентрациях ингибирует гидролиз, реакцию синтеза проводят при избытке аммиака и пировиноградной кислоты. Триптофаназа эффективно конвертирует в этих условиях индол в триптофан, чему также способствует низкая растворимость триптофана в воде (10 г/л при 20 °C). По такому же механизму «работает» L-тирозиназа при синтезе L-тирозина из фенола, пировиноградной кислоты и аммиака (см. табл. 2.3).

**Ферментативное разделение рацемических производных аминокислот.** Потенциальное промышленное значение имеют методы разделения рацематов путем асимметричного гидролиза с помощью эстераз, амидаз и аминоксилаз (рис. 2.10). Некоторые протеолитические ферменты, например химотрипсин, проявляют эстеразную активность. При этом L-аминокислоты и эфиры D,L-аминокислот разделяются на основе их различной растворимости. Амидазы аминокислот (животного и микробного происхождения) гидролизуют амиды аминокислот до L-аминокислот. Наконец, N-ацил-L-аминокислоты гидролизуют аминоксилазами (N-ациламинокислота—амидогидролаза) или карбоксипептидазами с образованием L-аминокислот.

Исходные ацилированные D,L-аминокислоты получают с помощью обычного химического синтеза. Фермент гидролизует только ацил-L-изомер, отщепляя от него объемную ацильную группу и тем самым резко увеличивая растворимость образующейся L-аминокислоты по сравнению с присутствующим в реакторе ацил-D-изомером. После этого вещества легко разделяются с помощью известных физико-химических приемов. Продуктом является чистая L-аминокислота. Выделенный непрореагировавший D-изомер субстрата подвергается рацемизации и затем вновь разделению. Поскольку скорости ферментативного

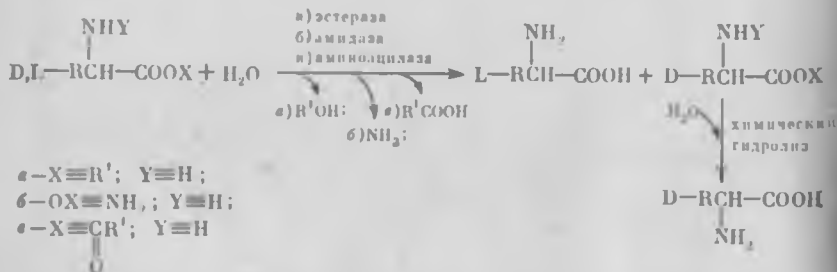


Рис. 2.10. Схемы разделения рацематов аминокислот с помощью стереоспецифического гидролиза

расщепления энантимеров исходного соединения, как правило, сильно различаются (например, гидролиз L-формы N-ацетилметионина ацилазой аминокислот в 10000 раз превышает скорость гидролиза D-формы), это позволяет получить энантимеры аминокислот чрезвычайно высокой оптической чистоты.

При помощи аминокацилаз можно разделить рацемические смеси производных большинства аминокислот; важно лишь строение ацильной части, к которой фермент проявляет специфичность. Ацилазы амидов аминокислот — широко распространенные ферменты; содержатся в тканях животных (ацилаза из почек свиньи), в растениях и микроорганизмах. Деацилирование ацилазами из почек свиньи активируется ионами  $\text{Co}^{2+}$ . Субстратная специфичность ферментов, выделенных из *Aspergillus oryzae*, отличается от таковой для ацилазы почек свиньи. В табл. 2.4 приведены данные по целому ряду аминокацилаз, и в частности по ацилазам I, имеющим менее выраженную субстратную специфичность, и по ацилазам II, которые гидролизуют преимущественно N-ацил-L-аспарагиновую кислоту. Биотехнологи предсказывают важность оптического разделения N-ацетил-D,L-лизина ферментом  $\epsilon$ ,N-ацил-L-лизинаминокацилазой с целью получения высокочистого медицинского L-лизина.

#### 2.4. Субстратная специфичность аминокацилаз

| Аминокислота  | Ацильная группа                           | Относительная скорость гидролиза аминокацилазой |                           |
|---------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------|
|               |                                           | из почек свиньи <sup>*</sup>                    | из гриба <i>A. oryzae</i> |
| Лейцин        | Ацетил                                    | 22                                              | 31                        |
| Изолейцин     | Хлорацетил                                | 69                                              | 46                        |
|               | Ацетил                                    | 1,6                                             | 65                        |
| Метионин      | »                                         | 100 (конт-роль)                                 | 100 (конт-роль)           |
| Глутаминовая  | Хлорацетил                                | 410                                             | 180                       |
|               | Глицил                                    | 62                                              | 26                        |
|               | Ацетил                                    | 13                                              | 37                        |
|               | Хлорацетил                                | 53                                              | 53                        |
| Аспарагиновая | Ацетил                                    | 0,1 <sup>**</sup>                               | 10                        |
|               | Хлорацетил                                | 0,5 <sup>**</sup>                               | 10                        |
| Лизин         | $\alpha,\epsilon$ -Диацетил               | 0,3                                             | 0                         |
|               | $\alpha,\epsilon$ -Дихлорацетил           | 0,6                                             | —                         |
|               | $\epsilon$ -Бензоил- $\alpha$ -ацетил     | —                                               | 83                        |
|               | $\epsilon$ -Бензонл- $\alpha$ -хлорацетил | 0,1                                             | 158                       |
| Триптофан     | Ацетил                                    | <0,1                                            | >4                        |
|               | Хлорацетил                                | <0,1                                            | 63                        |

\* Аминокацилаза I.

\*\* Аминокацилаза II.

Разделение рацемических производных аминокислот на составляющие L- и D-изомеры стало первым процессом в мире, осуществляемым с помощью иммобилизованных ферментов на промышленном уровне. Длительность полуинактивации иммобилизованного фермента в промышленных условиях 65 сут.

Итак, оптически активные L-аминокислоты получают двумя промышленными способами — микробиологическим и химико-энзиматическим. Химические методы обычно приводят к образованию рацематов (таким способом в СССР получают D,L-метионин) и для оптического разделения необходимо применять специальные ферменты.

Микроорганизмы, продуцирующие аминокислоты, выделяют методами селекции и генетического обмена с целью получения высокого выхода продукта. Производство L-лизина с использованием ауксотрофов и регуляторных мутантов развито в промышленном масштабе. Эффективная конверсия D,L- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактама в L-лизин с помощью комбинации лактамазы и рацемазы, а также эффективное разделение ацетил-D,L-лизина грибной аминокиназой станут в ближайшее время новым источником получения высокочистого L-лизина.

Оба подхода имеют свои достоинства и недостатки. В микробном биосинтезе (ферментация аминокислот) аминокислоты могут быть синтезированы на основе простых и дешевых сырьевых материалов, таких как глюкоза, уксусная кислота, меласса, сульфат аммония или мочевина, однако процесс производства, длительный по времени, требует селективного отделения целевой аминокислоты от других сопутствующих при биосинтезе аминокислот, а также очистки стоков при использовании мелассы в качестве источника углерода. Химико-энзиматическая технология более интенсивна, обычно более эффективна, не приводит к образованию побочных продуктов. Однако этот метод нуждается в сложном и более дорогом субстрате или в предшественнике, или в производных аминокислот, а «работоспособность» метода зависит от стабильности и дешевизны фермента или клеточного экстракта. Иммобилизация ферментов и клеток в перспективе может значительно ослабить эти недостатки химико-энзиматических методов.

### **§ 2.3. Продуцирование микроорганизмами антибиотиков и их модификация**

Антибиотики наиболее хорошо известны среди вторичных метаболитов; их описано свыше 6000, продуцируемых плесневыми грибами, актиномицетами, эубактериями и другими микроорганизмами. Некоторые виды микроорганизмов способны продуцировать большое число антибиотиков. Например, штам-

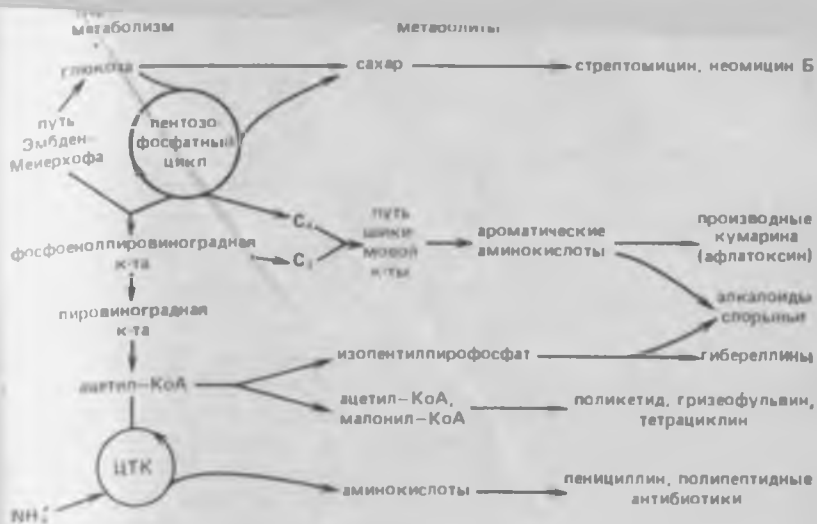


Рис. 2.11. Метаболические связи между первичным и вторичным обменами

мы *Streptomyces griseus* продуцируют до 40 различных антибиотиков. Рассмотрим основные закономерности ферментаций антибиотиков, используя принципы регуляции метаболизма (см. гл. 1), а также метаболические связи между первичным и вторичным обменом (рис. 2.11).

В образование антибиотиков включается около 1% генов продуцента (род *Streptomyces*), кодирующих структуру ферментов биосинтеза. Отсюда понятны трудности не только с генетическим, но и с биохимическим анализом путей биосинтеза антибиотиков.

Большое число антибиотиков, содержащих ароматические заместители, синтезируется клетками микроорганизмов из промежуточных и конечных продуктов превращения ароматических аминокислот — путь шикимовой кислоты (рис. 2.12). Так, сопряженные С—С-связи хлорамфеникола и коринцеина «переносятся» из хоризмовой кислоты (через промежуточный *l*-аминофенилаланин); ароматический компонент рифамицина — из шикимовой кислоты; феназиновые «скелеты» пиоцианина — из антрахиноновой кислоты; ароматические кольца актиномицина, индолмицина, пирролинтрина — из триптофана и т. д. Основной предшественник — шикимовая кислота — образуется конденсацией эритрозо-4-фосфата (продукта пентозофосфатного цикла) с фосфоенолпировинатом (продуктом гликолиза) и конвертируется в хоризмовую кислоту. Последняя с помощью хоризматмутазы

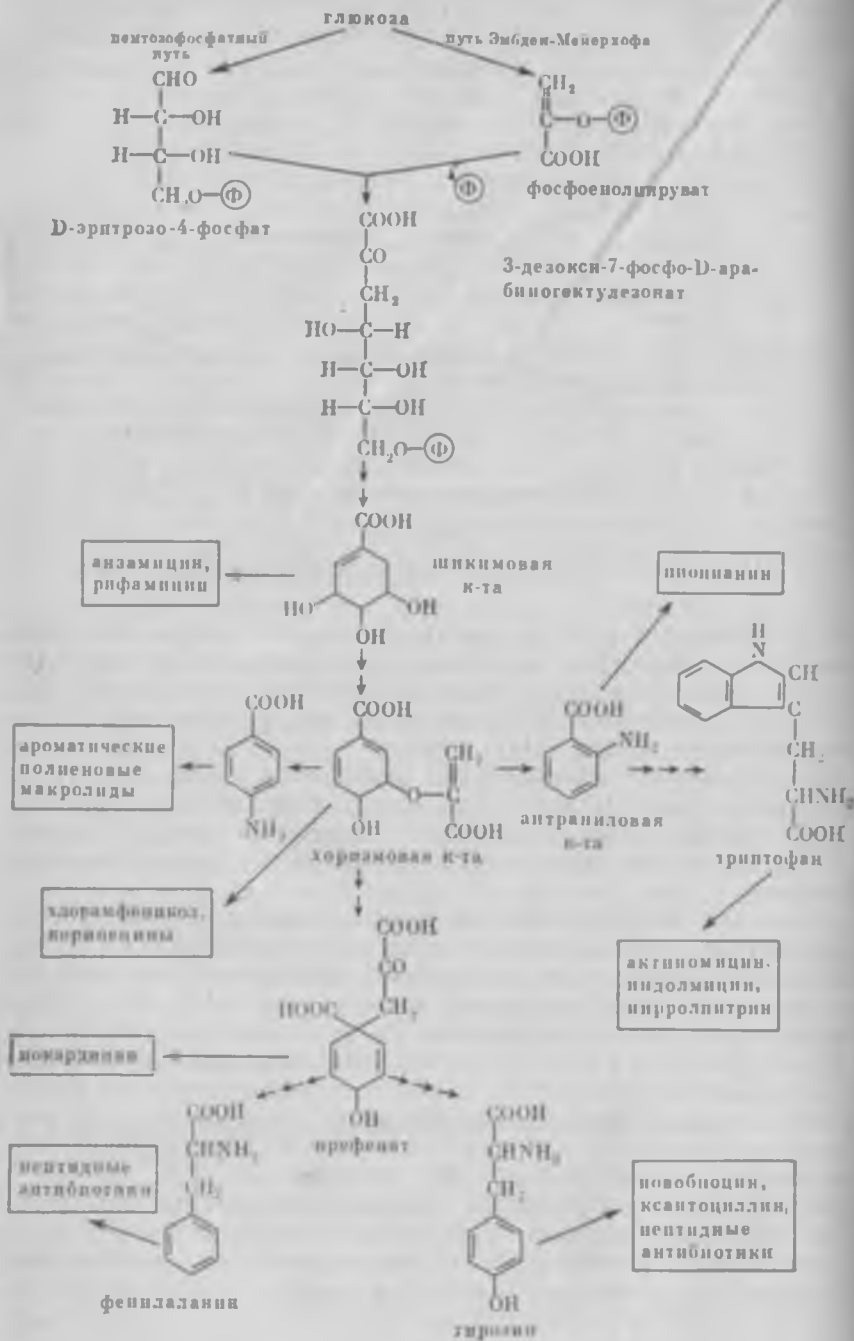


рис. 2.13. Синтез вторичного метаболита при переходе от трофофазы к идиофазе:

1 — концентрация сахара; 2 — рост пеницеллы; 3 — концентрация пенициллина

может давать префеновую кислоту или антрахиловую кислоту, если катализ ведет антранилатсинтетаза (см. рис. 2.4).

**Трофофаза и идиофаза во вторичном метаболизме.** Период ферментации

на богатых питательными веществами (в том числе промышленными) средах делится на трофофазу и идиофазу, причем во время трофофазы антибиотики (идиолиты) в сколько-нибудь значительных количествах не образуются. Картина такой фазовой зависимости показана на рис. 2.13 на примере пенициллина. Задержка в образовании антибиотика обычно обусловлена исчезновением питательного компонента, например легкоутилизируемого сахара, источника азота или фосфора.

Возможно, эти ограничения в поступлении к микроорганизмам недостающих питательных веществ обуславливают то, что индукторы ферментов вторичного метаболизма аккумулируют или высвобождают гены вторичного метаболизма из-под влияния катаболитной репрессии. По-видимому, в конце трофофазы происходят заметные изменения в ферментном составе клеток и именно к этому периоду появляются ферменты, «включающие» биосинтез вторичных метаболитов, например,  $\delta$ -( $\alpha$ -амино-идипил)-цистеннвалинсинтетаза при синтезе пенициллина-N, соответствующие синтетазы при получении грамицидина S и актиномицина, аминотрансферазы и амидинотрансферазы при синтезе стрептомицина и т. п.

С указанными явлениями тесно связаны некоторые закономерности, постоянно учитываемые в промышленной биотехнологии, — репрессия синтеза ферментов фазы образования антибиотиков быстро усваивающимися углеводами, подавление этого процесса неорганическим фосфатом при высокой стимулирующей рост концентрации и т. п.

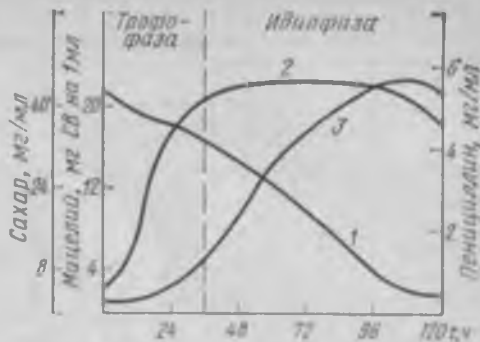


Рис. 2.12. Биосинтез антибиотиков и других вторичных метаболитов из ароматических промежуточных соединений, в том числе из ароматических аминокислот (путь шикимовой кислоты)

| Источник углерода | Максимальное продуцирование антибиотика, мг/мл | Максимальный массовый выход сухих клеток по массе, мг/мл | Удельный выход антибиотика, мг на 1 мг сухих клеток |
|-------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Глюкоза           | 830                                            | 22,5                                                     | 36,9                                                |
| Мальтоза          | 1130                                           | 21,8                                                     | 51,9                                                |
| Фруктоза          | 1250                                           | 21,5                                                     | 58,1                                                |
| Галактоза         | 1650                                           | 19,1                                                     | 86,4                                                |
| Сахароза          | 1040                                           | 11,9                                                     | 87,4                                                |

Из табл. 2.6 видно, что удельный выход  $\beta$ -лактамного антибиотика (цефалоспорин С) на основе различных углеродных источников уменьшается от сахарозы к глюкозе. Наиболее оптимальная среда для биосинтеза антибиотика актиномицина культурой *Streptomyces antibioticus* содержит 0,1% глюкозы и 1% галактозы. В такой среде глюкоза быстро утилизируется во время трофофазы. Когда глюкоза исчерпывается, микроорганизм переключается на утилизацию галактозы и начинается идиофаза. Дробная подача глюкозы (до инициирования синтеза метаболита) приводит к полному подавлению синтеза антибиотиков. С другой стороны, более высокую активность культуры обуславливают низкие концентрации глюкозы. Выявлен фермент, наиболее чувствительный к репрессии глюкозой, — феноксазинсинтетаза. Именно он определяет образование феноксазиновой системы у актиномицинов.

Интенсификация биосинтеза антибиотиков до уровня, наблюдаемого у сверхпродуцентов, возможна лишь в том случае, если будет предотвращено аллостерическое ретронингибирование (т. е. ингибирование антибиотиком активности фермента своего биосинтеза по принципу обратной связи) и явление, специфичное для антибиотиков, — подавление ими метаболизма собственного продуцента (хлорамфеникол, вирджиниаминцин, пенициллин и др.).

Пути биосинтеза многих антибиотиков представляют собой отклонения от путей биосинтеза первичных метаболитов, поэтому следует учитывать возможность ретронингибирования первичным метаболитом. Так, биосинтез пенициллина микроорганизмом *Penicillium chrysogenum* подвергается ретронингибированию со стороны L-лизина. Причину такого эффекта можно установить, если рассмотреть разветвленный путь метаболизма, представленный на рис. 2.14.

Один из промежуточных продуктов биосинтеза лизина, а именно  $\alpha$ -аминоадипиновая кислота, включается в начальные пептидобразующие ступени биосинтеза. Если добавки лизина к

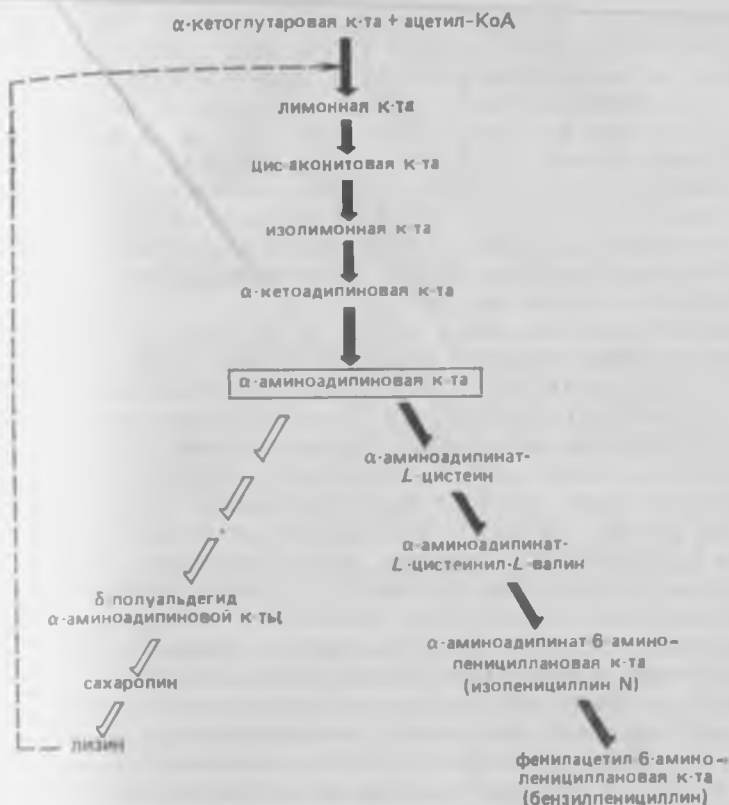


Рис. 2.14. Схема синтеза лизина и пенициллина у *Penicillium chrysogenum*

*Penicillium chrysogenum* замедляют образование пенициллина, то α-аминоадипиновая кислота не только «снимает» ингибирующий эффект лизина, но и стимулирует синтез пенициллина в отсутствие лизина.

Ингибирование лизином образования пенициллина является результатом эффекта обратной связи на собственный биосинтез лизина, т. е. ингибирования первого фермента биосинтеза — гомоцитратсинтетазы. Этот эффект приводит к дефициту α-аминоадипиновой кислоты, необходимой для образования пенициллина.

Активность гомоцитратсинтазы очень важна во время продуктивной фазы (идиофазы). Специфичность этого фермента заметно падает в начале идиофазы, и добавление лизина умень-

шает его и без того уже низкую активность. При внесении L-α-аминоадипиновой кислоты в процессе ферментации пенициллина ингибирующее влияние лизина «снимается», и, наоборот, в питательных средах с высоким содержанием лизина (или для мутантов с увеличенной продуктивностью лизина) практически обеспечивается ингибирование продукции пенициллина. Следует отметить то, что завершение многосуточной ферментации высоким выходом антибиотика невозможно при подавлении (инактивации) им жизнедеятельности своего продуцента. Микроорганизмы имеют различные механизмы защиты от вырабатываемого ими антибиотика.

Следует отметить, что граница между первой и второй биосинтетическими фазами приходится очень часто на фазу замедления скорости роста популяции. При этом пик максимума удельной скорости накопления идиолита обнаруживается в период достижения максимальной концентрации клеток микроорганизмов. Циклический пептидный антибиотик — грамицидин S — не продуцируется до завершения клеточного цикла *Bacillus brevis*, так как грамицидин-S-синтетаза не образуется вплоть до последних участков логарифмической фазы роста. После достижения пика удельной активности ферменты быстро исчезают, как только клетки «входят» в стационарную фазу. Более того, чем выше удельная скорость роста продуцента, тем ниже уровень концентрации грамицидин-S-синтетазы.

В то же время эта граница лабильна и подчиняется кинетическому контролю (контролю удельной скорости роста) путем изменения состава питательной среды или концентрации источника углерода, значений pH среды, интенсивности аэрации и других факторов. В ряде таких случаев происходит смещение (в сторону синхронности) синтеза некоторых экзометаболитов к первой биосинтетической фазе (при использовании низкой концентрации быстрометаболизируемого источника углерода — глюкозы или химически определенной синтетической среды, в которой поддерживается более низкая удельная скорость роста и т. д.).

**Влияние предшественников на синтез антибиотиков.** Отклики на стимулирующие добавки при ферментациях некоторых вторичных метаболитов могут быть связаны с явлением индукции синтеза ферментов в идиофазе.

Индуктивный эффект обнаружен, например, в биосинтезе цефалоспоринов С у сернистых ауксотрофов *Cephalosporium acremonium* при добавках метионина. Эта аминокислота не требуется для роста микроорганизма, хотя может быть использована как источник азота или серы. Влияние метионина обнаруживается лишь тогда, когда он добавляется во время роста. Метионин оказался эффективным предшественником атома S



Рис. 2.15. Пути метаболизма серы в клетках *Cephalosporium* sp.

для цефалоспорина С; другие промежуточные продукты метаболизма серы от метионина к цистеину действовали без достаточного стимулирующего эффекта (метионин > цистатионин > цистеин). Как видно из биохимической схемы (рис. 2.15), цистеин и цистатионин должны конвертировать в метионин через транссульфирование, прежде чем они могут стимулировать биосинтез антибиотика, даже если их активность как предшественников серы не обуславливается метионином. Генетическое блокирование путей метаболизма между сульфат-ионом и метионином или между цистеином и метионином (транссульфирование) изолирует синтез антибиотика при росте на сульфат-ионе или цистеине, хотя пути от этих источников серы к цефалоспорину С остаются открытыми, т. е. присутствие метионина является обязательным для синтеза антибиотика. Более того, индукция метионином адекватно моделируется норлейцином, «бессерным» аналогом. По-видимому, индукция ферментов биосинтеза цефалоспорина С у *Cephalosporium acremonium* вызывается углеводородными фрагментами метионина или норлейцина.

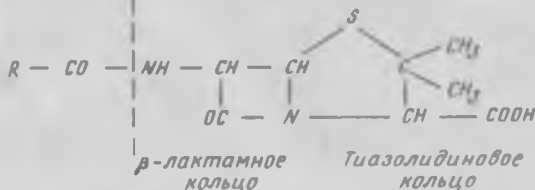
Индукция синтеза ферментов идиофазы играет также важную роль в интерконверсии (трансформации) «родственных» антибиотиков — стрептомицинов. Так, маннин действует как индуктор  $\alpha$ -D-маннозидазы, которая конвертирует маннозидострептомицин в стрептомицин (оба антибиотика продуцируются в отсутствие индуктора одновременно).

Хотя неизвестен точный механизм дерепрессирования (индуцирования) первичными метаболитами генов, кодирующих синтез ферментов вторичного метаболизма, имеется ряд рекомендаций по оптимизации биосинтеза. Так, индукция вторичного метаболизма требует добавления молекулы эффектора в ферментируемую среду для синтеза вторичного метаболита, т. е. во время ростовой фазы периодической ферментации. Первичный метаболит как предшественник должен лимитировать скорость биосинтеза антибиотика. Только в этом случае он будет проявлять стимулирующую роль при добавках в ферментационную среду. Производство бензилпенициллина сильно стимулируется добавками метаболитического предшественника — фенилуксусной кислоты. Пропионовая кислота и пропиловый спирт стимулируют биосинтез макролидных антибиотиков через метилмалонил-КоА. В образовании пептидных антибиотиков небелковые аминокислоты являются ростовыми факторами (орнитин стимулирует биосинтез бацитрацина; L-фенилаланин — предшественник D-фенилаланинового компонента грамицидина S). Наконец, поскольку стимуляционные эффекты являются концентрационнонезависимыми, следует ожидать увеличения внутриклеточного пула эффекторного метаболита или его производных до появления ферментов вторичного метаболизма. Подобные случаи использования предшественников известны как направленный биосинтез антибиотиков.

В работе с геномом продуцентов антибиотиков проводят слияние протопластов (получен отечественный фагоустойчивый и высокоактивный штам — продуцент кормового антибиотика гризина), используют генетические манипуляции и генетический обмен. С применением плазмид актиномицетов — продуцентов более 70% известных антибиотиков, актинофагов и микровирусов — клонированы многие гены биосинтеза актиномицетов, в первую очередь гены, определяющие устойчивость рекомбинантного штамма к антибиотикам. Некоторые разработки в этой области указывают на быстрый прогресс в деле создания промышленно важных антибиотиков с использованием актиномицетных гибридных плазмид.

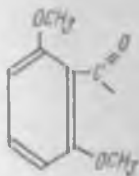
**Энзиматическая модификация микробных антибиотиков.**  
**6-Аминопенициллановая кислота.** Помимо пенициллинов и цефалоспоринов, получаемых путем ферментации, выпускаются так называемые полусинтетические пенициллины и цефалоспорины. Основные преимущества этих модифицированных антибиотиков по сравнению с природными (микробными) заключаются в их стабильности при различных pH, способности угнетать устойчивые к другим антибиотикам формы бактерий, расширенный антимикробный спектр действия.

Получение новых, более эффективных соединений связано с изменением его боковой цепи

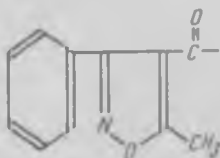


при сохранении целостности остальной части, так называемого ядра антибиотика — 6-аминопенициллановой кислоты. Поскольку масштабный химический синтез таких соединений пока невозможен, самым простым способом является отщепление боковой цепи биосинтетического пенициллина, выделение 6-аминопенициллановой кислоты и последующее ацилирование ее аминогруппы с получением полусинтетического аналога. Однако химическая модификация обычно включает несколько стадий, требует широкого диапазона температур (начиная от  $-40^{\circ}\text{C}$ ) и не дает высокого выхода 6-аминопенициллановой кислоты.

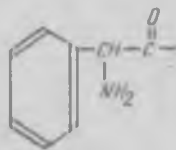
Подобное избирательное превращение может быть проведено в одну стадию в обычных условиях (рН 7,8—8,0) при 40—50 °С в водной среде с использованием специфического фермента — пенициллинамидазы (пенициллинамидогидролаза, или, с учетом обратной синтетазной функции, ацил-КоА:6-аминопенициллановая кислота ацилтрансфераза). По механизму действия фермент является ацилазой, поэтому иногда его называют пенициллинацилазой. Получение 6-аминопенициллановой кислоты с использованием иммобилизованной пенициллинамидазы стало первым в СССР технологическим процессом инженерной энзимологии. Внедрение масштабного производства 6-аминопенициллановой кислоты может далее обеспечивать синтез полусинтетических пенициллинов с радикалами R=



### Метициллин



### Оксациллин



### Ампициллин

Природа органической кислоты, продукта гидролиза пенициллина, зависит от типа последнего. Фенилуксусная кислота,

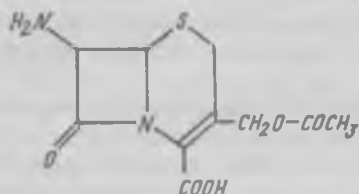
например, образуется при гидролизе бензилпенициллина (пенициллина G); феноксиуксусная кислота — продукт гидролиза феноксиметилпенициллина (пенициллина V). Ацилазы классифицируются на основе их субстратной специфичности на три типа фермент I, гидролизующий преимущественно пенициллин V, основными продуцентами его являются клетки эукариотов; фермент II, гидролизующий преимущественно пенициллин G, основными продуцентами его являются грамотрицательные бактерии, например *E. coli*; фермент III, гидролизующий  $\alpha$ -аминобензилпенициллин (ампициллин) и продуцируемый культурой рода *Pseudomonas*.

За исключением фермента из *Bacillus megaterium*, все ацилазы являются внутриклеточными и требуют специальной технологии выделения; наиболее хорошо изучены физико-химические и технологические свойства ацилазы II типа из *E. coli*. Большинство ацилаз быстро инактивируется при температурах выше 60 °C и при pH выше 8,5. Гидролитическая реакция протекает эффективно при 37—55 °C и pH 7,0—8,0. Как правило, при концентрациях феинлуксусной кислоты более 45 мМоль/л и 6-аминопенициллановой кислоты более 26 мМоль/л ферменты II типа обратимо ингибируются; первый ингибитор конкурентного действия, второй — неконкурентного.

При выращивании продуцентов пенициллинацилаз следует иметь в виду, что активность культуры существенно повышается, если в среду вводить фенилуксусную кислоту; введение феноксуксусной кислоты оказывает меньший эффект. Угнетение биосинтеза ацилазы в *E. coli* наблюдали при повышенных температурах и высоких концентрациях растворенного кислорода в среде (даже в присутствии индуктора). Характерная особенность пенициллинацилазы в *E. coli* — регуляция его биосинтеза посредством механизма катаболитной репрессии; абсолютными репрессорами являются глюкоза, мальтоза, глицерин, а уксусная кислота частично репрессировывает синтез. Репрессирующий эффект полностью снимает цАМФ. Однако синтез пенициллинацилазы штаммами *Proteus nictigeri* не репрессировывается глюкозой, глицерином или уксусной кислотой, и добавки этих соединений индуцируют энзимный синтез. Для этого типа микроорганизмов катаболитная репрессия обнаруживается при использовании сред, содержащих янтарную, фумаровую или яблочную кислоты как единственный источник углерода. Выделены клоны *E. coli* после генетических манипуляций, ацилазная активность которых в 45 раз выше, чем нативных клеток.

Следует подчеркнуть, что пенициллинацилаза обладает обратимым действием, осуществляя в режиме pH 5,0—5,5 реакцию ацилирования (перенос ацильной группировки). При использовании  $\beta$ -производных карбоновых кислот типа  $R-C(O)-$

$\text{NHR}_1$  или  $\text{R}-\text{C}(\text{O})-\text{SR}_1$  (где радикал  $\text{NHR}_1$  — глицин, радикал  $\text{SR}_1$  — тиогликолевая кислота, а  $\text{R}$  — фенил), имеющих электронодонорные заместители, скорость реакции ацилирования возрастает. Таким способом получают новые  $\beta$ -лактамы антибиотики на базе 6-АПК, причем превращение «ядер» в целевое  $\beta$ -лактамное соединение в реакционной смеси протекает с высоким выходом (до ацилирования 6-аминопенициллановой кислоты образуется КоА-производное, с которым и реагирует 6-аминопенициллановая кислота). Энзиматический гидролиз осуществляют для получения 7-аминоцефалоспориновой кисло-



ты, ключевого соединения для синтеза новых цефалоспоринов на основе использования иммобилизованной специфической пенициллинамидазы из микроорганизмов рода *Kluyvera* (цефалоридин, цефалотин и др.).

#### § 2.4. Регуляция образования ферментов как конечных продуктов

Основным критерием при отборе микроорганизмов — продуцентов ферментов как конечных продуктов — является уровень ферментативной активности, поэтому очень важна их селекция. Уровни накопления ферментов в клетках могут быть повышены в 100—1000 раз путем генетического обмена и подбора питательных сред. Культивирование продуцентов ферментов только тогда экономично, когда ферментационные циклы коротки, сравнительно дешевы питательные среды, а также высока специфичность внутри- или внеклеточных ферментных белков.

В качестве продуцентов ферментов используют микроорганизмы мезофильные, растущие при 25—40 °С, и термофильные, оптимум роста которых лежит в интервале 50—80 °С. Использование термофильных продуцентов ферментов позволяет вести технологический процесс в защищенных от посторонней мезофильной микрофлоры условиях, при повышенной растворимости субстратов и т. п. Если возникает необходимость вести процесс при экстремальных значениях pH, могут быть использованы микроорганизмы ацидофильные с оптимумом pH 2—4 или алкалофильные с оптимумом pH 8—11.

На комплексных средах достигаются более высокие выходы ферментов, чем на синтетических. Более того, первые среды оказываются и более экономичными с производственной точки зрения. Комплексные среды, однако, затрудняют управление биосинтезом ферментов, поскольку при этом культура синтезирует обычно комплекс ферментов, а отдельные ферменты подлежат различным механизмам регуляции. В таких случаях фенотипическая оптимизация получения ферментов осуществляется в основном эмпирически.

Для продуцирования ферментов разрабатывают методы непрерывного культивирования в режиме хемостата, так как образование многих ферментов контролируется скоростью роста продуцента, которая в хемостатной культуре поддерживается постоянной.

**Фенотипическая оптимизация биосинтеза ферментов.** Структурные гены, кодирующие образование многих ферментов, при отсутствии субстратов обычно неактивны. Когда в систему вводится подходящий субстрат-индуктор, структурные гены «включаются» в работу — инициируют образование ферментов (последние в этом случае называются индуцибельными, ими чаще всего оказываются катаболические ферменты).

Индукторы — аналоги субстрата, которые лишь индуцируют, но не метаболизируют. Примерами таких аналогов являются: изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозид для индукции  $\beta$ -галактозидазы при ферментации *E. coli* на лактозе; N-ацетилацетамид — для алифатической амидазы (субстрат — ацетамид); метициллин — для пенициллин- $\beta$ -лактамазы (субстрат — бензилпенициллин); D-тирозин — для тирозиназы (субстрат — тирозин). Постоянная добавка таких индукторов всегда приводит к оптимизации продуцирования ферментов. Перевод индуцирующего субстрата в медленно катаболизируемое сложное соединение — другая возможность. Так, при продуцировании инвертазы грибами *Pullularia pullulans* вводят эфир сахарозы — монопальмитат — вместо сахарозы. В этом случае достигается 100-кратное, а для продуцирования  $\beta$ -галактозидазы у *E. coli* — даже 1000-кратное повышение содержания ферментов в клетке. Типичными индукторами являются также такие медленно утилизируемые субстраты, как целлюлоза и целлобиоза (10-кратный эффект) для продуцирования целлюлозы у *Trichoderma viride*; декстран и дипальмитат изомальтозы (1000-кратный эффект) для продуцирования декстраназы у *Penicillium funiculosum*; ксилоза, целлобиоза и карбоксиметилцеллюлоза для продуцирования глюкоамилазы у различных видов *Rhizopus*.

Наконец, и такой прием используется в связи с индукцией, как непрерывная подача субстрата в малой концентрации.

Предполагают, что индуктором биосинтеза целлюлаз — ферментов промышленного значения — различными продуцентами является олигомер глюкозы (например, софороза). Индуцирующее действие софорозы (2-0- $\beta$ -D-глюкопиранозил-D-глюкозы) наблюдали во многих случаях. В низких концентрациях она индуцирует биосинтез целлюлаз грибом *Tr. viride*, а при больших концентрациях подавляет его. Этот эффект объясняют расщеплением софорозы с образованием глюкозы и дальнейшей репрессией синтеза целлюлаз катаболитом. Существенным фактором является концентрация глюкозы, образующейся в процессе биосинтеза целлюлаз, так как при концентрации более 0,01 г/л биосинтез подавляется.

Найдено, что для некоторых продуцентов рода *Trichoderma* эффективным индуктором синтеза целлюлаз является лактоза, действие которой проявляется при достаточно высоких концентрациях (2%). Эффект индукции синтеза целлюлаз у *Tr. lignorum* лактозой обусловлен, в частности, тем, что скорость утилизации продуктов ее расщепления (глюкозы и галактозы) превышает скорость их образования, поэтому катаболитная репрессия не наступает.

Важное значение для синтеза целлюлаз имеет присутствие в питательных средах аминокислот. При культивировании *Tr. lignorum* наилучшие результаты получены, например, при введении в питательную среду валина, глутаминовой и аспарагиновой кислот. Образование целлюлаз у *Tr. viride* стимулировали цистеином, цистином, метионином. В производстве ферментов часто используют не чистые аминокислоты, а дрожжевые экстракты, автолизаты, гидролизаты или ферментализаты дрожжей.

Добавление в среду поверхностно-активных веществ (ПАВ) также увеличивает целлюлазную активность микробной культуры. Внесение олеата натрия (0,1%) в среду с целлобиозой приводит к 100-кратному увеличению целлюлазной активности культуры *Tr. viride*. По-видимому, ПАВ облегчают доступ целлобиозы к связанной на клеточной мембране гликозилтрансферазе, которая обуславливает образование индуктора (например, софорозы). Другим следствием их действия может быть повышение клеточной проницаемости, в результате чего возрастает продуктивность клеток и уровень накопления ферментов.

И все же наиболее сильный прием интенсификации процесса биосинтеза ферментов как целевых продуктов — использование генетически дефектного мутанта. В связи с этим далее мы рассмотрим факторы, которые непосредственно влияют на генетический контроль образования ферментов.

**Генотипическая оптимизация синтеза ферментов.** Штаммы, которые способны к сверхсинтезу ферментов, можно селекцио-

ировать, воздействуя на генетический аппарат клеток. Практическое значение имеют следующие виды мутантов.

Мутанты с конститутивным синтезом ферментов. Дефекты в репрессивном и операторном генах могут привести к тому, что субстратная индукция, типичная для многих катаболических ферментов, исключается. Иными словами, если мутации регуляторных генов устраняют образование активных репрессоров или если мутации в генах-операторах подавляют их способность связывать репрессоры, то биосинтез фермента мутантом может протекать без индуктора. Конститутивные мутанты, продуцирующие ферменты без индуктора, селекционируют в непрерывной культуре, выращиваемой в условиях лимита по субстратному ингибитору (например,  $\beta$ -галактозидаза у *E. coli* при лимитирующих концентрациях лактозы).

Мутанты, нечувствительные к репрессии конечным продуктом. Подавление синтеза ферментов конечным продуктом, проявляющееся прежде всего у анаболических ферментов, может «сниматься» благодаря дефектам в регуляторном и операторном генах. Для селекции таких мутантов используют описанный в главе 1 метод антиметаболитов. Протеазы у многих видов рода *Bacillus* весьма слабо образуются в средах, содержащих смеси аминокислот. Мутанты в таких средах продуцируют конститутивные протеазы.

Мутанты, резистентные к катаболитной репрессии. Как уже отмечалось, эффекту глюкозы подвергаются многие ферменты катаболитно-индуцируемого типа. Этот вид регуляции имеет важное значение для синтеза многих ферментов в промышленном масштабе.

Исключение из питательных сред репрессирующих источников углерода в значительной мере стимулирует продуцирование ферментов, чувствительных к катаболитному подавлению. Подавляющее действие можно снять медленным подводом той же глюкозы (этот прием ограничивает скорость роста).

Для селекции резистентных к катаболитному подавлению мутантов — продуцентов ферментов широко используют следующие приемы:

попеременное культивирование на глюкозе и лактозе, использование которых приводит к катаболитной репрессии. Дефектные мутанты синтезируют ферменты для лактозы и обгоняют в росте нативный штамм;

применение в питательной среде в качестве источника азота аминокислот, расщепление которых приводит к катаболитной репрессии (например, глюкозопрониновый агар). В присутствии глюкозы нативный штамм не растет (синтез пролиноксидазы репрессируется глюкозой, азот из аминокислоты не утилизиру-

ется). Только дефектные мутанты способны окислять аминокислоту и таким образом получать азот.

Мутанты с искусственной дозировкой генов. Другой путь для повышения эффективности синтеза ферментов — получение мутантов с многочисленными копиями структурного гена, кодирующего синтез соответствующего фермента. Поскольку увеличение числа копий конкретного гена обычно повышает синтез специфического для него фермента, желательно специально интенсифицировать процесс накопления копий генов. Так, при переносе плазмид, содержащих соответствующие структурные гены, в культуры реципиентов (*E. coli*) происходит накопление копий путем автономной репликации ДНК. Таким способом обеспечивается резкое повышение выхода  $\beta$ -галактозидазы, пенициллиназы, аспартаттранскарбамилазы и целлюлазы.



Не вызывает сомнения, что генетические манипуляции, подобные тем, которые оказались возможными для кишечных бактерий, со временем можно будет применять к промышленным микроорганизмам, продуцирующим ферменты. Хорошими объектами могут считаться гены культур родов *Bacillus* или *Zytoplasma*. В последнее время появилось понятие «инженерия» белков. Этот прием еще редко используется и сопряжен с определенными трудностями, но он весьма перспективен, поскольку позволяет изменять структуру ферментов, увеличивать их стабильность и создавать суперпродуценты.

## § 2.5. Микробиологическое и химико-энзиматическое получение органических кислот

Органические кислоты в культурах микроорганизмов образуются в результате брожения или неполного окисления субстрата. В настоящее время только семь органических кислот производится в промышленных масштабах, причем лимонную, глюконовую, кетоглюконовую и итаконовую кислоты получают только микробиологическим путем, молочную и уксусную — химическим и микробиологическим, а яблочную — химическим и энзиматическим. Все кислоты, продуцируемые микроорганизмами, являются промежуточными или конечными продуктами деградации источника углерода. Для анаэробных бактерий молочная кислота — промежуточный продукт катаболизма источника углерода. Кислоты глюконовая и кетоглюконовая, обра-

зуемые аэробными микроорганизмами, оказываются интермедиатами прямого окисления глюкозы (без фосфорилирования) в клетках некоторых аэробных бактерий и грибов. Лимонная, фумаровая и яблочная кислоты являются интермедиатами цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), основного пути катаболизма любого источника углерода, имеющегося в клетках большинства аэробных микроорганизмов. Уксусная кислота является продуктом окисления этанола.

**Лимонная кислота.** Биосинтез лимонной кислоты осуществляют с помощью культуры *Aspergillus niger*, специально селекционированной для получения высоких выходов продукта. В качестве углеродсодержащего субстрата используют мелассу, которая кроме углеводов, содержит большой ряд органических кислот. Применение определенной питательной среды с сахарозой приводит к меньшему качественному разнообразию кислот (лимонная, щавелевая и глюконовая кислоты).

Биохимический механизм образования лимонной кислоты основан на функционировании цикла трикарбоновых кислот (рис. 2.16). Дегидрирование уксусной кислоты приводит к образованию двух молекул  $\text{CO}_2$  и четырех пар ионов водорода. В цикле происходит также образование НАДН и АТФ. Хотя большинство реакций цикла обратимы, основным направлением течения энзиматических реакций является образование щавелевоуксусной кислоты через  $\alpha$ -кетоглутаровую, янтарную и фумаровую кислоты.

Реакцией, лимитирующей скорость оборота цикла, является синтез лимонной кислоты, катализируемый аллостерическим ферментом цитратсинтетазой. Источником ацетил-КоА, который идет на синтез метаболитов цикла, является продукт цикла — лимонная кислота — легко переходящая в цитоплазму через мембрану. Как правило, из ЦТК на нужды биосинтеза уходит значительное количество метаболитов, и для пополнения их фонда и функционирования полного цикла в клетках существуют дополнительные возмещающие (анаплеротические) ферментативные механизмы, например глиоксилатный шунт (цикл). В последнем, в отличие от ЦТК, уксусная кислота расходуется на синтез. Следовательно, первой реакцией ЦТК является конденсация ацетил-КоА со щавелевоуксусной кислотой, катализируемая цитратсинтетазой. Именно активность этого фермента является контролирующим параметром, определяющим скорость метаболического потока в цикле. Ингибирующий эффект на цитратсинтетазу оказывает НАДН и сукцинил-КоА. Но основное влияние на скорость синтеза лимонной кислоты оказывает поступление субстрата (щавелевоуксусной кислоты). Так как непрерывная «работа» ЦТК требует реокисления восстановленных эквивалентов (используются четыре типа дегидроге-

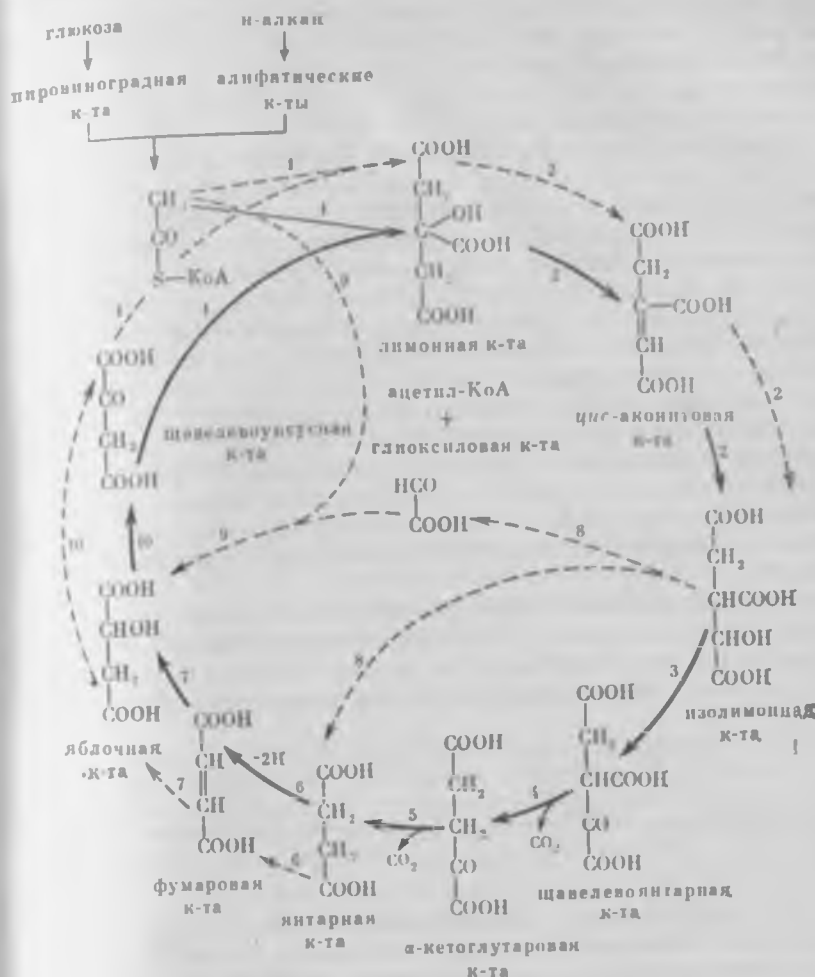


Рис. 2.16. Цикл трикарбоновых кислот (сплошные стрелки) и глиоксильный шунт (пунктирные стрелки):

1 — цитратсинтетаза; 2 — аконитаза; 3 и 4 — изоцитратдегидрогеназа; 5 — α-кетоглутаратдегидрогеназа; 6 — сукцилатдегидрогеназа; 7 — фумараза; 8 — изоцитратлиаза; 9 — малатсинтетаза; 10 — малатдегидрогеназа

наз), максимальная скорость цикла наблюдается в условиях достаточного доступа кислорода в клеточную систему (т. е. при хорошей аэрации).

Процесс брожения с образованием лимонной кислоты протекает при низких значениях pH. Щавелевая кислота обычно накапливается в тот период, когда pH среды ближе к нейтраль-

зубые аэробными микроорганизмами, оказываются интермедиатами прямого окисления глюкозы (без фосфорилирования) в клетках некоторых аэробных бактерий и грибов. Лимонная, фумаровая и яблочная кислоты являются интермедиатами цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), основного пути катаболизма любого источника углерода, имеющегося в клетках большинства аэробных микроорганизмов. Уксусная кислота является продуктом окисления этанола.

**Лимонная кислота.** Биосинтез лимонной кислоты осуществляют с помощью культуры *Aspergillus niger*, специально селекционированной для получения высоких выходов продукта. В качестве углеродсодержащего субстрата используют мелассу, которая кроме углеводов, содержит большой ряд органических кислот. Применение определенной питательной среды с сахарозой приводит к меньшему качественному разнообразию кислот (лимонная, щавелевая и глюконовая кислоты).

Биохимический механизм образования лимонной кислоты основан на функционировании цикла трикарбоновых кислот (рис. 2.16). Дегидрирование уксусной кислоты приводит к образованию двух молекул  $\text{CO}_2$  и четырех пар ионов водорода. В цикле происходит также образование НАДН и АТФ. Хотя большинство реакций цикла обратимы, основным направлением течения энзиматических реакций является образование щавелевоуксусной кислоты через  $\alpha$ -кетоглутаровую, янтарную и фумаровую кислоты.

Реакцией, лимитирующей скорость оборота цикла, является синтез лимонной кислоты, катализируемый аллостерическим ферментом цитратсинтетазой. Источником ацетил-КоА, который идет на синтез метаболитов цикла, является продукт цикла — лимонная кислота — легко переходящая в цитоплазму через мембрану. Как правило, из ЦТК на нужды биосинтеза уходит значительное количество метаболитов, и для пополнения их фонда и функционирования полного цикла в клетках существуют дополнительные возмещающие (анаплеротические) ферментативные механизмы, например глиоксилатный шунт (цикл). В последнем, в отличие от ЦТК, уксусная кислота расходуется на синтез. Следовательно, первой реакцией ЦТК является конденсация ацетил-КоА со щавелевоуксусной кислотой, катализируемая цитратсинтетазой. Именно активность этого фермента является контролирующим параметром, определяющим скорость метаболического потока в цикле. Ингибирующий эффект на цитратсинтетазу оказывает НАДН и сукцинил-КоА. Но основное влияние на скорость синтеза лимонной кислоты оказывает поступление субстрата (щавелевоуксусной кислоты). Так как непрерывная «работа» ЦТК требует реокисления восстановленных эквивалентов (используются четыре типа дегидроге-

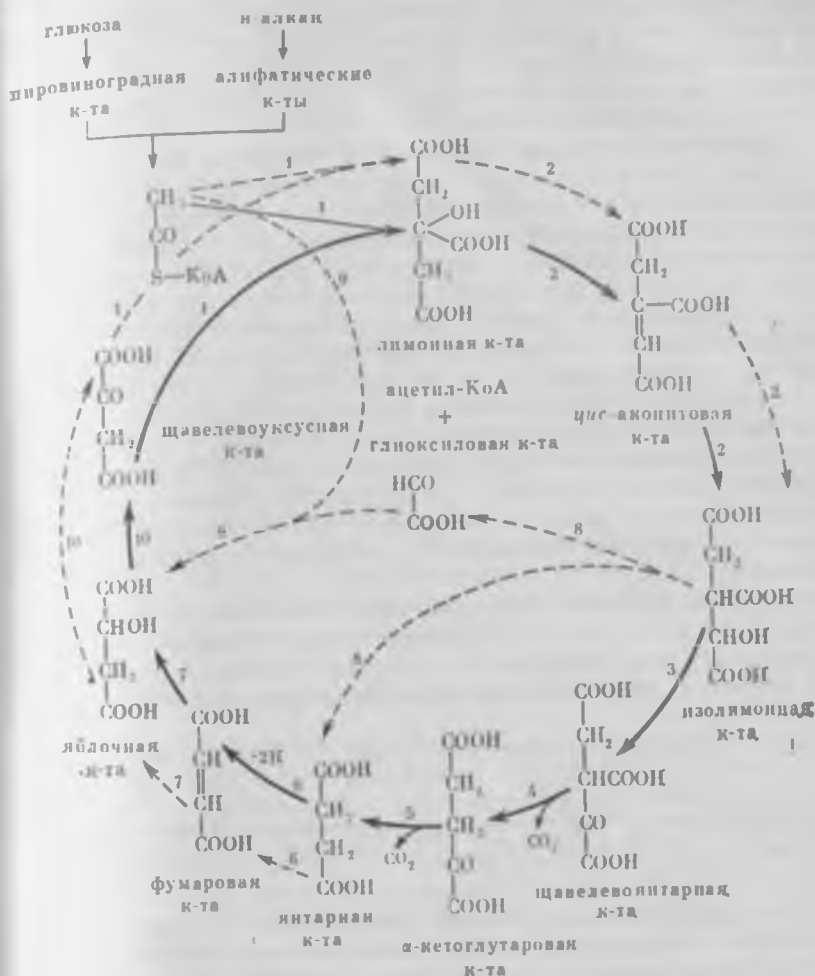


Рис. 2.16. Цикл трикарбоновых кислот (сплошные стрелки) и глиоксилатный шунт (пунктирные стрелки):

1 — цитратсинтетаза; 2 — аконитаза; 3 и 4 — изоцитратдегидрогеназа; 5 — α-кетоглутаратдегидрогеназа; 6 — сукцинатдегидрогеназа; 7 — фумараза; 8 — изоцитратлиаза; 9 — малатсинтетаза; 10 — малатдегидрогеназа

наз), максимальная скорость цикла наблюдается в условиях достаточного доступа кислорода в клеточную систему (т. е. при хорошей аэрации).

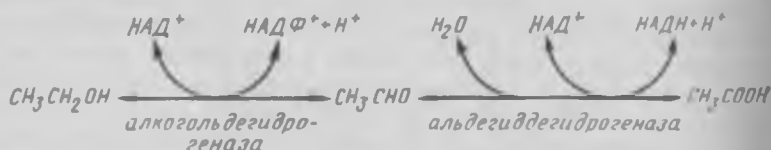
Процесс брожения с образованием лимонной кислоты протекает при низких значениях pH. Щавелевая кислота обычно накапливается в тот период, когда pH среды ближе к нейтраль-

ному значению. Это имеет несомненные технологические преимущества, так как в кислой среде (рН 3—4) весьма пезначительна активность ферментов, которые могут синтезировать нежелательные побочные продукты, и подавляется посторонняя бактериальная микрофлора.

Условием биосинтеза лимонной кислоты из сахаров грибами вида *Aspergillus niger* является лимитирование их роста микроэлементами (ионами железа) или фосфором. Процесс биосинтеза двухфазный, и интенсивный синтез лимонной кислоты начинается после перехода культуры в стационарную фазу. Выход продукта в ферментационном процессе достигает 85%.

В последние годы разработаны технологические приемы получения лимонной кислоты при культивировании дрожжей *Candida* и микромицетов на *n*-алканах. При этом биохимический механизм синтеза кислоты сохраняется прежним. Наибольшая активность цитратсинтетазы обнаружена у *Candida lipolytica* по сравнению с другими ферментами ЦТК. Сверхсинтез лимонной кислоты в процессе на *n*-алканах происходит при дефиците азота в среде. В культуре *Candida lipolytica* одновременно с лимонной кислотой происходит накопление изолимонной.

**Уксусная кислота.** Микробиологический синтез уксусной кислоты предусматривает непосредственное окисление этанола культурами рода *Acetobacter* и другими бактериями. Образование уксусной кислоты происходит по схеме



Для непрерывного культивирования *Acetobacter aceti* используют питательные среды, содержащие 6—12% этанола, 1% бактериального гидролизата, 0,05%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  и 0,05%  $\text{MgSO}_4$ . При увеличении концентрации спирта от 2 до 8% концентрация биомассы снижается от 0,7 до 0,3 г/л. Максимальная удельная активность непрерывной культуры *A. aceti* (количество микрограммов субстрата, подвергнувшегося окислению 1 мг биомассы за 1 мин) достигается к 20 сут культивирования при концентрации спирта, равной 7%, и составляет 3,0 ед/мг. При 2%-ной концентрации спирта удельная активность культуры составляет 2,4 ед/мг.

Таким образом, в клетках уксуснокислых бактерий *A. aceti*, находящихся длительное время в контакте с субстратом (спиртом) повышенной концентрации, происходит активация дегид-

рогеназных систем. 4—7% этилового спирта вызывают замедление размножения бактерий, однако одновременно с этим интенсифицируется интенсивный биосинтез ферментов дегидрогеназного комплекса. Повышение активности микробных ферментов под действием высоких концентраций спирта открывает новые возможности для интенсификации производственного процесса получения уксусной кислоты.

**Л-яблочная кислота.** Химическим путем (гидролизом ангидрида янтарной кислоты) получают только рацемическую смесь изомеров яблочной кислоты. L-Изомер, который получают микробиологическим способом, пока слишком дорог для промышленного производства.

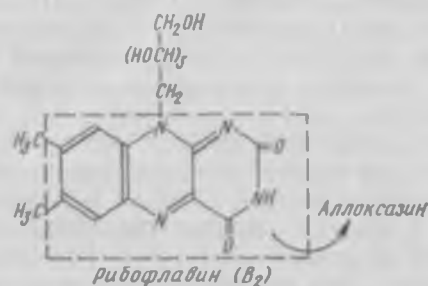
В то же время L-яблочную кислоту можно получать ферментативным путем из фумаровой кислоты (по аналогии с получением L-аспарагиновой кислоты). Только в данном случае ферментом служит фумараза (фумаратгидратаза), продуцентами которой являются бактерии *Brevibacterium ammoniagenes* и *Pseudomonas species*. Этот фермент катализирует присоединение молекулы воды к двойной связи кислоты. При этом используют нативные клетки продуцентов (время полунинактивации фумаразы  $\tau_{1/2}$  6 сут), клетки, иммобилизованные в полиакриламидный гель ( $\tau_{1/2}$ —55 сут) и на каррагинане ( $\tau_{1/2}$  около 160 сут). В последнем случае продуктивность возрастает.

## § 2.6. Микробиологический синтез витаминов

К витаминам относят большую группу низкомолекулярных органических соединений различной химической природы, присутствующих в организмах в незначительных количествах и являющихся компонентами ферментных систем, катализирующих соответствующие реакции. Способность к биосинтезу витаминов широко распространена среди микроорганизмов. В СССР созданы производства кормовых препаратов: витамина  $B_2$  с использованием активных продуцентов гриба *Eremothecium ashbyii* и рекомбинантных бацилл; медицинского и кормового препаратов витамина  $B_{12}$  на основе культивирования пропионовокислых и метановых бактерий;  $\beta$ -каротина, продуцируемого грибом *Blakeslea trispora* или каротиногенными дрожжами. Предложены полупромышленные способы получения дрожжей с повышенным содержанием эргостерина.

**Рибофлавин.** Цикл исследований по генетике и генетической инженерии бацилл привел к созданию нового биотехнологического процесса получения рибофлавина. Этот цикл включает: 1) направленный поиск специфических аналогов рибофлавина на базе центрального фрагмента  $B_2$ —аллоксазина; 2) конструирование базового штамма *Bacillus subtilis* — продуцента рибофлавина для

последующей амплификации (увеличение числа) оперонов, контролирующих синтез витаминов  $B_2$ ; 3) получение векторных молекул ДНК, способных стабильно размножаться в клетках бактерий; 4) определение локализации структурных генов и промоторов рибофлавинового оперона; 5) создание биотехнологического процесса на основе генетически модифицированного штамма.



Сочетанием методов селекции с аналогами (наиболее сильным антиметаболитом оказался розеофлавин — аналог  $B_2$  при замещении одной метильной группы на диметиламиногруппу) и клонирования генов рибофлавинного оперона на одной из плазмид был создан штамм — продуцент рибофлавина, способный производить почти втрое большее количество рибофлавина, чем традиционный грибной продуцент, за 40 ч ферментации вместо 72—80 ч.

**Витамин  $B_{12}$ .** В отличие от широко распространенных гема и хлорофилла витамин  $B_{12}$  в природе образуется только микроорганизмами (бактериями и актиномицетами). Молекула  $B_{12}$  состоит из двух частей: порфириноподобной ( $Co^{2+}$ -содержащей) и нуклеотидной. Порфириноподобная структура является хромофорной и включает координационный комплекс иона  $Co^{2+}$  с лигандом — цианогруппой. Четыре из шести лигандных положений этого комплекса заняты четырьмя атомами азота тетрапирролподобной корриновой кольцевой системы. Нуклеотидное ядро состоит из пуринового основания, рибозы и остатка фосфорной кислоты. Основанием нуклеотида является 5,6-диметилбензимидазол. Наряду с  $B_{12}$  (или цианкобаламином) могут синтезироваться его аналоги: окси-, хлоро-, сульфатокобаламины.

Регуляция биосинтеза  $B_{12}$  у микроорганизмов-продуцентов практически мало изучена. Этот витамин полностью репрессирует синтез ключевых ферментов. Выделено 14 видов пропионовых бактерий при их развитии на среде с глюкозой, казеиновым гидролизатом, неорганическими солями, витаминами и хлоридом кобальта. Внесение в среду 5,6-диметилбензимидазола по

окончании первой ростовой фазы (5—6 сут) обеспечивает быстрый и эффективный (за 18—24 ч) биосинтез витамина; суммарный выход последнего составляет 5,6—8,7 мг/л. Выход  $B_{12}$  на среде с кукурузным экстрактом и глюкозой при регулировании pH около 7,0 может достичь 21—23 мг/л. Методом ступенчатой селекции мутагенизированных пропионовых кислотных бактерий выделен мутант *P. shermanii*, который способен продуцировать до 30 мг/л  $B_{12}$ , т. е. на 230% больше, чем исходный штамм. Наиболее высокий выход — 58 мг/л — достигнут в автоматизированном режиме pH-стата при высокоаэробных условиях.

В больших количествах витамин  $B_{12}$  может быть получен биосинтезом с использованием микроорганизмов рода *Pseudomonas*. Согласно опубликованным данным, в результате селекции мутантных штаммов *Ps. denitrificans* и подбора питательных сред (меласса и сухие дрожжи) выход  $B_{12}$  за 90 ч выращивания при 29°C, интенсивном перемешивании и аэрации составил 59 мг/л (аэрация способствовала образованию индуктора 5,6-диметилбензимидазола).

Существующие промышленные способы получения витамина  $B_{12}$  основаны на его микробиологическом синтезе с применением *Ps. denitrificans* (США) и *Propionibacterium shermanii* (СССР). Резервы кобаламинпродуцирующей активности этих групп микроорганизмов далеко не исчерпаны. В решении проблемы получения промышленных витаминов можно отметить следующие направления:

- 1) получение витаминов и коферментов с использованием сверхпродуцентов и специальных режимов культивирования;
- 2) получение витаминов и коферментов из биомасс микроорганизмов, которые выращивают в промышленных масштабах (хлебопекарные дрожжи, кормовые гидролизные дрожжи, белково-витаминные концентраты);
- 3) применение микроорганизмов для отдельных стадий процесса синтеза витаминов.

## § 2.7. Получение экстрацеллюлярных полисахаридов

В этом параграфе мы рассмотрим трансформацию углеводов и полисахариды под действием микробных ферментов. Полисахариды микробного происхождения, например декстран, не имеют существенного значения для роста и могут рассматриваться как вторичные метаболиты. Так как декстран образуется в ре-

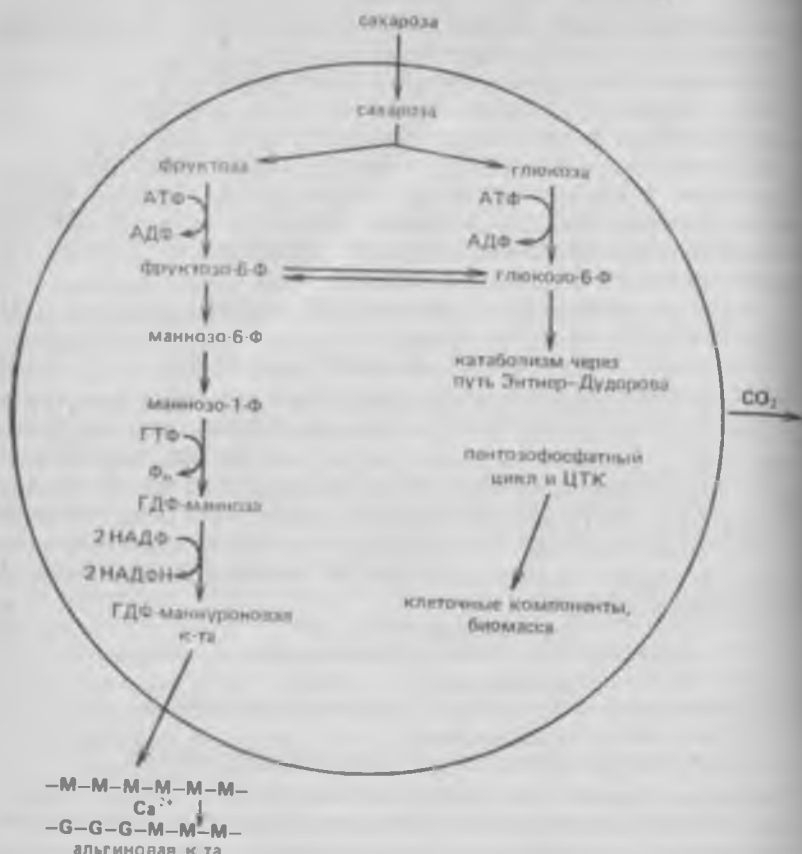
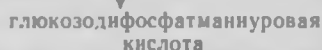


Рис. 2.17. Схема синтеза альгиновой кислоты у *A. vinelandii*:

ГДФ — гуанидиндифосфат; ГТФ — гуанидинтрифосфат;  $\Phi_n$  — неорганический фосфат

инвертазой; мономерные единицы переводятся в глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат соответствующими киназами. Фруктозо-6-фосфат включается в биосинтетический путь в такой последовательности:



Накапливающаяся маниуроновая кислота полимеризуется в полиманиуриновую кислоту, которая может далее экскрецировать из клетки и перегруппировываться в некоторой своей части (остатки D-маниуриновой кислоты) в алгиновую кислоту (содержащую уже остатки L-гулюриновой кислоты) под действием фермента полиманиуриновая кислота-6-5-эпимеразы.



Только одно перечисление направлений промышленного использования ксантановой смолы, получаемой при культивировании микроорганизмов *Xanthomonas*, указывает на перспективное значение биосинтеза экстрацеллюлярных полисахаридов:

- концентрирование нефтяных разливов на поверхности морей и океанов;
- интенсификация нефтедобычи;
- отделка и окрашивание текстиля;
- осветление технических взвесей;
- применение в качестве связующего для взрывчатых веществ;
- производство кондитерских изделий (подсластители, сгустители и т. п.).

## § 2.8. Получение углеводного сырья путем биоконверсии растительных материалов

Развитие биотехнологии белковых веществ и метаболитов требует разработки принципиально новых технологических процессов биоконверсии растительного сырья. Речь идет о расширении сырьевых ресурсов для крупномасштабного получения аминокислот, антибиотиков, ферментов, органических кислот и других ценных продуктов.

Кислотный гидролиз растительного сырья с использованием в качестве катализатора серной кислоты составляет основу дрожжевого и ксилотно-дрожжевого производств в СССР. Выход сахаров достигает при этом 60%. Недостатками метода являются необходимость использования жестких по давлению, температуре и агрессивности среды условий для гидролиза сложной смеси полимеров растительной ткани (полисахариды, лигнин); образование продуктов распада, конденсации и окислительной полимеризации, снижающих выход целевого продукта и биологическую доброкачественность сахаров; трудность извлечения концентрированных растворов сахаров при высоком отношении водной фазы к древесной (гидро модуль); получение лигнина в концен-

трированном виде (исключается возможность его биологической переработки).

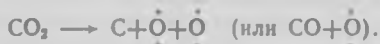
Ключевым звеном в любом гидролизном процессе является стадия гидролиза. Среди наиболее перспективных направлений ее осуществления можно выделить следующие: автогидролиз; комбинация автогидролиз — экстракция — взрыв; радиоллиз в присутствии  $\text{CO}_2$  и без него; предгидролиз в парах  $\text{SO}_2$ , щелочная делигнификация; гидролиз в парах  $\text{SO}_2$  или органических растворителей; пиролиз; прямой и непрямой ферментативный гидролиз. Одновременно интенсивно разрабатывают процессы «мягкого» предгидролиза лигноцеллюлозных материалов (с отделением гемицеллюлозной части древесины и выделением пентоз и пентозанов), ферментативной биоконверсии целлюлозы и лигнина. Рассмотрим некоторые из этих процессов.

Так, процесс, основанный на предгидролизе растительного сырья  $\text{CO}_2$ , включает диссоциацию  $\text{CO}_2$  в парах воды при  $200^\circ\text{C}$  на активные ионы



которые способствуют разрыву глюкозидных связей целлюлозы. Происходит интенсивный распад гемицеллюлозы и деполимеризация целлюлозы, сопровождающиеся отделением сильно окисленного лигнина. Культивирование микроорганизмов, обладающих способностью к деструкции целлюлозы, на таком субстрате приводит к быстрому накоплению биомассы и высокоэффективной деградации целлюлозы в глюкозу (до 80%). Этот процесс может быть использован для фракционирования древесного сырья на следующие компоненты: жидкую часть, почти полностью состоящую из ксилозы с примесями арабинозы, маннозы, галактозы и глюкозы, и волокнистую, представленную  $\alpha$ -целлюлозой и лигнином.

При совмещении радиоллиза с предгидролизом древесины диоксидом углерода целлюлоза распадается на целобнозу и глюкозу. Такой эффект объясняют действием образующегося при радиоллизе  $\text{CO}_2$  атомарного кислорода:



Очень близким к промышленной реализации в СССР считают проект парового взрыва, который может быть осуществлен в три стадии: 1) автогидролиз (термоллиз); 2) взрыв — дефибриляция целлюлозы; 3) экстракция растворимой части продуктов с получением нерастворимого остатка целлюлозы. Лигнин получают в виде раствора в водном спирте или в щелочи. Получаемые субстраты высокочувствительны к ферментативному разложению. По техническим параметрам процесс близок к высокотемпера-

турному гидролизу. Это еще раз подтверждает, что выбор условий ведения новых процессов гидролиза (или предгидролиза) сосредоточен на экстремальных режимах, требующих нового оборудования.

Ферментативное расщепление компонентов древесины в природе требует участия ассоциаций микроорганизмов и протекает медленно. Лимитирующие факторы процесса: кристаллическая структура биополимеров; компактность их структуры, ограничивающая поверхность, которая атакуется ферментами; наличие лигнина; высокая молекулярная масса полисахаридов. В природе встречаются микроорганизмы, которые обладают всеми основными ферментативными системами расщепления и утилизации полимеров растительной ткани. Среди них особое место занимают базидиомицеты *Sporotrichium pulverulentum*. В цикл деструкции и утилизации целлюлозы и лигнина вовлекаются более десяти ферментов. Среди промежуточных продуктов распада можно назвать целлобиозу, глюкозу, целлобионовую кислоту, фенольные соединения,  $H_2O_2$ .

Достаточно подробно изучены целлюлазные комплексы других микроорганизмов, в первую очередь микромицетов рода *Trichoderma*. Так, целлюлазный комплекс *Tr. reesei* состоит из следующих ферментов: 1,4-β-D-глюканцеллобиогидролазы, которая отщепляет целлобиозные единицы с невосстановленного конца целлюлозы; эндо-1,4-β-D-глюканазы, расщепляющей внутренние связи в целлюлозных цепях; 1,4-β-D-глюкозидазы, отщепляющей глюкозные остатки от невосстановленного конца целлоолигосахаридов. Комплекс ферментов действует согласованно, катализируя образование олигосахаридов, целлобиозы и глюкозы, а конечным продуктом распада является глюкоза. Первичная атака целлюлозы осуществляется по аморфным зонам цепей, а затем по мере разрыхления кристаллической структуры волокон ферменты диффундируют в эти участки. В связи с этим индекс кристалличности целлюлозосодержащего материала определяет скорость ферментативного гидролиза целлюлозы. Не случайны поэтому поиски методов предгидролиза, дающего высокий выход аморфной целлюлозы. В этом случае степень деструкции гемицеллюлозы и целлюлозы препаратами *Tr. reesei* и *Asp. niger* составляет 80—95%.

При решении проблемы ферментативного гидролиза компонентов древесины не менее важен вопрос о стоимости ферментных препаратов. Основные пути снижения их стоимости — селекция штаммов-суперпродуцентов или конструирование таких штаммов методами генетической инженерии.

В качестве доноров генов целлюлаз используют бактерии рода *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Clostridium* и грибов рода *Trichoderma* (*Tr. viride*, *Tr. reesei*); в качестве реципиента — бакте-

рии *E. coli* и дрожжи *S. cerevisiae*. С применением вектора может быть достигнута продуктивность штаммов по ферментам целлюлазного комплекса, составляющая 15—25% от биомассы трансформированных микроорганизмов, или удельная активность по субстрату, составляющая не менее 50% от таковой для лучших традиционных грибных продуцентов целлюлаз. Учитывая более высокие скорости роста генетически модифицированных бактерий и дрожжей по сравнению с грибами нетрудно представить эффект разработок по конструированию продуцентов с набором целлюлазных генов. Он может привести к созданию совершенно новых, менее энергоемких процессов гидролиза растительного сырья и получению в дальнейшем новых белковых и биологически активных препаратов.

Комплексная переработка растительного сырья имеет исключительное значение для биотехнологии и в экономическом плане, так как создает условия для ее совмещения с технологическими производствами и создания единых химико-биотехнических комплексов. Примерами таких комплексов могут быть производство кормовых дрожжей и параллельно новых типов полимеров на основе производных фурфурола, получение сырья для химической промышленности методами ферментации и микробиологической конверсии (этанол, уксусная кислота), производство этилена, этилацетата и этиленгликоля, других мономеров для пластмасс и синтетических каучуков и т. п. При этом основные технологические этапы переработки растительного сырья будут осуществляться с помощью ферментации путем использования для этих целей большого набора микроорганизмов. Например *S. cerevisiae* и *Z. mobilis* на глюкозе (этанол), *Clostridium thermocellum* на глюкозе (этанол, уксусная кислота), *Kluyveromyces lactis* на ксилозе (этанол), *Cl. acetobutylicum* на глюкозе, ксилозе, арабинозе (изопропанол, ацетон, бутанол), *Aspergillus niger* на глюкозе (лимонная кислота), *Bacillus polymyxa* на глюкозе (2,3-бутандиол), *Brevibacterium flavum* на глюкозе и ксилозе (лизин и другие аминокислоты) и т. д.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Можно ли выделить специфические семейства аминокислот в общей схеме их биосинтеза?
2. Какие пути в биосинтезе лизина должны быть блокированы, чтобы получить ауксотроф — сверхпродуцент лизина?
3. Чем объясняется стимулирующая роль гомосерина при добавлении его в культуру сверхпродуцента лизина?
4. Можно ли рассматривать превращение экзогенно введенного прекурсора лизина в растущей микробной культуре как его биотрансформацию?
5. Какие реакции лежат в основе ферментативной конверсии субстратов в аминокислоты?
6. Что общего имеется в химико-энзиматических синтезах лизина, аспарагиновой кислоты, триптофана, фенилаланина и цистеина?

7. На каком принципе основано разделение рацемических смесей производимых аминокислот?
8. Чем вызвана двухфазность процесса образования антибиотиков?
9. Имеется ли субстратная специфичность штамма-продуцента антибиотических веществ?
10. Будут ли добавки лизина уменьшать биосинтетическую активность штамма-продуцента бензилпенициллина?
11. Можно ли смещать по координате «время» границу между ростовой фазой и биосинтетической фазой в процессе получения антибиотика?
12. Какие реакции с участием 6-аминопенициллановой кислоты приводят к образованию синтетических антибиотиков?
13. При каких физико-химических параметрах среды реализуется гидролитическая и синтетическая роль пенициллинацилазы?
14. Что имеется в виду под фенотипической оптимизацией синтеза ферментов как целевых продуктов? Можете ли вы привести другие примеры такой оптимизации?
15. Какие воздействия генетического характера могут привести к сверхпродуцированию ферментов как целевых продуктов?
16. Какова ключевая стадия биосинтеза лимонной кислоты на базе функционирования ЦТК?
17. Как может влиять концентрация этанола на культивирование бактерий — продуцентов уксусной кислоты?
18. К какому типу относится ферментативная реакция образования яблочной кислоты из фумаровой кислоты?
19. Какие виды микроорганизмов используют для получения витаминов B<sub>4</sub>, B<sub>12</sub>?
20. Различаются ли структура и пути биосинтеза гомополисахаридов от таковых для гетерополисахаридов?
21. В чем особенности химического и ферментативного расщепления компонентов растительного сырья? Какие стадии включает схема гидролиза целлюлозы под действием мультиферментного комплекса?

### Глава 3. УТИЛИЗАЦИЯ СУБСТРАТОВ КЛЕТКАМИ КАК ОСНОВА УПРАВЛЕНИЯ ПРОЦЕССАМИ БИОСИНТЕЗА

В этой главе будут рассмотрены пути утилизации наиболее важных субстратов, используемых при крупнотоннажном биотехнологическом получении белка одноклеточных, что позволит регулировать полноту процесса и совершенствовать его технико-экономические показатели. Имеющиеся в стране ресурсы *n*-алканов не смогут обеспечить необходимый объем производства кормовых препаратов. Перспективными видами сырья могут быть метиловый и этиловый спирты, природный газ и водород.

#### § 3.1. Метаболизм *n*-алканов

Значение углеводов как субстратов связано еще с возможностью экономичного использования продуцируемых микроорганизмами метаболитов, растущих на высших *n*-алканах: ферментов, углеводов, нуклеиновых кислот, липидов, аминокислот, органических кислот, витаминов, коферментов, антибиотиков.

С биохимической точки зрения эти метаболиты делят на три группы. Первая группа включает продукты, не отличающиеся от продуктов микробиологического синтеза, получаемых на углеводах (табл. 3.1). Промышленное значение имеют лизин и глутаминовая кислота.

Алкановые субстраты составляют гидрофобное окружение клеток, которое предпочтительно для продуцирования водонерастворимых веществ. Они составляют вторую группу, синтезируются как в углеводных, так и в углеводородных средах, однако их продуцирование заметно усиливается при ассимиляции алканов. Наконец, третья группа включает метаболиты, которые имеют строение, жестко связанное со структурой алкановых субстратов; образуются только в углеводородной среде.

Для роста микроорганизмов обычно не используются низшие гомологи парафиновых углеводородов, которые являются жидкостями при 20 °С (от *n*-пентана до *n*-октана). Это связано с их способностью растворять клеточные мембраны или мембраносвязанные белки, особенно те, от которых зависит транспорт и окисление парафиновых субстратов. В связи с этим применение ал-

### 3.1. Продукты биосинтеза, общие для углеводных и *n*-алкановых субстратов

| Наименование                                                            | Продукты биосинтеза                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                         | <b>Первая группа</b>                                                                                                                                      |
| Аминокислоты                                                            | Глутаминовая, лизин, <i>N</i> -ацетиллизин, треонин, валин, гомосерин, фенилаланин, тирозин и т. п.                                                       |
| Органические кислоты                                                    | $\alpha$ -Кетоглутаровая, лимонная, фумаровая, малоновая, янтарная, глицериновая и др.                                                                    |
| Углеводы                                                                | Трегалоза, арабитол, эритритол, маннитол, полисахариды и т. п.                                                                                            |
| Нуклеиновые кислоты, нуклеотиды, нуклеозиды                             | Аденозинмонофосфат, цАМФ, инозин, ДНК, РНК и др.                                                                                                          |
| Витамины и коферменты                                                   | Витамины В <sub>6</sub> , пиридоксаль-5'-фосфат, витамин В <sub>12</sub> и пр.                                                                            |
| Антибиотики                                                             | Пиоцианин, цефалоспорины, бревинцины и т. п.                                                                                                              |
| Ферменты                                                                | Липазы, протеазы, оксидазы D-аминокислот и др.                                                                                                            |
|                                                                         | <b>Вторая группа</b>                                                                                                                                      |
| Продукты, связанные с метаболическими особенностями ассимиляции алканов | Трегалозолипиды, рамнолипиды, липопротены, липополисахариды; рибофлавин, кофермент А, эргостерол, каротиноиды; каталаза, глицерофосфатдегидрогеназа и пр. |
|                                                                         | <b>Третья группа</b>                                                                                                                                      |
| Метиллимонная кислота                                                   | Метиллизонимонная кислота и т. п.                                                                                                                         |
| Жирные кислоты, жирные моноалкены и т. п.                               | $\omega$ -Аминокислоты, жирные спирты, алкандегидрогеназы                                                                                                 |

### 3.2. Распределение *n*-алканов по фракциям (% по массе)

| <i>n</i> -Алкан | Типичный «керосиновый» ряд | Типичный ряд нефтяных дистиллятов | Фракция из восковых (парафиновых) «погонов» нефти |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------|
| C <sub>10</sub> | 6                          | —                                 | Следы                                             |
| C <sub>11</sub> | 39                         | Следы                             | »                                                 |
| C <sub>12</sub> | 42                         | »                                 | 1                                                 |
| C <sub>13</sub> | 13                         | 4                                 | 2                                                 |
| C <sub>14</sub> | Следы                      | 28                                | 3                                                 |
| C <sub>15</sub> | —                          | 29                                | 5                                                 |
| C <sub>16</sub> | —                          | 22                                | 8                                                 |
| C <sub>17</sub> | —                          | 12                                | 14                                                |
| C <sub>18</sub> | —                          | 4                                 | 21                                                |
| C <sub>19</sub> | —                          | 1                                 | 19                                                |
| C <sub>20</sub> | —                          | —                                 | 13                                                |
| C <sub>21</sub> | —                          | —                                 | 9                                                 |
| C <sub>22</sub> | —                          | —                                 | 4                                                 |
| C <sub>23</sub> | —                          | —                                 | Следы                                             |

канов ограничивают диапазоном углеводородов (C<sub>9</sub>—C<sub>18</sub>). Чистые жидкие *n*-алканы не производят в промышленном масштабе, но их смеси присутствуют в больших количествах в нефтяных дистиллятах, которые содержат 10—30% парафинов C<sub>14</sub>—C<sub>18</sub> (табл. 3.2), во фракциях *n*-алканов, экстрагированных из керосина (C<sub>10</sub>—C<sub>13</sub>), или в восковых остатках перегонки нефти (C<sub>14</sub>—C<sub>22</sub>).

Наилучшие результаты по получению биомассы дрожжей показали высокоочищенные жидкие парафины C<sub>14</sub>—C<sub>16</sub> (из фракции нефтяных дистиллятов) и C<sub>11</sub>—C<sub>13</sub> (из фракции керосина). Биотехнологический процесс в этом случае характеризуется почти 100%-ной конверсией по сырью, минимальным уровнем остаточных углеводородов.

**Потребление и транспорт *n*-алканов.** При утилизации углеводородов дрожжами характерны следующие особенности.

1. Алифатические соединения ассимилируются штаммами дрожжей многих родов намного быстрее, чем ароматические соединения. С другой стороны, ароматические соединения, обычно присутствующие как примеси в углеводородном сырье, токсичны для алканутилизующих дрожжей, поэтому сырье должно подвергаться очистке от ароматических соединений.

2. Дрожжи деградируют длинные цепи углеводорода преимущественно в короткие цепи, хотя при этом проявляют определенную субстратную специфичность в отношении к длине цепи.

3. Многие дрожжи способны утилизировать 1-алкены как источник углерода, но выход биомассы при этом обычно много меньше, чем выход биомассы при использовании соответствующего *n*-алкана.

4. Углеводороды изостроение деградируются дрожжами лишь тогда, когда имеют линейную цепь достаточной длины.

Ассимиляция алканов эукариотическими микроорганизмами проходит ряд стадий: 1) поглощение алканов клеткой; 2) окисление алканов в соответствующие жирные кислоты; 3) активация жирных кислот в форму их КоА-эфиров; 4) последовательный метаболизм ацил-КоА — деградация в ацетил-КоА (синтез клеточной массы) или включение части ацил-КоА в клеточные липиды (биосинтез липидов); 5) использование ацетил-КоА в ЦТК через глиоксилатный шунт; 6) синтез  $C_6$ -углеродных соединений из шавелевоуксусной кислоты (глюкогенез); 7) биосинтез компонентов клеточных структур, включая клеточные аминокислоты, жирные кислоты и т. д.

Заметим, что первые две стадии — наиболее специфичные в микробной утилизации алканов. Третья, четвертая и пятая стадии — общие для метаболизма жирных кислот, а шестая стадия — общая для таких предшественников углеводов, как этанол и уксусная кислота. Седьмая стадия является универсальной для разнообразных источников углерода.

Итак, первая ступень ассимиляции *n*-алканов микроорганизмами — поглощение экзогенных *n*-алканов клетками и далее — транспорт в крупные мембраны и органеллы, где *n*-алканы начинают окисляться. Поскольку *n*-алканы, как правило, малорастворимы в воде, то средства, используемые для интенсификации транспорта молекул этих субстратов в клетку, представляют практическое значение в ростовых процессах, основанных на углеводородах.

В механизме образования эмульсий водонерастворимых *n*-алканов выделяют образование макроэмульсий, которые создаются вследствие механического перемешивания частиц, и микроэмульсий, которые образуются, вероятнее всего, с участием метаболитов, продуцируемых микроорганизмами. Макроэмульсия содержит капли размером 1—100 мкм; микроэмульсия состоит из высокодисперсных частиц диаметром 0,01—0,5 мкм и создается на поверхности раздела жидкость — жидкость в присутствии природных эмульсифицирующих агентов.

Способность *n*-алканутилизующих клеток продуцировать эмульсифицирующие поверхностно-активные вещества в клеточной стенке и крупных мембранах — одна из определяющих характеристик ассимиляции углеводородов. Установлено, что липополисахариды, выделенные из клеточных стенок *n*-алканутилизующих микроорганизмов, играют важную роль в процессе поступления углеводородов. Идентифицирован маннан, содержащий около 4% ковалентносвязанных жирных кислот.

Микроскопические исследования показали, что контакт между клетками и углеводородными каплями является необходимым

предварительным условием для роста; клетки обрамлены каплями углеводов. Утолщенные клеточные стенки имеют выросты и пронизаны хорошо развитой сетью каналов в периплазматическое пространство. Именно с этими образованиями связывают транспорт *n*-алканов в клетку. Первоначально углеводороды сорбируются в наружном полисахаридном слое клеточной стенки и растворяются в липидах. Активному поглощению способствует также протекание метаболических реакций, которые сдвигают сорбционное равновесие и создают сорбционный потенциал, обеспечивающий непрерывность поступления *n*-алканов в клетки. Метаболиты — поверхностно-активные вещества — облегчают солюбилизацию молекул алканов (гидрофобное взаимодействие с белками или липидами) и помогают их прохождению через клеточную мембрану в мембраны клеточных органелл для окончательного окисления.

**Начальное окисление молекул *n*-алканов.** Может протекать по трем направлениям: 1) окисление *n*-алканов монооксигеназой (или оксидазой смешанной функции); 2) гидропероксидация *n*-алканов; 3) дегидрирование *n*-алканов в соответствующие алкены.

Наиболее хорошо известная монооксигеназная система со смешанной функцией окисления — без участия цитохрома Р450 — была найдена в бесклеточных экстрактах бактерий *Pseudomonas oleovorans*. Она содержала рубредоксин, НАДН-рубредоксинредуктазу и алкан-1-гидролазу (рис. 3.1). Линейные алканы, имеющие близкую к планарной конфигурацию, легко включаются в активный центр алкан-1-гидролазы.

Дрожжи *Candida tropicalis* содержат другую систему окисления со смешанной функцией, содержащую цитохром Р450, НАДФН-цитохром Р450-редуктазу и фосфолипидную фракцию (рис. 3.2). Образование Р450 в *C. tropicalis* индуцируется длинноцепными алканами, вторичными спиртами и кетонами. Концентрация цитохрома Р450 увеличивается пропорционально с изменением удельной скорости расхода *n*-гексадекана, особенно

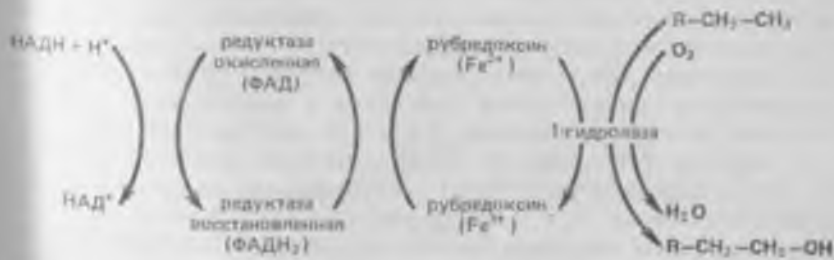


Рис. 3.1. Схема окисления *n*-алкана без участия цитохрома Р450

когда клетки культивируются в режиме лимита по кислороду. Следовательно, и цитохром P450 (вместе с редуктазой) включается в стадию утилизации *n*-алкана (его окисление).

Следующий гипотетический механизм микробного окисления *n*-алканов включает образование алкилгидроперекисей из свободных радикалов и их восстановление в первичные и вторичные спирты (рис. 3.3). Неясно, однако, какие реакции приводят к образованию свободных радикалов; кроме того, отсутствуют прямые доказательства образования гидропероксидов алканов.

Наконец, обнаружена система дегидрирования алканов в алкены в дрожжах *S. rugosa* и бактериях *Pseudomonas aeruginosa* по наличию 1-алкенов в реакционных смесях *n*-алканов, по ингибированию основного фермента — НАД<sup>+</sup>-зависимой дегидрогеназы меркаптоэтанолом. Предложена разветвленная цепь превращения алкенов (рис. 3.4) через их эпоксицирование и гидратацию. Однако и этот механизм не получил еще надежных биохимических доказательств.

Дрожжи окисляют углеводороды с помощью индуцибельных ферментов. Это подтверждается опытами по включению меченого C<sup>14</sup> в биомассу дрожжей, инкубируемых на 1-C<sup>14</sup>-октадекане. Протопласты дрожжей способны окислять индивидуальные парафины с интенсивностью, равной интенсивности окисления их целыми клетками. Этот факт указывает на то, что ферментная система, ответственная за окисление *n*-алканов, находится в эндоплазматическом ретикулуле. Замечено также, что при утилизации дрожжевыми клетками *n*-алканов более чем в 2 раза больше потребляется кислорода и выделяется теплоты, чем в условиях потребления глюкозы.

Можно заключить, что из всех рассмотренных систем первичного окисления *n*-алканов наиболее предпочтительной является система окисления (поскольку функционирует в аэробных условиях), включающая либо цитохром P450, либо рубредоксин.

**Метаболические пути окисления.** Существует два основных пути: 1) окисление концевых метильных групп (терминальное); 2) окисление β-метиленовых групп (субтерминальное). В наиболее часто встречающемся первом случае окисляются одна или одновременно обе концевые метильные группы (моно- и дитерминальное окисление). Вышие первичные спирты, образовавшиеся из алканов при терминальном окислении в микросомах, окисляются далее в жирные кислоты через соответствующие альдегиды. Эти реакции катализируют НАД-зависимые алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы, специфичные к длинноцепным субстратам (табл. 3.3). Оба фермента индуцируются алканами, длинноцепными спиртами и альдегидами. Вторичные жирные спирты, образовавшиеся при субтерминальном окислении исходного *n*-алкана, трансформируются в кетоны, которые, отщепляя

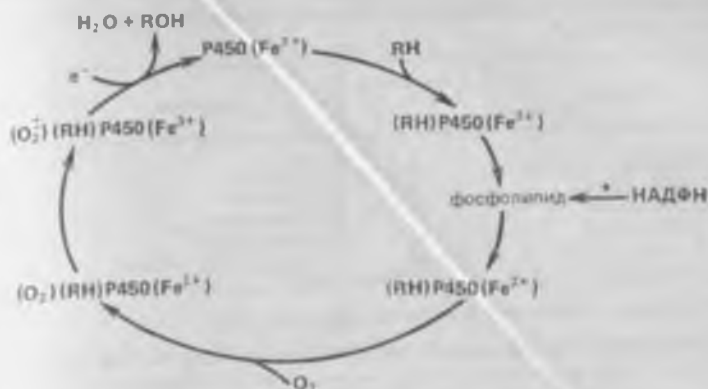


Рис. 3.2. Схема окисления алкана с участием цитохрома Р450



Рис. 3.3. Схема образования гидроперекисей с участием свободнорадикальных промежуточных продуктов

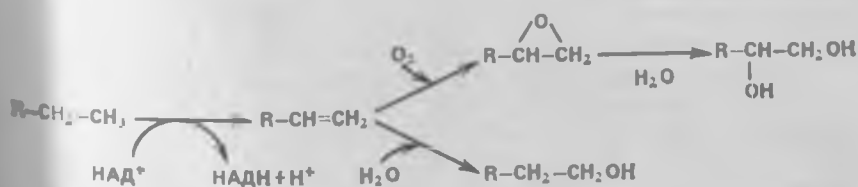


Рис. 3.4. Схема метаболизма *n*-алканов, включающая стадии дегидрирования

### 3.3. Субстратная специфичность растворимой алкогольдегидрогеназы из *C. tropicalis*<sup>1</sup>

| Субстрат   | Относительная активность, % | Субстрат       | Относительная активность, % |
|------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|
| Этанол     | 0                           | 1-Нонанол      | 75                          |
| n-Пропанол | 0                           | 1-Деканол      | 100                         |
| n-Бутанол  | 3                           | 1-Ундеканол    | 85                          |
| 1-Гексанол | 25                          | 1-Додеканол    | 120                         |
| 1-Гептанол | 40                          | 1-Тридеканол   | 90                          |
| 1-Октанол  | 70                          | 1-Тетрадеканол | 90                          |

<sup>1</sup> Активность в отношении 1-деканала принята за 100%.

### 3.4. Субстратная специфичность ацил-КоА-оксидазы из *C. tropicalis*<sup>1</sup>

| Субстрат      | Относительная активность, % | Субстрат       | Относительная активность, % |
|---------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|
| Бутирил-КоА   | 4                           | Муристоил-КоА  | 50                          |
| Гексаноил-КоА | 2                           | Пальмитоил-КоА | 37                          |
| Октаноил-КоА  | 16                          | Стеароил-КоА   | 17                          |
| Деканоил-КоА  | 97                          | Олеинил-КоА    | 64                          |
| Лауроил-КоА   | 100                         | Орахидоил-КоА  | 7                           |

<sup>1</sup> Активность в отношении лауроил КоА принята за 100%.

одну молекулу уксусной кислоты, превращаются в первичные жирные спирты, содержащие на два углеродных атома меньше. Замечено, что в дрожжевых клетках, культивируемых на *n*-алканах, появляются специфические органеллы-пероксисомы, в которых локализованы алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы. Развитие пероксисом коррелирует с возрастанием каталазной активности и скорости ассимиляции алканов или жирных кислот, что указывает на участие этих органелл и каталазы в метаболизме алкана или жирной кислоты.

Для дальнейшего метаболизма жирные кислоты должны быть активированы в соответствующие КоА-эфиры. Обнаружено в олеатутилизирующих *C. lipolytica* присутствие двух ацил-КоА-синтетаз (I и II), различающихся субклеточной локализацией (I — в микросомах и митохондриях, II — в пероксисомах), контролируемые механизмами и метаболическими функциями. Выделен мутант *C. lipolytica*, который не растет на глюкозе в присутствии церуленина, антилипогенного антибиотика, даже когда в среду добавлены жирные кислоты. Очевидно, это связано с дефицитом ацил-КоА-синтетазы-I, катализирующей включение экзогенных жирных кислот в клеточные липиды (без деградации или при удлинении цепи ацил-КоА за счет ацетил-КоА). Синтетаза I является конститутивным ферментом и не зависит от фосфатидилхолина; синтетаза II индуцируется олеиновой кислотой.



Рис. 3.5. Путь включения жирных кислот в липиды у *C. lipolytica*

зависит от фосфатидилхолина и имеет более широкую субстратную специфичность, чем синтетаза I. Все это указывает на то, что именно синтетаза II ответственна за накопление ацил-КоА, который путем  $\beta$ -окислительной трансформации отщепляет ацетил-КоА (рис. 3.5).

Пероксисомы, выделенные из алканрастущих дрожжей *Candida lipolytica*, показывают пальмитат-КоА- и АТФ-зависимую активность в отношении восстановления НАД, образования ацетил-КоА и поглощения  $O_2$ . Система  $\beta$ -окислительной трансформации, локализованная исключительно в пероксисомах, включает ферменты окисления ацил-КоА в еноил-КоА (ФАД-содержащий фермент) и сопряженного с ним потребления  $O_2$  и образования  $H_2O_2$  (рис. 3.6).

Из табл. 3.4 видно, что наиболее эффективным субстратом для такого окисления является лаурил-КоА.

Большая доля жирных кислот деградирует путем  $\beta$ -окислительной трансформации в ацетил-КоА (из алканов с четным числом С-атомов углерода). Полагают, что в случае с дрожжами, растущими в среде, содержащей *n*-алканы, важную роль в биосинтезе компонентов клеточных структур играет глиоксилатный шунт ЦТК (см. рис. 2.16). В алканутилизующих дрожжах обнаружена более высокая активность ключевых ферментов глиоксилатного шунта — изоцитратлиазы и малатсинтетазы (по сравнению с «глюкозным» вариантом). Когда уровень активности изоцитратлиазы высок, уровень активности НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы оказывается более низким в алканрастущих *C. tropicalis* в сравнении с глюкозорастущими клетками. Это означает, что глиоксилатный шунт, регенерирующий ацетил-КоА во время окисления алканов, действительно является доминиру-

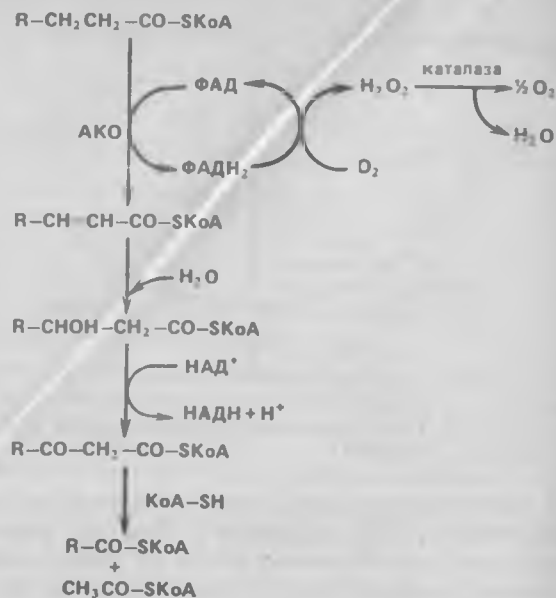


Рис. 3.6.  $\beta$ -Окислительная трансформация КоА-эфиров жирных кислот в пероксисомах дрожжей с участием АКО — ацил-КоА-оксидазы

ющим в метаболизме алканутилизирующих клеток (в сравнении с полным ЦТК). Благодаря функционированию шунта и вследствие активности пируватдегидрогеназного ферментного комплекса пировиноградная кислота и фосфоенолпируват в качестве интермедиатов не образуются (в отличие от «глюкозных» клеток дрожжей) и почти весь углерод субстрата при окислении *n*-алканов превращается в ацетил-КоА. Именно поэтому выход биомассы от субстрата для алканутилизирующих дрожжей составляет 0,98—1,02.

Субклеточное фракционирование алканрастущих дрожжей *S. tropicalis* показало, что из ферментов, относящихся к глиоксилатному циклу, только изоцитратлиаза и малатсинтетаза являются пероксисомальными ферментами. Цитратсинтетаза, акониттаза, малатдегидрогеназа, которые являются типичными для ЦТК, локализованы в митохондриях. Эти факты указывают, что пероксисомы должны кооперироваться с митохондриями в метаболизме алканов. Найдено, что в *S. tropicalis* и *S. lipolytica* ацетил-КоА, необходимый для синтеза лимонной кислоты, может «переноситься» из пероксисом в митохондрии с помощью карнитинацетилтрансферазы. Рис. 3.7 иллюстрирует выявленные функ-

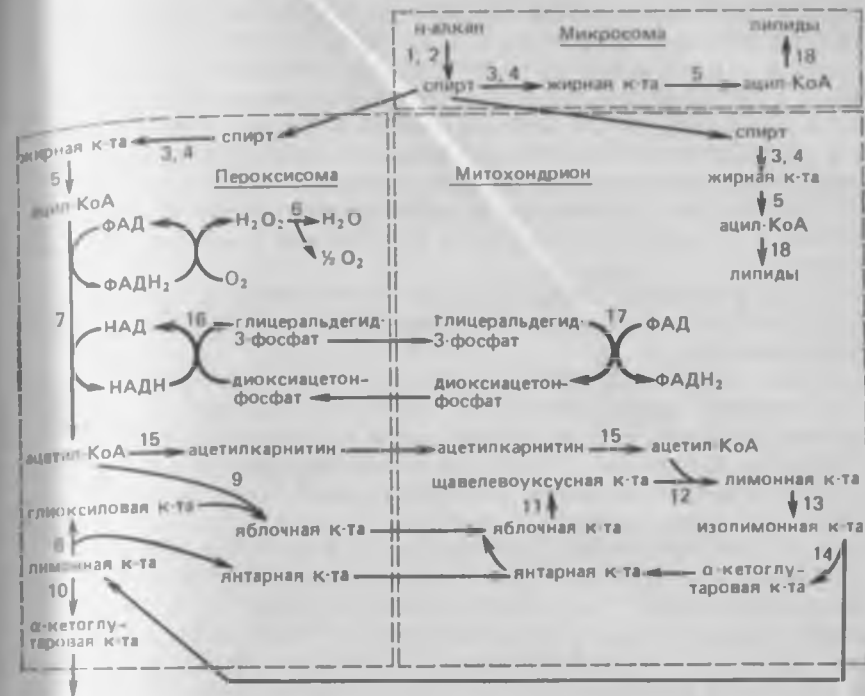


Рис. 3.7. Механизм ассимиляции *n*-алканов в микротельцах дрожжевых клеток: 1 — цитохром P450; 2 — НАДФН-цитохром-P450-редуктаза; 3 — алкогольдегидрогеназа; 4 — ацил-КоА-синтетаза; 5 — ацил-КоА-синтетаза; 6 — каталаза; 7 — система  $\beta$ -окислительной трансформации жирных кислот; 8 — изоцитратлиаза; 9 — малатсинтетаза; 10 — НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа; 11 — малатдегидрогеназа; 12 — цитратсинтетаза; 13 — акониттаза; 14 — НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа; 15 — карнитинацетилтрансфераза; 16 — НАДФ-зависимая глицеро-3-фосфатдегидрогеназа; 17 — ФАД-зависимая глицеро-3-фосфатдегидрогеназа; 18 — глицерофосфатацетилтрансфераза

ции микросом, митохондрий и пероксисом в дрожжах, утилизирующих *n*-алканы. На его основе можно легко понять метаболическое значение пероксисом дрожжей в ассимиляции алканов или жирных кислот.

Существует корреляция между видом микроорганизма и выбором им индивидуального пути начального окисления *n*-алканов. Для бактерий: из огромного числа бактерий, большей частью грамотрицательные палочки и кокки, *Actinomyces* и их производные используют монотерминальный путь, некоторые из

них продуцируют алкены. Смешанные культуры родов *Bacillus* и *Streptomyces* синтезируют продукты субтерминальным путем.

Для дрожжей: предпочитают использовать преимущественно монотерминальный путь окисления и лишь частично дитерминальный. Структура жирных кислот и число углеродных атомов совпадают с таковыми для исходного субстрата. В ряде случаев обнаруживаются продукты дитерминального окисления (*C. intermedia*, *C. maltosa*) и очень редко продукты субтерминального окисления, в позиции C-2 молекулы *n*-алкана (*C. rapa-silosis*).

Для грибов: используют субтерминальные промежуточные пути при окислении в позициях C-2, C-3, C-4, C-5, C-6 молекул *n*-алканов.

Таким образом, грибы окисляют метиленовые группы, тогда как дрожжи преимущественно атакуют концевые метильные группы. Найдено, что некоторые грибы синтезируют 1-алкены.

Можно заключить, что микроорганизмы, быстро окисляющие алканы, преимущественно действуют через терминальные пути, и что все микроорганизмы, которые окисляют *n*-алканы менее быстро, преимущественно используют субтерминальные пути.

**Состав питательных сред с *n*-алканами.** Разработка состава питательных сред для роста микроорганизмов и, в частности, алканутилизирующих дрожжей, является ключевой стадией, от которой зависит производственный результат. Компоненты питательных сред должны содержать все элементы, необходимые для образования клеточной массы (конструктивный обмен), а также способные доставить необходимую энергию для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов (энергетический обмен). Как известно, основными элементами питания, дефицит которых приводит к ограничению роста и изменению строения микробных клеток, являясь углерод, азот, сера, фосфор, магний и калий. Выбирая надлежащие ограничения питательными веществами, можно получить надежные средства контроля за развитием клетки: подавить определенную метаболическую деятельность и в то же время обеспечить протекание других метаболических процессов с повышенной скоростью. Так, при ограничении по источнику углерода лимитируется подвод углерода для биосинтеза энергии; лимитация по источнику азота приводит к ограничению биосинтеза белка; минимизация концентрации фосфата приводит к ограничению синтеза нуклеиновых кислот и т. д.

Первый шаг в «конструировании» питательных сред дает анализ состава соответствующих микробных клеток. Типичный элементарный состав микробной клетки включает (в % СВ): углерод — 50; азот — 7—12; фосфор — 1—3; сера 0,5—1,0; магний — 0,5. Так, если необходимо синтезировать биомассу с содержанием дрожжей 30 г/л при использовании сульфата аммония в качестве

источника азота и серы, то, исходя из состава клетки, необходимо внести в среду 12 г/л  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . При этом к клеткам будет подведено 2,5—2,7 г атомарного азота на 1 л среды, или примерно 90 мг на 1 г абсолютно сухих дрожжей.

Подобные расчеты дают возможность конструировать так называемые минимальные среды. В качестве примера приводим состав питательной среды для культивирования дрожжей до концентрации 30 г/л на избранных источниках углерода.

|                                           | Концентрация, г/л |
|-------------------------------------------|-------------------|
| Гексадекан                                | 30,0              |
| Метанол                                   | 60,0              |
| Этанол                                    | 40,0              |
| Глюкоза                                   | 60,0              |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | 12,0              |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                  | 1,3               |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1,5               |
| Микроэлементы                             | $10^{-4}$ Моль/л  |

Подбирая другие соотношения компонентов питательной среды, можно регулировать состав микробной клетки. Так, изменение удельного расхода источника азотного питания, даже в пределах возможных колебаний этого параметра в производственных условиях, приводит к изменению содержания белка в дрожжах, утилизирующих *n*-алканы. Как показывают результаты изучения зависимости содержания белковых и липидных компонентов биомассы от концентрации источника азотного питания в среде, снижение концентрации азотного питания со 100 до 75 мг/г абс. СВ приводит к снижению содержания в биомассе дрожжей *Candida* белка, а также нуклеиновых кислот (табл. 3.5). Уменьшение концентрации азота до 50 мг/г абс. СВ приводит к еще более замет-

### 3.5. Влияние концентраций источника азотного питания на биосинтез белка и липидов

| Штамм | Удельный расход источника азота, мг/г абс. СВ | Белок по методу Барнштейна, % абс. СВ | Нуклеиновые кислоты, % абс. СВ | Содержание общих липидов, % абс. СВ |
|-------|-----------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| 1     | 50                                            | 41,6                                  | 6,3                            | 17,8                                |
|       | 75                                            | 52,1                                  | 7,2                            | 14,1                                |
|       | 90                                            | 52,8                                  | 7,3                            | 9,1                                 |
|       | (контроль)                                    |                                       |                                |                                     |
|       | 100                                           | 52,5                                  | 7,5                            | 11,0                                |
| 2     | 50                                            | 42,0                                  | 6,2                            | 10,6                                |
|       | 75                                            | 49,5                                  | 7,2                            | 8,9                                 |
|       | 90                                            | 53,3                                  | 7,9                            | 7,5                                 |
|       | (контроль)                                    |                                       |                                |                                     |
|       | 100                                           | 51,8                                  | 8,1                            | 9,5                                 |

ному торможению биосинтеза белковых компонентов и к ускорению липидообразования. При этом резко уменьшается содержание в дрожжах аланина, лейцина и глутаминовой кислоты. Это означает, что при недостатке азотного питания в среде процесс культивирования дрожжей на *n*-алканах переходит из «белкового» режима в «жировой» режим.

Снижение количества растворенного кислорода в среде (ниже оптимального 0,3—0,7 мг/л) также приводит к уменьшению содержания белка в биомассе и накоплению в среде продуктов неполного окисления углеводов. Увеличение количества растворенного кислорода (выше оптимального) вызывает снижение конверсии углеводов вследствие окислительной дестабилизации липидных фрагментов клеточных мембран и изменения проницаемости. В среднем дрожжи, выращенные на *n*-алканах, содержат 40—65% белковых веществ, 12—30% углеводов, 6—10% нуклеиновых кислот, 5—30% липидов и другие компоненты.

**Специфические биохимические потребности дрожжей** — продуцентов белковых веществ. Наряду со многими микроорганизмами, способными довольно хорошо расти на простых средах из *n*-алканов и минеральных солей, существует ряд их представителей, которые требуют для своего роста наличия в среде одного или нескольких биоорганических соединений. Это происходит из-за того, что отдельные микроорганизмы не способны к синтезу своих собственных факторов роста. Наиболее часто им требуются витамины и аминокислоты. Дрожжи, например, часто нуждаются в биотине, тиамине, рибофлавине. Важно заметить, что потребность данного микроорганизма в перечисленных факторах роста непостоянна и может изменяться в зависимости от исходного состава питательной среды, а также условий культивирования. Установленные количественные факты такого рода являются одной из важнейших основ создания оптимальных режимов подпитки микробных популяций с целью достижения максимальной скорости роста, т. е. максимальной скорости биосинтеза белка.

Так, используемые в промышленности штаммы-продуценты рода *Candida* нуждаются в биотине, некоторые — в тиамине: *C. guilliermondii*, *C. maltosa* и *C. tropicalis* (биотин и тиамин); *C. sake* (биотин), *C. lipolytica* (тиамин). Количество вводимого в среду биотина меняют в зависимости от молекулярной массы углеводов, используемых в качестве источника углерода: наибольшее — для  $C_{10}$ — $C_{12}$ -*n*-алканов, наименьшее — для  $C_{14}$ -*n*-алканов.

Такое снижение доли биотина обуславливает повышенную проницаемость клеточных стенок культур, выросших на средах с *n*-алканами с количеством углеродных атомов более 14. Что касается *C. lipolytica*, то эти дрожжи при недостатке тиамина накапливают пировиноградную и  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоты, по-

скольку, из-за отсутствия  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы, что исключает участие  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты в синтезе аминокислот и в «сцепленном» с ним синтезе белка.

### 3.2. Метаболизм метана и метанола

Метан, как известно, главный компонент природного газа и попутного газа нефтяных месторождений. Он выделяется при газификации угля и биомассы (синтетический газ). Использование метана в качестве источника углеводорода, труднорастворимого в воде, в комбинации с ферментируемыми системами требует сравнительно сложной технологии и микроорганизмов со специфическими биохимическими механизмами потребления и утилизации. Метанол, синтезируемый непосредственно из метана или из растительного сырья, легко растворяется в воде, а в водно-метанольных растворах микроорганизмы растут с высокими скоростями. С биохимической точки зрения метанол имеет более умеренный окислительный потенциал, чем «высоковосстановленный» метан, поэтому быстрее подвергается ферментативной конверсии в ключевые компоненты клеточного обмена.

Обычные метаболические пути требуют соединений, в которых два и более атома углерода соединены вместе; метаболизм метана и метанола (или  $C_1$ -единиц) ограничен относительно редкими реакциями, которые требуют специальных кофакторов. Имеются только специализированные микроорганизмы (метилотрофы), найденные в экологических нишах, которые способны утилизировать  $C_1$ -единицы как источник углерода и энергии.

С точки зрения синтеза белка бактерии имеют преимущество перед дрожжами: содержание белка в этих микроорганизмах составляет соответственно 60—80 и 35—50%. Однако в метилотрофных бактериях выше содержание нуклеиновых кислот (10—20% против 5—10%) из-за более короткого периода генерации. Заметим, что природный газ, помимо метана, содержит от 0,5 до 12% газообразных гомологов (этан, пропан и бутан). Obligатные метанокисляющие бактерии способны окислять этан, пропан и бутан, но не используют их для роста (так называемое соокисление или кометаболизм неростовых субстратов). Следовательно, полная утилизация низших *n*-алканов из природного газа может быть достигнута только при культивировании смешанной культуры, в состав которой входят факультативные метилотрофы и гетеротрофные микроорганизмы, способные использовать продукты окисления гомологов метана (спирты, альдегиды). Штамм облигатных метанокисляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* может образовывать 0,62 г биомассы на 1 г метана.

**Генерация энергии.** Окисление метана  $C_1$ -утилизирующими микроорганизмами происходит по следующей схеме:

|                    |        |               |          |               |        |               |         |               |        |
|--------------------|--------|---------------|----------|---------------|--------|---------------|---------|---------------|--------|
|                    | $CH_4$ | $\rightarrow$ | $CH_3OH$ | $\rightarrow$ | $HCHO$ | $\rightarrow$ | $HSOON$ | $\rightarrow$ | $CO_2$ |
| $\Delta G^\circ$ , |        |               | -109,6   |               | -188,1 |               | -239,8  |               | -244,4 |
| кДж/моль           |        |               |          |               |        |               |         |               |        |
| $E'$ , В           |        |               | +0,23    |               | -0,18  |               | -0,45   |               | -0,46  |

Каждая двухэлектронная окислительная стадия имеет отрицательное изменение свободной энергии, достаточное для сопряженного синтеза АТФ. Однако только окисление формальдегида в муравьиную кислоту и окисление последней в  $CO_2$  имеют окислительно-восстановительные потенциалы, достаточные для сопряженного восстановления НАД в НАДН ( $-0,32$  В), используемого клеткой для продуцирования АТФ.

Конверсия метана в метанол осуществляется облигатными метилотрофными бактериями *Methylomonas*, *Methylococcus*, *Methylosinus* и катализируется оксидазой смешанной функции (метаномоноксигеназой):



При этом кислород и НАДН расходуются в эквимолекулярных соотношениях. Фермент найден только в клеточной мембране.

Окисление метанола в  $C_1$ -утилизирующих бактериях *Methylophilus*, *Methylomonas*, *Pseudomonas* и др. происходит с участием метанолдегидрогеназы, локализованной в периплазме, цитоплазме, цитоплазматических мембранах. Для проявления активности фермента требуется кофермент — феназинметасульфат, действующий как донор электронов для неферментативного восстановления молекулярного кислорода. Очищенная метанолдегидрогеназа из *Pseudomonas* способна катализировать (оптимум pH около 9) окисление не только метанола и формальдегида, но и низкомолекулярных алифатических спиртов ( $C_2-C_9$ ), однако для индукции активности требуются феназинметасульфат и аммонийные соли. Фермент окисляет  $CH_3OH$  и  $HCHO$  практически с одинаковыми скоростями, т. е. имеет широкую субстратную специфичность. В бактериях *Methylococcus* выделен фермент, который проявляет активность с иными акцепторами, например с цитохромом c, но не зависит от НАД.

В метанолутилизирующих дрожжах *Candida boidinii* за катализ окисления метанола ответственна ФАД-зависимая метанол-оксидаза; фермент индуцибелен в отношении к метанолу. Обнаружены побочные стадии регенерации  $O_2$  с участием индуцируемой метанолом каталазы, с использованием  $H_2O_2$  из системы реакций метанолоксидазы. Каталаза и метанолоксидаза локализованы в микротельцах — пероксисомах метанолокисляющих дрожжей, в то время как формальдегиддегидрогеназа и форминате-

гидрогеназа обнаружены только в цитоплазме. Это показывает, что продукция и распад  $H_2O_2$  могут эффективно контролироваться кооперативным действием алкогольоксидазы и каталазы. Наконец, установлено, для *C. boidinii* и *Pichia pinus*, что специфичная к НАД дегидрогеназная активность обнаруживается лишь при росте на метаноле (а не на глюкозе). Это означает, что АТФ потенциально может образовываться в результате окисления метанола.

В окислении формальдегида бактериями принимает участие кроме феназинметасульфатсвязанной метанолдегидрогеназы целый ряд формальдегиддегидрогеназ: НАД-зависимая дегидрогеназа, циклическая система из 3-гексулозофосфатсинтазы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы и др. Очищенная растворимая альдегиддегидрогеназа из *Pseudomonas* катализирует (оптимум pH около 7) окисление ацетальдегида, глицеральдегида, бутиральдегида и пропионового альдегида в присутствии феназинметасульфата. Удельная активность фермента в растущих на метаноле клетках почти вдвое выше, чем в растущих на сукцинате. Это означает, что фермент действительно включается в окисление  $HCOH$ . В экстрактах *Pseudomonas methanica*, растущих на метаноле, найдена специфичная НАД-зависимая формальдегиддегидрогеназа, синтез которой индуцируется трипептидом глутатионом (глутаминилцистеинилглицин).

Обнаружение в ряде метилотрофных бактерий, использующих рибулозомонофосфатный цикл для углеродной ассимиляции, высокой удельной активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и фосфоглюконатдегидрогеназы свидетельствует о том, что циклический (шунтируемый) путь окисления формальдегида в  $CO_2$  (без образования муравьиной кислоты) играет важную метаболическую роль. С другой стороны, бактерии, утилизирующие сериновый путь для ассимиляции  $C_1$ -соединений, окисляют эти соединения, главным образом через муравьиную кислоту в  $CO_2$ .

В метанолутилизирующих дрожжах прямое окисление формальдегида в муравьиную кислоту катализируется НАД-зависимой дегидрогеназой, требующей глутатиона. Синтез фермента в *C. boidinii* индуцируется метанолом и репрессирован глюкозой.

Окисление муравьиной кислоты в  $CO_2$  в метилотрофных организмах (если оно происходит) связано с растворимой НАД-зависимой формиатдегидрогеназой — очень лабильным и субстрат-специфичным ферментом.

На рис. 3.8 показаны наиболее распространенные пути генерации энергии через окисление  $C_1$ -соединений, которые были найдены в бактериях и дрожжах. Ключевым соединением в этой схеме является формальдегид. Одна его часть конвертирует через ЦТК (либо глиоксилатный шунт) в клеточную массу (ассимиляторный путь); оставшаяся часть окисляется в  $CO_2$ , давая

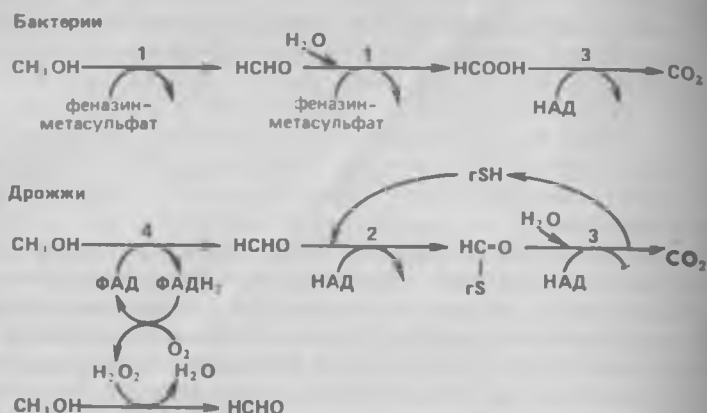


Рис. 3.8. Окислительные пути метаболизма метанола в бактериях (*Pseudomonas*) и дрожжах (*Hansenula polymorpha*):

1 — метанодегидрогеназа; 2 — формальдегиддегидрогеназа; 3 — форматдегидрогеназа; 4 — метанооксидаза; rSH — глутатион

энергию для роста и метаболизма (диссимиляторный путь). Для этого все метилотрофы содержат по меньшей мере один цитохром с, но в случае с *Methylophilus methylotrophus* описаны три типа цитохромов. Выбор альтернативы — (полный цикл Кребса или его глиоксилатный шунт) подчиняется феноменологической закономерности. Суть ее состоит в том, что микроорганизмы (например, *Pseudomonas oleovorans*), использующие рибулозомонофосфатный цикл для ассимиляции углерода, проявляют высокую  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназную и относительно низкую изоцитратлиазную активности. И, наоборот, микроорганизмы (например, *Methylosinus trichosporium*), использующие сериновый путь, имеют всегда низкую  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназную активность. В первом случае чаще всего реализуется полный ЦТК; во втором случае доминирует глиоксилатный шунт.

**Ассимиляция источника углерода.** Выявлены два основных пути утилизации формальдегида в метилотрофных микроорганизмах, оба приводящие к синтезу  $\text{C}_3$ - и  $\text{C}_4$ -соединений. Это рибулозомонофосфатный цикл и сериновый путь. Наиболее экономичным (по выходу биомассы на 1 моль потребленного АТФ) считают первый.

**Сериновый путь.** Предусматривает последовательность реакций конденсации формальдегида, глицина и диоксида углерода в яблочную кислоту (рис. 3.9). В варианте с участием изоцитратлиазы («+»-вариант) яблочная кислота преобразуется в малил-КоА, последовательно расщепляющийся в ацетил-КоА и глиоксильную кислоту. Последняя конвертирует в глицин под дей-



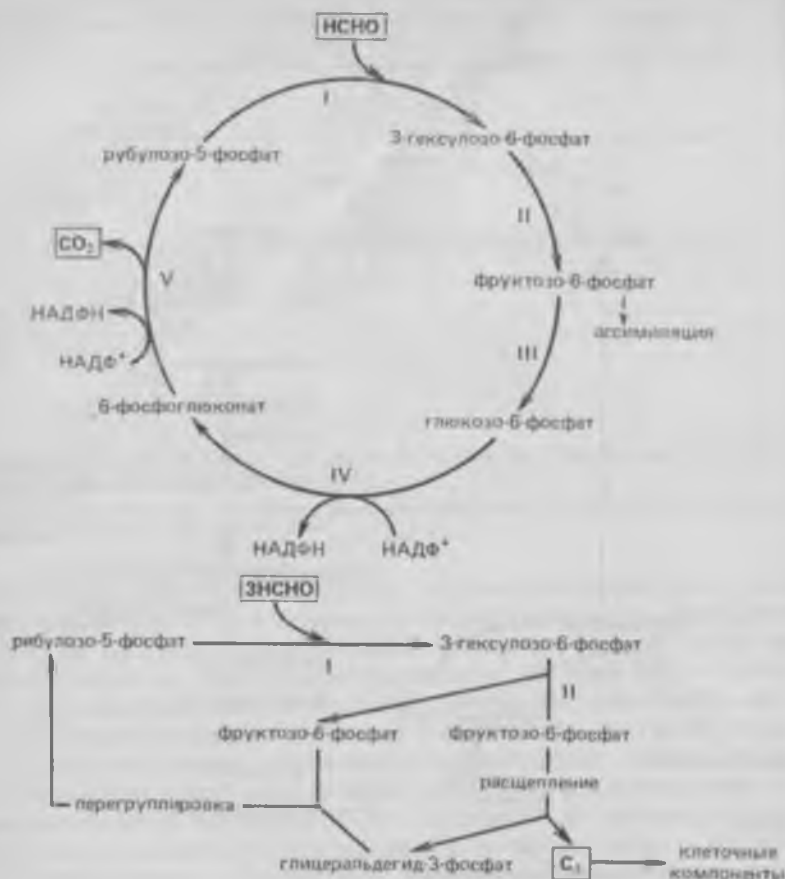


Рис. 3.10. Схема рибулозомонофосфатного цикла фиксации и окисления формальдегида:

*I* — гексулозофосфатсинтетаза; *II* — 3-гексулозофосфатизомераза; *III* — глюкозофосфатизомераза; *IV* — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; *V* — фосфоглюконатдегидрогеназа; C<sub>1</sub> — диоксидиэтонфосфат или пировиноградная кислота

ключевого фермента — оксипируватредуктазы — янтарной кислотой. Энергетическая эффективность серинового пути равна 12,5 г биомассы/моль АТФ.

Рибулозомонофосфатный цикл. С использованием метана, метанола и формальдегида с меченым атомом C<sup>14</sup> при выращивании *Pseudomonas methanica* и *Methylococcus capsulatus* обнаружена повышенная радиоактивность сахарофосфатов, особенно для гексоз. Этот факт не обнаружен для клеток *Methylobionas methanooxidans*, использующих сериновый путь утили-

заций  $C_1$ -единиц. Для интерпретации данных радиохимического анализа предложен рибулозомонофосфатный цикл — модифицированный вариант пентозофосфатного цикла (рис. 3.10). Его ключевой реакцией является конденсация трех молекул формальдегида с одной молекулой рибулозо-5-фосфата в относительно лабильное промежуточное соединение гексулозо-6-фосфат с длительностью полупревращения менее 30 мин (в щелочном растворе). В экстрактах клеток бактерий обнаружены ферменты расщепления фруктозо-6-фосфата — фруктозодифосфатальдолоаза (до глюкозо-3-фосфата) и кетодезоксифосфоглюконатальдолоаза (до пировиноградной кислоты). Кроме того, найдены ферменты реакций перегруппировки фруктозо-6-фосфата — трансальдолоаза и (или) седогептулозодифосфатаза, приводящие к регенерации рибулозо-6-фосфата. Обнаружение значительной 6-фосфоглюконатдегидрогеназной (V) активности в микроорганизмах с рибулозомонофосфатным циклом указывает на использование ими дополнительного пути окисления формальдегида в  $CO_2$  (см. рис. 3.8 и 3.10). Этот путь связан с продуцированием НАДФН, т. е. может быть использован как источник НАДФН для биосинтетических целей. В целом энергетическая эффективность рибулозомонофосфатного цикла равна 27,3 г биомассы/моль АТФ.

Результаты исследований метанолутилизирующих дрожжей и их экстрактов смогли выявить гексулозофосфатсинтеазную (I) активность. Следовательно, дрожжи могут использовать сахарофосфатный путь, аналогичный или почти идентичный рибулозомонофосфатному циклу. В присутствии АТФ I-активность стимулировалась.

Достаточно полно изучены свойства и регуляция ключевого фермента рибулозомонофосфатного цикла — гексулозофосфатсинтеазы из *Methylococcus capsulatus*. Фермент специфичен к формальдегиду и D-рибулозо-5-фосфату, активируется ионами  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  (ионы  $Ni^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  подавляют активность фермента) и имеет оптимум активности при pH около 7.

I-Активность может выполнять альтернативные функции в метанутилизирующих и метанолутилизирующих бактериях. В метановых «потребителях» I-активность не имеет контролирующей функции, лимитирующей скорость конденсации, которую катализирует I (рис. 3.10), и зависит от концентрации накапливающегося метанола. Наконец, фермент характеризуется «нормальной» кинетикой Михаэлиса—Ментен в отношении специфического субстрата. В метанольных потребителях I-активность имеет контролирующую (лимитирующую скорость конденсации) функцию и характеризуется сложной кинетикой утилизации субстрата. Во многих бактериях формальдегид может быть ответственным за репрессию синтеза I. В дрожжах синтез фермента индуцируется метанолом и в ряде случаев может быть объектом катаболитной

репрессии более легкоутилизируемыми углеродными источниками (глюкоза, этанол). I-Активность усиливается АТФ, которая может служить положительным эффектором синтеза I.

**Ростовая модель на  $C_1$ -источниках.** Итак, с точки зрения энергетики  $C_1$ -ассимиляции рибулозомонофосфатный путь оценивается как наиболее эффективный (в сравнении с сериновым путем), особенно его вариант с фазами гликолитического расщепления фруктозо-6-фосфата и трансальдолазной перегруппировки последнего (ресинтез рибулозо-6-фосфата). В связи с этим организмы, которые утилизируют субстрат по рибулозомонофосфатному пути, предпочтительны для производства биомассы одноклеточных. Например, выход биомассы от субстрата при реализации серинового пути от 0,31 до 0,41 г абс. СВ на 1 г метанола, тогда как при реализации рибулозомонофосфатного пути выход составляет от 0,49 до 0,54 г абс. СВ на 1 г метанола. Это различие в еще большей степени проявляется при росте на метане. Эффективность выхода биомассы от субстрата несколько снижается (примерно на 25%) для метанолутилизирующих дрожжей из-за включения их метанолоксидазы в метаболизм и отсутствия сопряжения окисления метанола в  $HCNO$  с продуцированием АТФ.

Разработана биохимическая модель роста метанолокисляющих бактерий, включающая регуляцию синтеза двух ключевых ферментов — гексулозофосфатсинтетазы (I) и метанолдегидрогеназы. Формальдегид может репрессировать синтез I, тогда как метанол индуцирует синтез обоих ферментов; остальные биохимические элементы, которые важны для понимания ростового поведения клеток, суммированы на рис. 3.11. Метаболические процессы представлены тремя ферментативными стадиями окисления метанола до  $CO_2$  и стадией фиксации формальдегида через рибулозомонофосфатный цикл. Ясно, что реакция конденса-

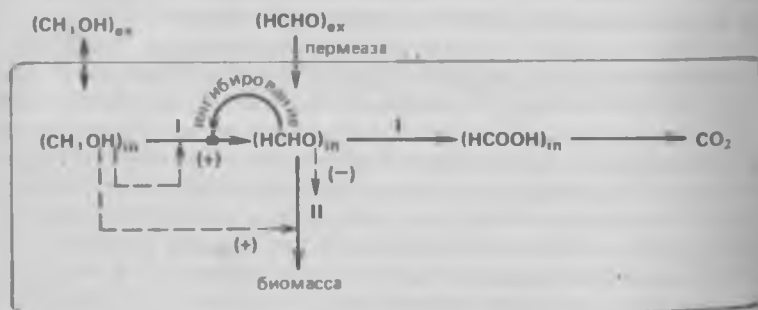


Рис. 3.11. Регуляция роста метанолутилизирующих бактерий:

I — метанолдегидрогеназа; II — гексулозофосфатсинтетаза; (+) — индукция; (-) — репрессия

дин — определяющая ступень в ассимиляции источника углерода и, следовательно, в клеточной регуляции. Высокие концентрации НСНО ингибируют окисление метанола и репрессируют биосинтез гексулозофосфатсинтетазы, что синхронно отражается на снижении скорости роста и выхода клеточной массы. Контроль метаболической регуляции будет сводиться в этом случае к быстрому снижению уровня концентрации формальдегида (от токсичного значения) прямым его окислением и к ограничению дальнейшего продуцирования формальдегида. Последний входит в клетку с помощью пермеаз, т. е. против градиента концентрации, и может обратно «просачиваться» в культуральную среду после экспоненциальной фазы. Внутриклеточная концентрация НСНО<sub>in</sub> обычно на порядок выше внеклеточной концентрации НСНО<sub>ex</sub> при росте на метаноле и формальдегиде. Метанол может проникать в клетку путем простой диффузии и, как уже упоминалось, индуцировать синтез гексулозофосфатсинтетазы. Специфичная дегидрогеназная активность клеток, растущих на метаноле, незначительно снижается в первые часы после инокуляции культуры, тогда как общая активность остается постоянной. Во время экспоненциальной фазы роста специфичная активность увеличивается (примерно на 30%) и достигает максимальной величины в стационарной фазе. Этот факт еще раз подтверждает то, что метанол ответствен и за индукцию синтеза метанолдегидрогеназы.



Итак, можно полагать, что скорость роста микроорганизмов на  $C_1$ -источниках будет функцией внутриклеточной концентрации формальдегида и гексулозофосфатсинтетазной активности, а выход биомассы — функцией внутриклеточных концентраций метанола и формальдегида, гексулозофосфатсинтетазной и метанолдегидрогеназной активностей штаммов микроорганизмов. Понимание механизма клеточной регуляции и метаболического отклика микроорганизма на окружающие условия является необходимым шагом в оптимизации получения биомассы на перспективных  $C_1$ -источниках.

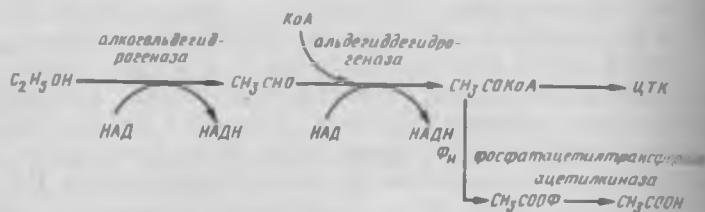
### § 3.3. Метаболизм этанола

Многие микроорганизмы могут быстро ассимилировать этанол как источник углерода и энергии. Наиболее активны в этом отношении дрожжи *Candida utilis*, *Candida valida*, *Hansenula anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* и др. Этанол как сырье имеет ряд

преимуществ: 1) он нетоксичен, что делает биомассу микроорганизмов, выращенных на нем, пригодной для пищевых целей; 2) он легко обрабатывается и хранится; 3) ферментация на этаноле как на окисленной форме углеводорода требует меньше молекулярного кислорода, чем процесс на насыщенных углеводородах.

Рассмотрим метаболические пути конверсии этанола в клеточные компоненты и энергию при получении биомассы.

Важная особенность митохондрий этанолюкисляющих дрожжей — наличие специфической формы НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы, катализирующей окисление этанола в ацетальдегид:



Под действием второго ключевого фермента — альдегиддегидрогеназы — ацетальдегид превращается в уксусную кислоту.

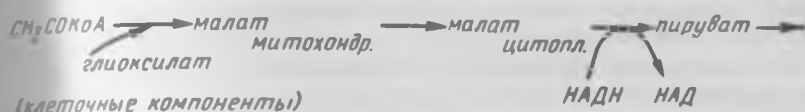
Заметим, что в цитоплазматическом пространстве дрожжей обнаружен еще один тип алкогольдегидрогеназы — растворимый. Если цитоплазматическая алкогольдегидрогеназа превращает ацетальдегид в этанол, то митохондриальная, наоборот, окисляет этанол в ацетальдегид. Первый процесс доминирует при спиртовом брожении в уксусную кислоту, второй — при получении биомассы дрожжей на основе этанола. Как результат реакции двухступенчатого окисления этанола, продуцируются 2 моль НАДН из 1 моль этанола. Продуцируемый ацетил-КоА может быть конвертирован при действии фосфатацетилтрансферазы и неорганического фосфата  $\text{Ф}_\text{н}$ , а также ацетилкиназы в уксусную кислоту, которая будет накапливаться как экстрацеллюлярный продукт или последовательно декарбоксилироваться в реакциях ЦТК. Окисление спирта сопряжено с окислительным фосфорилированием — продуцированием АТФ и восстановлением окислительных эквивалентов НАД:



Биохимическая целесообразность этих реакций состоит в том, что если, например, клетка испытывает дефицит кислорода, она может снизить потребность в нем путем экскреции уксусной кис-

лоты в культуральную среду. При этом, затрачивая 1 моль  $O_2$  на каждый моль этанола, клетка продуцирует 5 моль АТФ.

Ацетил-КоА входит в ЦТК при конденсации с оксокислотами в яблочную или лимонную кислоту, в зависимости от потребностей микроорганизмов в энергии. Некоторая часть ацетил-КоА включается в глиоксилатный шунт, сразу превращаясь в яблочную кислоту. В этом случае большая часть цитоплазматического НАДН включается в окисление этанола, так что яблочная кислота (малат) превращается скорее в пировиноградную кислоту (пируват), необходимую для синтеза клеточных компонентов и роста микроорганизма



чем в щавелевоуксусную кислоту, которая требует НАД. Когда концентрация этанола уменьшается и экстрацеллюлярная уксусная кислота «возвращается» в клетку вследствие сдвига, в ацетатном равновесии



увеличивается доля НАД. Последний включается в конверсию яблочной кислоты в щавелевоуксусную, что приводит к увеличению концентрации ацетил-КоА через полный ЦТК.

Следовательно, при низких концентрациях этанола и высоких концентрациях уксусной кислоты большая часть субстрата утилизируется скорее для поддержания клеточной жизнедеятельности, чем для роста клеток. Отметим, что на синтез и активность алкогольдегидрогеназы оказывают репрессирующее и ингибирующее действие образующиеся продукты метаболизма — ацетальдегид и уксусная кислота.

### § 3.4. Метаболизм водородокисляющих бактерий

В последнее десятилетие в нашей стране и за рубежом привлекают внимание литотрофные микроорганизмы, и в первую очередь водородокисляющие бактерии. Они рассматриваются как биосинтетики белка, витаминов и других ценных продуктов микробного синтеза.

Интерес к водородным бактериям вызван следующими причинами: 1) способность к автотрофному росту (т. е. независимость производства биомассы от источников органического сырья); 2) способность расти за счет энергии окисления водорода, что

позволяет осуществлять эффективное превращение электроэнергии, а в дальнейшем ядерной энергии и, возможно, солнечной в белок через электролитическое, тепловое и фотохимическое разложение воды. Электролиз уже сейчас дает возможность использовать энергию гидроресурсов для получения микробного белка. В этом случае на синтез 1 кг сухой биомассы расходуется 40—45 кВт·ч электроэнергии.

Облигатно аэробные представители водородных бактерий, как правило, являются факультативными автотрофами. Они способны использовать диоксид углерода в качестве единственного источника углерода за счет энергии окисления водорода (хемолиотоавтотрофия). Но они могут хорошо расти и хемоорганогетеротрофно, на воздухе в присутствии органических веществ, набор которых, однако, ограничен (это, прежде всего, соединения, метаболизируемые через ЦТК — органические кислоты; метанол, муравьиная кислота и др.).

Водородные бактерии (*Pseudomonas*, *Hydrogenomonas*, *Corynebacterium*, *Nocardia* и др.) получают энергию, необходимую для роста, посредством окислительного фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов от водорода к кислороду. Результатом действия цепи переноса электронов и реакции окислительного фосфорилирования является образование макроэргических соединений НАДН и АТФ. В некоторых специфических условиях энергия запасается в виде полифосфатов. Эти продукты энергетического обмена потребляются при ассимиляции диоксида углерода и биосинтезе аминокислот. Специфика хемолитотрофного роста на водороде заключается прежде всего в функционировании водородоактивирующей системы. Активацию водорода и передачу электрона в цепь переноса электронов производит гидрогеназный ферментный комплекс, осуществляющий реакцию



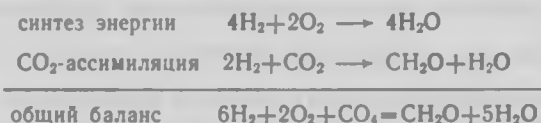
В бесклеточных экстрактах большинства водородных бактерий имеется две фракции с гидрогеназной активностью, различающиеся по локализации в клетке и характеру акцептора электронов и разделяемые центрифугированием. Гидрогеназа из надосадочной жидкости, т. е. растворимая, названа водородной дегидрогеназой. Функция этого фермента заключается в восстановлении НАД<sup>+</sup> в НАДН, который необходим для фиксации СО<sub>2</sub>, а также в качестве донора электронов для дыхательной цепи, т. е. растворимый фермент является НАД<sup>+</sup>-специфичным.

Мембраны бактерий содержат свою гидрогеназу, которая отличается от растворимой неспособностью восстанавливать НАД<sup>+</sup>. Ее функция заключается в обеспечении работы электрон-транспортной системы, причем происходит сопряженная генера-

ция АТФ. Образование гидрогеназного комплекса ферментов у одних бактерий (*Ps. denitrificans*) стимулируется водородом и автотрофными условиями роста; у других (*A. eutrophus*) — синтез гидрогеназы является конститутивным в отношении  $H_2$ . Существование двух форм гидрогеназы, несущих разные функции, само по себе может иметь регулярное значение, сущность которого заключается в пространственном разделении мест синтеза восстановителя (НАДН) и АТФ.

Дыхательная цепь водородокисляющих бактерий включает все основные типы переносчиков — хиноны, флавопротенны, цитохромы типов *b* и *c*, цитохромоксидазы. Для *A. eutrophus* наиболее вероятно функционирование дыхательной цепи, в которой работают все три известных центра фосфорилирования и дополнительный трансгидрогеназный центр. Количественное содержание цитохромов мало зависит от природы донора электронов и определяется в основном природой и концентрацией акцептора.

Метаболически автотрофный «образ жизни» в отличие от органотрофного обеспечивается действием восстановительного пентозофосфатного цикла ассимиляции диоксида углерода. Обмен веществ происходит по следующим уравнениям:



Ассимиляционная способность клетки, если рост не лимитирован источником энергии, определяется специфической активностью карбоксилирующих ферментов, прежде всего рибулозодифосфаткарбоксилазы. Активность ферментов восстановительного пентозофосфатного цикла зависит от физиологического состояния клетки и связана, по-видимому, с работой ее мембранного аппарата.

Появление среди первичных промежуточных продуктов фиксации CO<sub>2</sub>, помимо типичных для восстановительного пентозофосфатного цикла соединений (фосфоглицериновой кислоты, сахарофосфатов), некоторых аминокислот и органических кислот свидетельствует об участии других реакций карбоксилрования. У водородных бактерий показано действие фосфоенолпируваткарбоксилазы, активность которой достаточна для обеспечения 10%-ной общей фиксации CO<sub>2</sub>. Водородные бактерии способны реализовать полный цикл трикарбоновых кислот, который в автотрофных условиях выполняет конструктивные функции вследствие снижения активности α-кетоглутаратдегидрогеназы и некоторых других ферментов цикла.

Аналогично (4.5) рассчитывают в этом случае и обобщенную скорость каждой стадии

$$v_j = \frac{d\xi_j}{d\tau}. \quad (4.9)$$

Согласно закону сохранения массы изменение общей массы всех участников реакции  $dm_{\text{общ}}$  при любых процессах в изолированных и закрытых системах равно нулю, т. е.

$$dm_{\text{общ}} = \sum_{i=1}^I dm_i = d\xi \sum_{i=1}^I \nu_i M_i = 0 \quad (4.10)$$

Поскольку  $d\xi \neq 0$ ,

$$\sum_{i=1}^I \nu_i M_i = 0. \quad (4.11)$$

Уравнение (4.11) известно как стехиометрическое уравнение простой химической реакции; аналогичным выражением описывается и каждая стадия сложного процесса.

В открытых системах изменение массы отдельных компонентов складывается из двух частей

$$dm_i = d_e m_i + d_i m_i, \quad (4.12)$$

первая из которых учитывает обмен с внешней средой, а вторая — химические превращения внутри системы. Для каждого из компонентов

$$dm_i = d_e m_i + M_i \sum_{j=1}^J \nu_{ij} d\xi_j \quad (4.13)$$

$$\text{или} \quad dm = d_e m + \sum_{j=1}^J d\xi_j \sum_{i=1}^I \nu_{ij} M_i. \quad (4.14)$$

Поскольку для каждой  $j$ -й стадии стехиометрическое уравнение имеет вид

$$\sum_{i=1}^I \nu_{ij} M_i = 0,$$

второй член правой части уравнения (4.14) равен нулю, т. е.  $d_i m_i = 0$ , и

$$dm = d_e m. \quad (4.15)$$

Таким образом, для открытых систем изменение массы любого компонента внутри системы определяется только обменом с внешней средой.

Описание энергетических свойств термодинамических систем, в которых протекают биохимические реакции, основано на первом и втором началах термодинамики. Согласно первому началу

внутренняя энергия системы  $U$  изменяется в любом процессе в однозначной связи с работой  $W$  и теплотой  $q$  этого процесса.

$$dU = \delta q - \delta W, \quad (4.16)$$

причем приращения функций  $q$  и  $W$ , не являющиеся полными дифференциальными, обозначены  $\delta$ .

Если система совершает чисто механическую работу (работу расширения или сжатия), то

$$dU = \delta q - p dV, \quad (4.17)$$

где  $p$  и  $V$  — давление и объем системы.

Знаки в уравнениях (4.16) и (4.17) соответствуют условию, принятому в химической термодинамике, по которому положительный знак приписывается теплоте, поглощаемой системой, и работе, которая совершается против внешних сил.

В отличие от первого начала, справедливого для всех процессов, второе начало термодинамики имеет вид нестрогого неравенства, связывающего теплоту процесса с изменением энтропии и температурой  $T$ :

$$\delta q \leq T dS. \quad (4.18)$$

Знак равенства в уравнении (4.18) справедлив только для обратимых процессов, тогда как в необратимых процессах произведение  $T dS$  всегда больше  $\delta q$ . Очевидно, для необратимых процессов можно записать второе начало в виде равенства, если ввести понятие «некомпенсированной» теплоты  $\delta q'$  таким образом, чтобы

$$T dS = \delta q + \delta q'. \quad (4.19)$$

При этом легко показать, что некомпенсированная теплота всегда положительна, поскольку согласно (4.18)

$$T dS - \delta q > 0,$$

и таким образом

$$\delta q' = T dS - \delta q > 0. \quad (4.20)$$

Изменение энтропии для необратимых процессов может быть получено из уравнения (4.19):

$$dS = \delta q/T + \delta q'/T. \quad (4.21)$$

Для закрытых и особенно открытых систем, представляющих наибольший интерес для биотехнологии, можно связать правую часть уравнения (4.21) с двумя причинами, вызывающими изменение энтропии. Действительно, если общая необратимость процесса связана с необратимым характером химических превращений внутри системы, то можно соотнести первый член первой ча-

сти уравнения (4.21) с обменом системы с внешней средой, а второй — с необратимостью внутренних превращений

$$dS = \frac{\delta q}{T} + \frac{\delta q'}{T} = d_e S + d_i S. \quad (4.22)$$

Очевидно, отсюда следует неравенство

$$d_i S = \frac{\delta q'}{T} > 0, \quad (4.23)$$

которое будет подробно обсуждаться далее при рассмотрении сопряженных реакций. Для изолированных систем, когда  $d_e S = 0$ , справедливо неравенство  $dS = d_i S \geq 0$ , причем знак равенства относится к обратимым адиабатическим (изоэнтروпийным) процессам.

Большинство биохимических реакций, по крайней мере при их протекании *in vitro*, можно рассматривать как обратимые процессы. В этом случае уравнение (4.18) имеет вид равенства и дает возможность получить так называемое объединенное уравнение первого и второго начал термодинамики, подставив выражение для  $\delta q$  из (4.18) в (4.17):

$$dU = TdS - \delta W. \quad (4.24)$$

Для химических и особенно биохимических процессов удобно рассматривать два типа работы, отделяя работу расширения (сжатия)  $pdV$  от так называемой полезной работы  $\delta W'$ , которая заключается в создании электрических потенциалов, свечении и т. п.:

$$\delta W = pdV + \delta W'. \quad (4.25)$$

Из уравнения (4.24) можно вывести эту величину:

$$-\delta W' = dU + pdV - TdS. \quad (4.26)$$

Уравнение (4.26) позволяет провести интегрирование в пределах от некоторого начального состояния 1 до конечного 2, если рассматривать обратимый процесс, протекающий в изобарно-изотермическом режиме ( $p = \text{const}$ ,  $T = \text{const}$ ). В этом случае полезная работа максимальна:

$$\begin{aligned} -\int_1^2 \delta W' &= \int_1^2 dU + \int_1^2 pdV - \int_1^2 TdS; \\ -W' &= U|_2 + pV|_2 - TS|_2; \\ -W' &= \Delta(U + pV) - T\Delta S = \Delta H - T\Delta S = \Delta G. \end{aligned} \quad (4.27)$$

Уравнение (4.27) связывает максимальную полезную работу с изменением энтальпии  $H = U + pV$  и приравнивает ее к измене-

нию свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ). Отметим, что условия интегрирования — постоянные давление и температура — характерны именно для биохимических реакций и вообще для большинства биологических процессов, поэтому величина свободной энергии Гиббса широко применяется для описания биологических систем.

Одно из наиболее важных приложений понятия свободной энергии заключается в оценке самопроизвольности любых процессов, в том числе и биологических реакций. Действительно, равенство —  $W' = \Delta G$  дает возможность предсказать направление протекания любого обратимого процесса в изобарно-изотермических условиях: если расчет изменения свободной энергии при предлагаемом переходе системы из первого во второе состояние дает величину  $\Delta G < 0$ , то очевидно, что  $W'$  в таком процессе будет положительна, т. е. система способна не только самопроизвольно совершить указанный переход, но и совершить работу против внешних сил. Обратный результат  $\Delta G > 0$  означает, что для предполагаемого перехода работа будет отрицательна, т. е. ее надо будет совершать над системой извне. Ясно, что такой процесс не может быть самопроизвольным, т. е. возможно лишь превращение системы в обратном направлении. Наконец, результат  $\Delta G = 0$  означает, что первое и второе состояния энергетически неразличимы (равновесие не нарушается). Понятно, что все сказанное выше полностью относится к любым реакциям, если первое состояние отнести к исходным веществам, второе — к продуктам.

Одним из важнейших уравнений химической термодинамики является изотерма Вант—Гоффа, связывающая изменение свободной энергии Гиббса с константой равновесия реакции. При общей записи химического превращения в виде



константа равновесия описывается зависимостью

$$K = \frac{\prod_{j=1}^m \bar{a}_{B_j}^{\nu_j}}{\prod_{i=1}^n \bar{a}_{A_i}^{\nu_i}} \quad (4.29)$$

где  $\bar{a}_{B_j}$  и  $\bar{a}_{A_i}$  — активности продуктов и исходных веществ в равновесной смеси.

Если исходные активности реагентов обозначить через  $a_{A_i}$ , а конечные активности продуктов обозначить через  $a_{B_j}$ , изотерму

Вант — Гоффа можно представить в виде такой зависимости

$$\Delta G = -RT \ln K + RT \ln \frac{\prod_{j=1}^m a_{Bj}^{\nu_j}}{\prod_{i=1}^n a_{Ai}^{\nu_i}} \quad (4.30)$$

При проведении процесса в условиях, когда начальные активности исходных веществ и конечные активности продуктов равны единице, т. е. от стандартного состояния исходных реагентов до стандартного состояния продуктов, второй член правой части уравнения (4.30) обращается в нуль и

$$\Delta G^0 = -RT \ln K. \quad (4.31)$$

Входящее в уравнение (4.31) стандартное изменение свободной энергии Гиббса  $\Delta G^0$  описывает таким образом только вполне конкретный процесс при данных температуре и давлении, который во многих случаях оказывается чисто гипотетическим. Естественно, что величина и знак  $\Delta G^0$  уже не говорят о самопроизвольности или несамопроизвольности реакции, а лишь позволяют найти значение константы равновесия и таким образом рассчитать, например, состав равновесной смеси. Впрочем, при биохимических реакциях чаще приходится поступать наоборот: по измеренным в эксперименте равновесным активностям (концентрациям) реагентов рассчитывают константу равновесия и далее по уравнению (4.31) находят стандартное изменение свободной энергии. Напомним, однако, что полное уравнение (4.30) вполне пригодно для решения вопроса о направлении биохимической реакции, если известны так называемые физиологические концентрации или активности реагентов  $a_{Ai}$  и  $a_{Bj}$ .

## § 4.2. Практические расчеты при описании равновесия биохимических реакций

Термодинамическое описание биохимических реакций включает, как и для любых химических превращений, расчет или экспериментальное определение тепловых эффектов, изменений энтропии и свободной энергии. Нахождение теплового эффекта проводится, как правило, расчетным путем с использованием закона Гесса, при этом используют табличные значения теплот образования реагентов в стандартном состоянии или их теплот сгорания. Второй вариант расчета менее точен, так как суммарное изменение энтальпии находится как разность больших величин — теплот сгорания исходных веществ и продуктов. Использование теплот образования в этом смысле предпочтительнее, так как

сами величины  $\Delta_f H^0_{298}$  значительно меньше по абсолютной величине. Заметим только, что точный расчет должен учитывать поправки на изменение энтальпии при переводе вещества из табличного стандартного состояния в одноактивный водный раствор. В ряде случаев такие поправки можно опустить, поскольку теплоты растворения биохимических реагентов в воде обычно невелики.

Значительно больший интерес представляют значения  $\Delta G$  и  $\Delta G^0$  для биохимических реакций, однако нахождение этих значений связано с рядом трудностей. Наиболее простой и более удобный путь заключается в использовании табличных величин стандартных свободных энергий образования реагентов  $\Delta_f G^0$ , которые обычно табулированы для температуры 25°C (298 K). Верные обычно табулированы для температуры 25°C (298 K). Верные свободная энергия образования простых веществ — углерода (графита), кислорода, водорода и т. п. — принята равной нулю.

Стандартное изменение свободной энергии при протекании биохимической реакции находят по уравнению, аналогичному закону Гесса:

$$\Delta G^0_{298} = \sum_{j=1}^m \nu_j (\Delta_f G^0_{298})_j - \sum_{i=1}^n \nu_i (\Delta_f G^0_{298})_i. \quad (4.32)$$

Использование этого уравнения требует знания величин  $\Delta_f G^0_{298}$  в стандартном, т. е. одноактивном, водном растворе; это достигается введением поправки  $\Delta(\Delta_f G^0_{298})$  к табличному значению свободной энергии образования. Для твердых веществ такая поправка основана на том, что переход твердого компонента в его насыщенный раствор не изменяет свободной энергии системы, поскольку твердое вещество находится в равновесии со своим насыщенным раствором. Следовательно, поправка должна учитывать лишь изменение активности растворенного вещества от начальной, соответствующей его насыщенному раствору, до единицы в стандартном состоянии в растворе

$$\Delta(\Delta_f G^0_{298}) = RT \ln \frac{1}{a_{\text{нас}}}. \quad (4.33)$$

Например, известно, что энергия образования твердой глюкозы — 911,1 кДж/моль, а активность насыщенного водного раствора глюкозы 16,6; поэтому свободная энергия образования глюкозы в стандартном водном растворе

$$\Delta_f G^0_{298} = (\Delta_f G^0_{298})_{\text{тв}} + RT \ln \frac{1}{a_{\text{нас}}};$$

$$\Delta_f G^0_{298} = -911,1 + 8,31 \cdot 298 \cdot 2,3 \lg \left( \frac{1}{16,6} \right) = -911,1 - 7,0 = -918,7 \text{ кДж/моль.}$$

Для расчета  $\Delta G^0$  реакций, идущих с участием газообразных компонентов, удобнее вести расчет для брутто-процесса, включающего растворение газообразных исходных веществ или десорбцию газообразных продуктов, т. е. использовать в расчете табличные значения по  $\Delta_f G^0_{298}$  этих веществ в газовой фазе.

Так, расчет свободной энергии, выделяемой при полном окислении 1 моль глюкозы в водном растворе может быть проведен по известным значениям  $\Delta_f G^0_{298}$ , которые равны для стандартного раствора глюкозы —918,7 кДж/моль, для диоксида углерода (газ) —394,7 кДж/моль и жидкой воды —237,4 кДж/моль. С учетом того, что стандартная свободная энергия образования газообразного кислорода равна нулю, получаем для реакции



$$\Delta G^0_{298} = 6(-394,7) + 6(-237,4) - (-918,7) - 6 \cdot 0 = -2873,9 \text{ кДж/моль.}$$

Для жидких компонентов, ограниченно растворимых в воде, расчет ведут аналогично тому, как описано выше для твердых тел. Для жидкостей, смешивающихся с водой в любых соотношениях, свойства вещества в стандартном состоянии в растворе можно принимать по свойствам чистой жидкости, если растворы не сильно отличаются от идеальных. Заметим, что для всех биохимических реакций, в которых участвует вода, ее активность принимается постоянной и равной единице, если процесс идет в водной среде.

Заметные изменения в величину стандартной свободной энергии образования вещества в водном растворе может внести диссоциация, при этом надо учитывать, вступает ли вещество в реакцию в недиссоциированной форме или в виде иона, а также принимать во внимание рН среды.

Если в реакции принимает участие недиссоциированное вещество кислотного типа  $HA$ , то при внесении в раствор некоторого его количества  $[HA]_0$  недиссоциированной останется только часть  $[HA]$ , и, таким образом, необходимо вносить поправку в табличное значение  $\Delta_f G^0_{298}$ , учитывающее изменение концентрации

$$\Delta(\Delta_f G^0_{298}) = RT \ln \frac{[HA]}{[HA]_0}. \quad (4.34)$$

Дробь, стоящая под знаком логарифма в этом уравнении связана со степенью диссоциации  $\alpha$  и константой диссоциации кислоты  $K_a$ :

$$\frac{[HA]}{[HA]_0} = \frac{[HA]}{[HA] + [A^-]} = 1 - \alpha = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a}.$$

Поправка для уточнения свободной энергии образования недиссоциированной кислоты в водном растворе имеет такой вид:

$$\Delta(\Delta_f G^0_{298}) = RT \ln(1 - \alpha) = RT \ln \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a}. \quad (4.35)$$

В частных случаях уравнение (4.35) можно упростить. Например, в нейтральной среде при рН 7,0 сильные кислоты с  $pK_a < 5,5$  имеют  $K_a \gg [H^+]$ , поэтому

$$\Delta(\Delta_f G^{\circ}_{298}) \approx RT \ln \frac{10^{-7}}{K_a} = 2,3 \cdot RT (pK_a - 7,0). \quad (4.36)$$

Напротив, слабые кислоты с  $pK_a > 8,5$  в среде с рН 7,0 диссоциированы пренебрежимо мало, т. к.  $K_a \ll [H^+]$  и  $\Delta(\Delta_f G^{\circ}_{298}) \approx 0$ .

Величину поправок можно оценить на примере трехосновной фосфорной кислоты с  $pK_a$  трех ступеней диссоциации, равными соответственно 2,1, 7,2 и 12,4; поправки к  $\Delta_f G^{\circ}_{298}$  для каждой из ступеней равны  $-28,1$ ,  $-1,3$  и  $0,0$  кДж/моль.

По аналогии с диссоциацией кислот учитывают и поправку на диссоциацию оснований

$$\Delta(\Delta_f G^{\circ}_{298}) = RT \ln \frac{[OH^-]}{[OH^-] + K_b}. \quad (4.37)$$

В тех случаях, когда в реакции участвует анион кислоты, свободную энергию его образования в водном растворе находят введением поправки к  $\Delta_f G^{\circ}_{298}$  для кислоты, учитывающей диссоциацию



Поскольку  $\Delta_f G^{\circ}_{298}$  для протона при концентрации, равной единице, принята равной нулю,

$$\Delta(\Delta_f G^{\circ}_{298}) = -RT \ln K_a = 2,3 \cdot RT pK_a. \quad (4.38)$$

Введением этой поправки расчет, однако, не заканчивается, т. к. необходимо учесть истинную концентрацию протонов, определяемую рН среды. Для этого нужно добавить величину  $RT \ln(10^{-pH}/1,0)$ , учитывающую изменение  $\Delta_f G^{\circ}_{298}$  протона при его концентрации  $10^{-pH}$  вместо 1,0. Таким образом, для нахождения свободной энергии образования аниона в среде с заданным рН надо ввести дополнительную к  $\Delta_f G^{\circ}_{298}$  кислоты величину

$$\begin{aligned} \Delta(\Delta_f G^{\circ}_{298}) &= -RT \ln K_a + RT \ln [H^+], \\ \text{или } \Delta(\Delta_f G^{\circ}_{298}) &= 2,3 \cdot RT (pK_a - pH). \end{aligned} \quad (4.39)$$

Например, для недиссоциированной янтарной кислоты в одноактивном водном растворе  $\Delta_f G^{\circ}_{298} = -747,0$  кДж/моль, поэтому при 298 К в водном растворе с рН 7,0 поправка для нахождения свободной энергии образования иона первой ступени диссоциации  $HOOCCH_2CH_2COO^-$  равна (с учетом  $2,3 \cdot R \cdot 298 = 5,70$  кДж/моль)

$$\Delta(\Delta_f G^{\circ}_{298}) = 5,70(4,18 - 7,0) = -16,0 \text{ кДж/моль}$$

и, значит,

$$\Delta_f G^{\circ}_{298} = -747,0 - 16,0 = -763,0 \text{ кДж/моль.}$$

В расчете использовано значение  $pK_a$  первой ступени диссоциации янтарной кислоты, равное 4,18.

Полученные тем или иным методом сведения о свободной энергии биохимической реакции позволяют рассчитать значения константы равновесия по уравнению изотермы Вант — Гоффа и в принципе найти состав равновесной смеси, как это обычно делают при термодинамическом описании химико-технологического процесса. Однако, как уже отмечалось, для биохимиков интересной оказывается обычно обратная задача, когда по известным экспериментальным данным о равновесии находят стандартное значение  $\Delta G^0$  и величину  $\Delta G$  в физиологических условиях.

Такое положение объясняется не только тем, что биохимические реагенты дают обычно неидеальные растворы, для которых расчет составов равновесных смесей по величинам изменения свободной энергии сильно затруднен, но и в первую очередь иной целью термодинамических расчетов в биохимии по сравнению с органическим синтезом. Действительно, целью термодинамического описания биохимических процессов оказывается главным образом нахождение истинного (в физиологических условиях) изменения свободной энергии, что позволяет оценить самопроизвольность реакции или, иначе, направление ее протекания в клетке. Эти же данные дают возможность рассмотреть необходимость сопряжения изучаемой реакции с гидролизом макроэргических связей (см. ниже).

Имея сведения о константе равновесия некоторой реакции в заданных условиях (температура, pH), исследователь получает возможность по изотерме Вант — Гоффа найти величину стандартного изменения свободной энергии, а последняя, в свою очередь, обеспечивает расчет полного изменения  $\Delta G$  с учетом концентраций (активностей) исходных веществ и продуктов. В результате такого расчета часто оказывается, что  $\Delta G$  и  $\Delta G^0$  сильно различаются. Проиллюстрируем это расчетом изменения свободной энергии при гидролизе АТФ, который, как известно, является основным источником энергий в клетке.

Из измерений равновесных концентраций АТФ, АДФ и неорганического фосфата  $\Phi$  в модельных условиях было найдено, что для реакции  $\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{АДФ} + \Phi$   $\Delta G = -30,6$  кДж/моль. В физиологических условиях в клетках концентрации реагентов могут иметь следующие значения:  $[\text{АТФ}] = [\Phi] = 0,005$  моль/л;  $[\text{АДФ}] = 0,0005$  моль/л;  $[\text{H}_2\text{O}] = 55,56$  моль/л. Тогда полное значение

$$\Delta G = -30,6 + 8,31 \cdot 298 \cdot 2,3 \cdot 10^{-3} \lg \frac{5 \cdot 10^{-4} \cdot 5 \cdot 10^{-3}}{5 \cdot 10^{-3} \cdot 55,56};$$

$$\Delta G = -30,6 - 28,7 = -59,3 \text{ кДж/моль.}$$

Как видно из расчета, изменение свободной энергии при гидролизе АТФ в клетке мышечной ткани практически вдвое превышает

шает по абсолютной величине стандартное изменение свободной энергии. Для пояснения расчета укажем, что в соответствии с уравнением (4.30) под знаком логарифма следовало поставить отношение произведений активностей продуктов (АДФ и  $\Phi$ ) и исходных веществ (АТФ и  $\text{H}_2\text{O}$ ). Экспериментальные данные, приведенные в виде молярных концентраций, пересчитывают в активности следующим общепринятым образом: вместо концентраций используют молярные доли, как величину, наиболее близкую к активности для разбавленных растворов.

Для реакций в растворах (по определению) активность любого растворенного вещества есть отношение его летучести к летучести в стандартном состоянии. Для разбавленных растворов, не слишком сильно отклоняющихся от идеальных, за стандартное состояние всех компонентов можно принимать чистое вещество, а раствор считать близким к идеальному. При низких концентрациях растворенных веществ летучести можно заменить парциальными давлениями, тогда по закону Рауля

$$p_i = p_{i,0} N_i, \quad (4.40)$$

где  $p_i$  и  $p_{i,0}$  — парциальные давления растворенного вещества, над раствором и в чистом виде (давление насыщенного пара);  $N_i$  — молярная доля вещества в растворе.

Активность  $i$ -го компонента

$$a_i = \frac{f_i}{f_{i,0}} \approx \frac{p_i}{p_{i,0}} = \frac{p_{i,0} N_i}{p_{i,0}} = N_i. \quad (4.41)$$

Соотношение (4.41) будет выполняться тем точнее, чем сильнее разбавлен раствор, т. е. чем он ближе к идеальному.

При расчете  $\Delta G$  гидролиза АТФ для нахождения молярных долей было использовано соотношение  $a_i = N_i \approx C_i / C_{\text{H}_2\text{O}}$ , поскольку молярная концентрация воды в воде равна 55,56 моль/л и значительно больше концентрации всех других реагентов  $C_i$  моль/л.

В заключение отметим, что в некоторых случаях при работе с термоустойчивыми ферментами и термофильными или психрофильными микроорганизмами биохимические реакции могут проводиться при температурах, значительно отличающихся от 298 К. В этих случаях может оказаться необходимым учитывать влияние температуры на изменение свободной энергии в ходе реакции, поскольку  $\Delta G$  является функцией температуры. По определению, изменение свободной энергии связано с изменениями энтальпии в энтропии любого процесса, в том числе и химического превращения, соотношением

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S, \quad (4.42)$$

$$\text{или} \quad \frac{\Delta G}{T} = \frac{\Delta H}{T} - \Delta S.$$

Дифференцируя по  $T$ , получим при  $p = \text{const}$

$$\frac{\partial}{\partial T} \left( \frac{\Delta G}{T} \right)_p = -\frac{\Delta H}{T^2} + \frac{1}{T} \left( \frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right) - \frac{\partial \Delta S}{\partial T},$$

причем два последних члена в правой части равны по абсолютной величине, поскольку для обратимого процесса

$$\frac{\partial \Delta H}{\partial T} = \Delta c_p \quad \text{и} \quad \frac{\partial \Delta S}{\partial T} = \frac{\Delta c_p}{T},$$

где  $\Delta c_p$  — условная величина, характеризующая изобарную теплоемкость химического процесса в целом и равная разности изобарных теплоемкостей продуктов и исходных веществ с учетом их стехиометрических коэффициентов.

Таким образом, оказывается, что

$$\frac{\partial}{\partial T} \left( \frac{\Delta G}{T} \right)_p = -\frac{\Delta H}{T^2}, \quad (4.43)$$

однако необходимо учитывать, что изменение энтальпии (тепловой эффект) реакции  $\Delta H$  тоже зависит от температуры по закону Кирхгоффа

$$d(\Delta H) = \Delta c_p dT, \quad (4.44)$$

$$\text{или} \quad \Delta H_{T_2} = \Delta H_{T_1} + \int_{T_1}^{T_2} \Delta c_p dT. \quad (4.45)$$

В свою очередь, зависит от температуры теплоемкость  $\Delta c_p$ , и ее изменение обычно описывается степенной зависимостью с эмпирическими коэффициентами  $\Delta a$ ,  $\Delta b$ ,  $\Delta c$ :

$$\Delta c_p = \Delta a + \Delta b T + \Delta c T^2 + \dots \quad (4.46)$$

В биохимических экспериментах температура меняется обычно не очень сильно, и в первом приближении можно считать, что  $\Delta c_p$  не зависит от температуры.  $\Delta c_p$  рассчитывают по теплоемкостям реагентов для реакции типа (4.28):

$$\Delta c_p = \sum_{j=1}^m \nu_j (c_p)_{\nu_j} - \sum_{i=1}^n \nu_i (c_p)_{\nu_i}. \quad (4.47)$$

С помощью зависимости (4.47) можно интегрировать уравнение (4.44) с константой интегрирования  $H_0$ :

$$\Delta H = H_0 + \int \Delta c_p dT, \quad (4.48)$$

а результат использовать для интегрирования основной зависимости (4.43). Последняя связывает  $\Delta G$  и  $\Delta H$  с температурой, в частности и для стандартных условий, т. е.

$$\frac{\partial}{\partial T} \left( \frac{\Delta G^0}{T} \right)_p = -\frac{\Delta H^0}{T^2}.$$

поэтому, используя изотерму Вант—Гоффа в виде уравнения (4.31), получим для постоянного давления

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad (4.49)$$

Это уравнение носит название изобары Вант—Гоффа и широко используется в термодинамике не только для расчета зависимости константы равновесия  $K$  от температуры, но и для получения наиболее надежных данных по тепловым эффектам реакций  $\Delta H^0$ . Действительно, в небольшом интервале температур, когда  $\Delta H^0 \cong \text{const}$ , интегральная форма уравнения (4.49) дает линейную зависимость в координатах  $\ln K - 1/T$ , а угол наклона этой прямой равен  $\Delta H^0/2,3 R$ . Таким образом, экспериментальное определение состава равновесной смеси и константы равновесия биохимических реакций в некотором достаточно (но не слишком!) широком интервале температур позволяет не только рассчитать стандартное изменение свободной энергии, но и тепловой эффект, а значит, и изменение энтропии по формуле (4.42).

#### § 4.3. Термодинамика необратимых процессов в приложении к биохимии

Химическая термодинамика дала однозначное определение самопроизвольности процесса, и в частности возможности химического превращения некоторых исходных веществ в заданные продукты. Ответ на эти вопросы, как уже отмечалось, может быть получен расчетом изменения свободной энергии: все процессы, приводящие к снижению свободной энергии системы, могут быть самопроизвольными. Это не означает, правда, что химические реакции с отрицательным значением  $\Delta G$  должны быстро приводить к превращению исходных реагентов в конечные, поскольку термодинамическая «разрешенность» реакции никак не связана с ее кинетическими особенностями. Действительно, несмотря на большое отрицательное значение изменения свободной энергии при превращении смеси водорода с кислородом в воду, такая «гремучая» смесь может в определенных условиях сохраняться длительное время, пока протекание реакции не будет вызвано тем или иным воздействием.

Эти выводы из термодинамики обратимых процессов подтверждены огромным практическим опытом химической технологии и сомнений не вызывают. Однако применение этих выводов к биохимическим системам встречало принципиальные затруднения. В биохимии наряду с реакциями, имеющими  $\Delta G < 0$ , давно известны процессы, протекающие с возрастанием свободной энергии и тем не менее осуществляемые клетками живых организмов.

Строгое объяснение этому явлению удалось дать только с позиций общей термодинамической теории сопряженных процессов, основанной на применении к биохимическим реакциям основных положений термодинамики необратимых процессов.

Изложенные ниже рассуждения, приводящие к выводу о возможности сопряженных процессов, в частности биохимических реакций, основаны на сделанном ранее выводе о неотрицательности некомпенсированной теплоты ( $\delta q' > 0$ ). Вводя понятие «средство» ( $A$ ), которое определяется равенством

$$\delta q' = A d\xi > 0, \quad (4.50)$$

и используя связь  $\delta q' = T d_i S$ , получим

$$d_i S = \frac{A}{T} d\xi > 0. \quad (4.51)$$

Далее, деля обе части равенства на  $d\tau$ , получим

$$\frac{d_i S}{d\tau} = \frac{A}{T} \frac{d\xi}{d\tau} = \frac{A}{T} v > 0. \quad (4.52)$$

Поскольку температура всегда положительна, из (4.52) следует, что в необратимом процессе произведение сродства на обобщенную скорость только положительно,  $Av > 0$ .

Выясним теперь физический смысл понятия «средство». Наиболее просто это сделать на примере процессов переноса, когда работа ограничивается чисто механической  $\delta W = pdV$ , т. е.  $\delta W' = 0$ . В этом случае из определения свободной энергии Гиббса ( $G = H - TS$ ) находим

$$\begin{aligned} dG &= d(H - TS) = d(U + pV - TS) = \\ &= dU + pdV + Vdp - TdS - SdT, \end{aligned} \quad (4.53)$$

поскольку приращение  $G$  как любой функции состояния есть полный дифференциал. Первое начало термодинамики для случая необратимого процесса может быть записано в виде

$$dU = TdS - pdV - \delta W' - \delta q'. \quad (4.54)$$

Подставляя (4.54) в (4.53), имеем

$$dG = TdS - pdV - \delta W' - \delta q' + pdV + Vdp - TdS - SdT, \quad (4.55)$$

или

$$dG = Vdp - SdT - \delta W' - \delta q'. \quad (4.55)$$

В изобарно-изотермическом режиме  $dp = 0$ ,  $dT = 0$ , т. е.

$$dG = -\delta W' - \delta q', \quad (4.56)$$

а в случае чисто механической работы

$$dG = -\delta q'. \quad (4.57)$$

Можно показать, что выражение (4.57) справедливо и для биологических систем, которые способны превращать тепло внешне

ней среды только в механическую работу. Действительно, из уравнений (4.22) и (4.23) имеем

$$d_i S = dS - d_e S = dS - \delta q/T.$$

Если  $dU = \delta q - p dV$ , то  $\delta q = dU + p dV$  и при  $p = \text{const}$  и  $T = \text{const}$

$$d_i S = dS - \frac{dU + d(pV)}{T} = \frac{T dS - dU - d(pV)}{T} = \frac{-dG}{T}.$$

Согласно (4.23)

$$d_i S = \frac{\delta q'}{T} = \frac{-dG}{T},$$

т. е. и этот случай приводит к равенству (4.57).

Сравнивая это выражение с выражением (4.50), находим

$$A d\xi = -dG,$$

$$\text{или } A = -\frac{dG}{d\xi}. \quad (4.58)$$

Таким образом, при изменении состояния системы, которое характеризуется некоторой величиной  $\Delta G$ , начальное сродство  $A_0 = -\Delta G$ . Величина сродства уменьшается по мере роста полноты процесса  $\xi$  и обращается в нуль при  $\xi = 1$ . Это означает, что сродство играет роль движущей силы процесса, которая максимальна вначале и убывает при его протекании. Используя понятие химического потенциала отдельных компонентов смеси

$$\mu_k = \left( \frac{\partial G}{\partial n_k} \right)_{p, T, n_e} \quad (4.59)$$

и связь степени полноты процесса с изменением числа молей компонента  $dn_k = v_k d\xi$ , получим выражение, удобное для расчета сродства

$$A_0 = -\Delta G = -\sum_k v_k \frac{\partial G}{\partial n_k} = -\sum_k v_k \mu_k. \quad (4.60)$$

Уравнение (4.60) позволяет найти величину сродства  $A_0$  по термодинамическим свойствам — стандартным свободным энергиям образования или химическим потенциалам всех компонентов системы.

Введение понятия сродства как эквивалента движущей силы процесса позволило понять термодинамическую сущность сопряженных процессов и обосновать таким образом возможность их возникновения. Как уже отмечалось, произведение сродства на

Строгое объяснение этому явлению удалось дать только с позиций общей термодинамической теории сопряженных процессов, основанной на применении к биохимическим реакциям основных положений термодинамики необратимых процессов.

Изложенные ниже рассуждения, приводящие к выводу о возможности сопряженных процессов, в частности биохимических реакций, основаны на сделанном ранее выводе о неотрицательности некомпенсированной теплоты ( $\delta q' > 0$ ). Вводя понятие «средство» ( $A$ ), которое определяется равенством

$$\delta q' = A d\xi > 0, \quad (4.50)$$

и используя связь  $\delta q' = T d_i S$ , получим

$$d_i S = \frac{A}{T} d\xi > 0. \quad (4.51)$$

Далее, деля обе части равенства на  $d\tau$ , получим

$$\frac{d_i S}{d\tau} = \frac{A}{T} \frac{d\xi}{d\tau} = \frac{A}{T} v > 0. \quad (4.52)$$

Поскольку температура всегда положительна, из (4.52) следует, что в необратимом процессе произведение средства на обобщенную скорость только положительно,  $Av > 0$ .

Выясним теперь физический смысл понятия «средство». Наиболее просто это сделать на примере процессов переноса, когда работа ограничивается чисто механической  $\delta W = pdV$ , т. е.  $\delta W' = 0$ . В этом случае из определения свободной энергии Гиббса ( $G = H - TS$ ) находим

$$\begin{aligned} dG &= d(H - TS) = d(U + pV - TS) = \\ &= dU + pdV + Vdp - TdS - SdT, \end{aligned} \quad (4.53)$$

поскольку приращение  $G$  как любой функции состояния есть полный дифференциал. Первое начало термодинамики для случая необратимого процесса может быть записано в виде

$$dU = TdS - pdV - \delta W' - \delta q'. \quad (4.54)$$

Подставляя (4.54) в (4.53), имеем

$$\begin{aligned} dG &= TdS - pdV - \delta W' - \delta q' + pdV + Vdp - TdS - SdT, \\ \text{или} \quad dG &= Vdp - SdT - \delta W' - \delta q'. \end{aligned} \quad (4.55)$$

В изобарно-изотермическом режиме  $dp = 0$ ,  $dT = 0$ , т. е.

$$dG = -\delta W' - \delta q', \quad (4.56)$$

а в случае чисто механической работы

$$dG = -\delta q'. \quad (4.57)$$

Можно показать, что выражение (4.57) справедливо и для биологических систем, которые способны превращать тепло внеш-

ней среды только в механическую работу. Действительно, из уравнений (4.22) и (4.23) имеем

$$d_1S = dS - d_2S = dS - \delta q/T.$$

Если  $dU = \delta q - pdV$ , то  $\delta q = dU + pdV$  и при  $p = \text{const}$  и  $T = \text{const}$

$$d_1S = dS - \frac{dU + d(pV)}{T} = \frac{TdS - dU - d(pV)}{T} = \frac{-dG}{T}.$$

Согласно (4.23)

$$d_1S = \frac{\delta q^*}{T} = \frac{-dG}{T}.$$

т. е. и этот случай приводит к равенству (4.57).

Сравнивая это выражение с выражением (4.50), находим

$$\begin{aligned} Ad\xi &= -dG, \\ \text{или } A &= -\frac{dG}{d\xi}. \end{aligned} \quad (4.58)$$

Таким образом, при изменении состояния системы, которое характеризуется некоторой величиной  $\Delta G$ , начальное сродство  $A_0 = -\Delta G$ . Величина сродства уменьшается по мере роста полноты процесса  $\xi$  и обращается в нуль при  $\xi = 1$ . Это означает, что сродство играет роль движущей силы процесса, которая максимальна вначале и убывает при его протекании. Используя понятие химического потенциала отдельных компонентов смеси

$$\mu_k = \left( \frac{\partial G}{\partial n_k} \right)_{p, T, n_{\neq k}} \quad (4.59)$$

и связь степени полноты процесса с изменением числа молей компонента  $dn_k = v_k d\xi$ , получим выражение, удобное для расчета сродства

$$A_0 = -\Delta G = -\sum_k v_k \frac{\partial G}{\partial n_k} = -\sum_k v_k \mu_k. \quad (4.60)$$

Уравнение (4.60) позволяет найти величину сродства  $A_0$  по термодинамическим свойствам — стандартным свободным энергиям образования или химическим потенциалам всех компонентов системы.

Введение понятия сродства как эквивалента движущей силы процесса позволило понять термодинамическую сущность сопряженных процессов и обосновать таким образом возможность их возникновения. Как уже отмечалось, произведение сродства на

обобщенную скорость должно быть положительным для всех необратимых процессов, протекающих самопроизвольно. С этих позиций неравенство  $Au > 0$  означает, что сродство  $A$  и обобщенная скорость  $u$  должны иметь одинаковые знаки, при этом случай  $A > 0$  и  $u > 0$  соответствует положению, когда процесс протекает в том направлении (в стехиометрическом уравнении — слева направо), которое предполагалось при расчете, давшем положительное значение сродства. Естественно, противоположный вариант, когда  $A < 0$  и  $u < 0$ , выполняется, если процесс идет в направлении, противоположном предполагавшемуся (т. е. справа налево).

В частном случае возможно равенство  $Au = 0$ , которое либо соответствует достижению равновесия, т. е. исчезновению движущей силы ( $A = 0$  и  $u = 0$ ), либо описывает так называемое ложное равновесие ( $A \neq 0$ , но  $u = 0$ ), которое может быть вызвано кинетическими причинами, как это отмечалось в § 4.1.

Наиболее существенный вывод из неравенства  $Au > 0$  может быть сделан при рассмотрении сложных систем, в которых протекает одновременно несколько процессов. В таких системах неравенство должно, очевидно, выполняться для всей системы в целом, но нет никаких оснований обязательно применять его к каждому процессу в отдельности. Хотя процессы, протекающие в разных частях системы и не связанные между собой ничем, кроме произвольно выбранных нами границ, не могут происходить по-иному, т. е. не по условию  $Au > 0$ , можно себе представить случай, когда в системе протекает сразу несколько взаимосвязанных процессов, в результате для всей их совокупности будет справедливо выражение

$$\sum_{j=1}^n A_j v_j > 0. \quad (4.61)$$

В простейшем из таких случаев речь идет о двух процессах, для которых вместе характерно неравенство

$$A_1 v_1 + A_2 v_2 > 0. \quad (4.62)$$

Конечно, возможно, что для каждого из этих процессов как  $A$ , так и  $v$  имеют одинаковые знаки, что и приводит к выполнению условия (4.62), но не запрещен и вариант, когда, например,  $A_1 v_1 > 0$ , а  $A_2 v_2 < 0$ , но сумма этих двух произведений все-таки положительна. Такие процессы называют сопряженными, причем это же название относится и ко второму из них, тогда как первый называется сопрягающим. Единственное требование, которое может быть выдвинуто к таким процессам с точки зрения правила (4.62), заключается в том, что сумма произведений сродства на обобщенную скорость всегда должна быть положительной,

т. е. сопрягающий и сопряженный процессы взаимообусловлены по скорости:

$$|A_1 v_1| > |A_2 v_2| \quad (4.63)$$

$$\text{или} \quad v_2 < \frac{A_1}{A_2} v_1.$$

Поскольку первый процесс имеет положительное сродство и, значит, отрицательное значение  $\Delta G$ , он называется экзергоническим, а второй — с положительным значением  $\Delta G$  — эндергоническим.

Подтверждая возможность существования сопряженных процессов, частным случаем которых являются сопряженные биохимические реакции, термодинамика необратимых процессов никак не определяет способа их осуществления. Современные достижения биохимии позволяют, однако, сформулировать основной принцип: сопряженные реакции всегда имеют общий промежуточный продукт.

В общем виде такие реакции представляются схемой



Если, как и выше, сопрягающей является первая реакция, то термодинамическим условием их совместного протекания является  $|\Delta G_1| > |\Delta G_2|$ , причем здесь речь идет о реальных (а не стандартных) значениях изменения свободной энергии для каждой реакции в физиологических условиях.

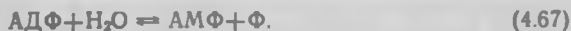
Известно, что в микробных клетках в роли сопрягающей обычно бывает реакция гидролиза макроэргических связей, например отщепления фосфатных групп от аденозинтрифосфата



Имеют место также отщепление сразу двух фосфатных групп (в виде единой частицы), приводящее к образованию аденозинмонофосфата



и последовательный гидролиз аденозиндифосфата до аденозинмонофосфата



Стандартное изменение свободной энергии для всех этих реакций практически одинаково и составляет  $-30,6$  кДж/моль. Реальное значение  $\Delta G$  может заметно меняться в зависимости от физиологических условий в клетках и обычно колеблется от  $-50$  до  $-60$  кДж/моль. Это означает прежде всего, что одноступенчатое протекание реакций с  $\Delta G > 50 \div 60$  кДж/моль не может

быть обеспечено путем сопряжения с гидролизом АТФ, причем практически разница между абсолютными значениями изменений свободной энергии сопряженных реакций бывает обычно значительна.

Поясним сказанное на примере существования эндэргонической реакции конденсации глюкозы и фруктозы в клетках, способных синтезировать сахарозу:



Для этой реакции была найдена величина  $\Delta G = 20,9$  кДж/моль, что вполне согласуется с известным из органической химии фактом самопроизвольного протекания этой реакции справа налево, когда она называется ннверсией тростникового сахара.

В условиях тех же клеток реакция гидролиза АТФ (4.65) имеет  $\Delta G = -50$  кДж/моль, т. е. способна играть роль сопрягающей по отношению к синтезу сахарозы. Фактически эти процессы протекают через фосфорилирование глюкозы в положение 1 под действием АТФ и последующее взаимодействие глюкозо-1-фосфата с фруктозой, так что общим продуктом по схеме (4.64) оказывается вода:



Для первой ступени процесса  $\Delta G_1 = -23,9$  кДж/моль, для второй  $\Delta G_2 \approx 0$ , т. е. каждая из этих реакций оказывается термодинамически возможной, а в целом они приводят к протеканию эндэргонического синтеза сахарозы в результате экзэргонического гидролиза АТФ. С точки зрения термодинамических расчетов несущественно, через какие конкретные стадии протекает перенос фосфатных групп на глюкозу. Известно, что в синтезе сахарозы непосредственно участвуют уридинфосфаты УТФ и УДФ, однако они, в свою очередь, образуются фосфорилированием под действием АТФ:



В заключение рассмотрим вопрос о регенерации соединений с макроэргическими связями, поскольку очевидно, что в клетках должны существовать процессы, в которых некоторые другие экзэргонические процессы сопрягаются с обратной гидролизу реакцией фосфорилирования АДФ и АМФ, приводящей к АТФ. Показано, что в биохимических системах перенос фосфатной группы с регенерацией АТФ способны осуществлять такие ее доноры, как 1,3-дифосфоглицерат и фосфоенолпируват, для которых  $\Delta G^0$  гидролиза равны соответственно  $-49,4$  кДж/моль и  $-62,0$  кДж/моль. В свою очередь, АТФ способен фосфорилировать некоторые другие вещества, давая, например, креатинфосфат и аргининфос-

фат, служащие фосфагенам (общее название соединений с макроэргическими фосфатными связями) в животных клетках.

Общим источником свободной энергии для живых клеток являются процессы окисления (для аэробных организмов), поскольку перенос электронов в дыхательной цепи с образованием  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  протекает ступенчато и сопряжен с образованием высокоэнергетических фосфатов. В анаэробных условиях источником свободной энергии оказываются другие реакции, идущие с достаточно большим отрицательным значением  $\Delta G$ , например гликолиз и другие виды брожения. Фотосинтезирующие организмы для осуществления эндэргонических процессов способны использовать поглощенные кванты солнечной энергии, запасаемые с помощью хлорофилла, бактериородопсина и других веществ.



В этой главе изложены лишь принципиальные основы биохимической реализации термодинамически сопряженных реакций. В реальных биохимических системах — живых клетках — сопряженные процессы протекают согласованно во вполне определенных клеточных структурах в результате взаимосогласованного действия полиферментных систем, как правило, с участием кофакторов. Рассмотрение конкретных примеров таких процессов не дается в этой главе, поскольку они уже достаточно подробно обсуждались в первой части (см., например, § 1.5, § 2.3, § 3.2 и др.).

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как найти тепловой эффект биохимической реакции, если имеются данные о количественном составе равновесных смесей при различных температурах?

2. В каких условиях изменение свободной энергии Гиббса в биохимической реакции совпадает со стандартным  $\Delta G^\circ$ ? В каких случаях  $\Delta G$  оказывается а) больше, б) меньше, чем  $\Delta G^\circ$ ?

3. Насколько изменится стандартная энергия образования аниона оксалата в водном растворе при переходе от ацетатного (pH 4,7) к фосфатному (pH 7,2) буферу?

4. Какова будет концентрация АДФ в водном растворе, если в экспериментах по гидролизу АТФ *in vitro* начальная концентрация АТФ составляла  $1,0 \cdot 10^{-3}$  моль/л?

5. Может ли эндэргоническая реакция быть экзотермической и наоборот экзэргоническая — эндотермической? Почему?

6. В каких случаях можно утверждать, что самопроизвольными могут быть только экзотермические процессы?

7. Какова связь между средством, свободной энергией, химическим потенциалом и некомпенсированной теплотой?

8. Может ли протекать биохимическая реакция, для которой стандартное изменение свободной энергии равно нулю?

9. Можно ли осуществить эндорганическую биохимическую реакцию в одном из отделений сосуда, разделенного полупроницаемой перегородкой (мембраной), пропускающей только воду и неорганические ионы, если в другом отделении будет протекать гидролиз соединения с макроэргическими связями? Что изменится, если отделения сосуда соединить электропроводным мостиком?

10. Каков термодинамический смысл: а) возникновения дыхательной цепи у аэробов, б) существования в клетках не только АТФ, но и других фосфагенов?

## Глава 5. ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Применение термодинамических закономерностей к биотехнологическим системам представляет несомненный теоретический и практический интерес. Достаточно сказать, что на основе стехиометрических закономерностей следует составлять материальный баланс основной стадии процесса — ферментации или ферментативного превращения, а по материальному балансу относительно несложно построить и тепловой баланс, т. е. определить изменение энтальпии и теплоту процесса в заданном режиме. Эти расчеты используются далее при проектировании промышленного производства.

С теоретической точки зрения интересным представляется вопрос об энергетической эффективности потребления субстратов клетками микроорганизмов и оценка на этой основе целесообразности осуществления тех или иных процессов. Хотя прямые расчеты изменения свободной энергии в микробиологических процессах затруднены отсутствием сведений о свободной энергии биомассы и многих продуктов, ряд выводов может быть сделан уже из общих соображений при использовании методов термодинамики необратимых процессов применительно к популяции микроорганизмов или культурам клеток.

В данной главе рассмотрено и проиллюстрировано примерами практическое приложение законов и положений химической термодинамики к отдельным клеткам или популяциям как системам более сложного уровня по сравнению с ферментативными биохимическими реакциями, которым была посвящена предыдущая глава.

### § 5.1. Стехиометрия и материальные балансы микробиологических процессов

Любой процесс, включающий в качестве основной стадии химическое превращение, может быть описан так называемым стехиометрическим уравнением, связывающим массы исходных веществ и продуктов и основанным на законе сохранения массы.

Стехиометрическое уравнение простой химической реакции имеет вид (4.11) и записывается в виде суммы произведений стехиометрических коэффициентов на молекулярные массы реагентов, причем стехиометрические коэффициенты учитывают количество молей каждого из веществ, вступающих во взаимодействие или образующихся в его результате. В первом случае коэффициентам приписывают знак «минус», тогда как стехиометрические коэффициенты продуктов считают положительными.

Аналогичным образом поступают при описании сложных химических и биохимических реакций, хотя в этом случае брутто-коэффициенты могут учитывать протекание сразу нескольких простых стадий в составе общего сложного процесса. Необходимо подчеркнуть, что величина стехиометрического коэффициента для каждого из реагентов определяется из экспериментальных данных об элементном составе всех участников реакции, хотя в большинстве случаев в химии пользуются не прямым экспериментальным определением, а уже имеющимися сведениями о содержании каждого элемента в молекуле данного вещества и его молекулярной массе, дополняя эти данные некоторыми эмпирическими правилами, чаще всего валентностью отдельных элементов. В конечном итоге стехиометрическое уравнение любого химического процесса представляет собой равенство, в левой и правой частях которого массы различных веществ суммируются таким образом, чтобы число атомов (точнее, грамм-атомов) любого элемента слева и справа от знака равенства совпадало.

В принципе подобным уравнением можно описать и любой процесс микробиологического синтеза, поскольку очевидно, что все они состоят из очень большого числа параллельно-последовательных биохимических реакций, каждая из которых безусловно описывается своим единственным и определенным стехиометрическим уравнением.

Если ввести общепринятые для микробиологических процессов обозначения: абсолютно сухая биомасса — АСБ, питательные вещества-субстраты —  $S_i$ , продукты —  $P_j$ , то стехиометрическое уравнение для общего случая, когда популяция микроорганизмов растет за счет потребления основного субстрата и вспомогательных веществ, выделяя при этом ряд продуктов, имеет вид

$$\sum_{i=1}^n \nu_i S_i \longrightarrow \text{АСБ} + \sum_{j=1}^m \nu_j P_j \quad (5.1)$$

Такое уравнение заметно отличается от обычного стехиометрического уравнения по следующим непринципиальным соображениям:

1) поскольку молекулярная масса как понятие не имеет физического смысла для биомассы, то уравнение (5.1) должно включать определенное количество АСБ. Чаще всего для этой цели

используют 1 г биомассы, хотя, вообще говоря, можно провести расчет для любой АСБ, если это вызвано какими-то соображениями;

2) стехиометрические коэффициенты субстратов и продуктов не имеют строго определенного, раз и навсегда заданного значения. Их величина существенно зависит от условий культивирования и может быть найдена только из прямых экспериментальных данных. Заметим, однако, что несмотря на лабильность значений  $v_i$  и  $v_j$ , в каждом конкретном случае процесс описывается строго определенным набором стехиометрических коэффициентов, которые в целом обеспечивают строгое выполнение уравнения (5.1) для данного режима.

Таким образом, для составления стехиометрического уравнения при биосинтезе необходимо знать не только состав потребляемых исходных веществ, элементный состав биомассы и состав образующихся в заданном режиме продуктов, но и количественные характеристики, которые обычно представляют в виде так называемых расходных коэффициентов для субстратов и коэффициентов выхода для продуктов.

Расходные коэффициенты представляют собой отношение массы потребленного субстрата  $\Delta S_i$  к приросту биомассы, однако на практике чаще используют обратную величину ( $Y$ ), которую называют экономическим коэффициентом по данному исходному веществу. Вводя обозначение прироста АСБ через  $\Delta X$ , получим

$$Y_i = \left| \frac{\Delta X}{\Delta S_i} \right|. \quad (5.2)$$

Интегральное значение экономического коэффициента легко находится из экспериментов, в которых измеряют прирост биомассы (АСБ) и потребление субстратов за определенный отрезок времени.

Коэффициенты выхода продуктов  $\alpha_j$  рассчитывают, находя в тех же экспериментах изменение содержания продукта за то же время

$$\alpha_j = \left| \frac{\Delta P_j}{\Delta S_i} \right|. \quad (5.3)$$

При этом обычно все  $\alpha_j$  относят к одному субстрату, чаще всего к источнику углерода. Понятно, что в таких опытах можно не определять выделение диоксида углерода и воды (для аэробных процессов), поскольку  $\alpha_{CO_2}$  и  $\alpha_{H_2O}$  легко найти из самого стехиометрического уравнения (5.1) на основе закона сохранения массы.

Отличия уравнения (5.1) от обычной для химии стехиометрической зависимости объясняются, как известно, тем, что любые клетки осуществляют одновременно анаболические и катаболические

еские процессы, причем первые из них необходимы, потому что именно они приводят к биосинтезу всех структур клетки и некоторых важных продуктов (экзоферментов, например), но многие из анаболических реакций — эндэргонические. Это обстоятельство вынуждает клетку одновременно вести катаболические процессы (при дыхании, скажем, простое окисление источника углерода до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ), запасая выделяющуюся при этом свободную энергию и используя ее для сопряженного осуществления эндэргонических стадий анаболизма.

Попадая в различные внешние условия, которые характеризуются соответствующими значениями концентрации субстратов и других веществ среды, температуры, давления и pH, клетка вынуждена в большей или меньшей степени потреблять источник углерода на энергетические цели, что определяется активностью и устойчивостью ферментов биосинтеза в заданном режиме существования популяции. Тем не менее, существует, очевидно, некоторый абсолютный минимум потребления источника углерода и других исходных веществ, определяемый законом сохранения массы. Для накопления биомассы этот абсолютный минимум определяется выражением

$$\sum_{i=1}^n v_i' S_i \rightarrow \text{АСБ} + \sum_{j=1}^m v_j' P_j' \quad (5.4)$$

Понятно, что такой процесс не может существовать реально, т. к. будет эндэргоническим, но он отражает стехиометрию анаболических процессов, рассматриваемых как единое целое. А в тех случаях, когда параллельно или последовательно с ростом образуются и другие продукты  $P_j''$ , стехиометрическое выражение (5.4) должно быть дополнено

$$\sum_{i=1}^n v_i'' S_i \rightarrow \sum_{j=1}^m v_j'' P_j'' \quad (5.5)$$

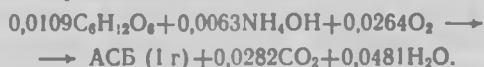
Разность между эмпирическим стехиометрическим уравнением (5.1) и выражениями частичного баланса (5.4) и (5.5) составляет стехиометрическое описание чисто катаболических реакций

$$\sum_{i=1}^n v_i''' S_i \rightarrow v'''_{\text{CO}_2} \cdot \text{CO}_2 + v'''_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \text{H}_2\text{O} + \dots \quad (5.6)$$

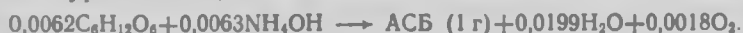
Для сложных субстратов уравнение (5.6) может учитывать и иные продукты, но в простейшем случае для аэробных процессов продуктами оказываются только диоксид углерода и вода. Напротив, в анаэробных процессах выражение (5.6) может не иметь смысла, поскольку, например, при брожении источником свободной энергии является разрушение субстрата — глюкозы — по уравнению типа (5.5). Рассмотрим стехиометрию некоторых микробиологических процессов на примерах.

По литературным данным, элементный состав абсолютно сухой биомассы микроорганизмов определяется природой микроорганизмов и практически одинаков для всех дрожжей, всех бактерий и т. д. Так, АСБ дрожжей содержит по массе 46,0% углерода, 6,8% водорода, 8,8% азота, 33,1% кислорода и 5,3% золы, что соответствует простейшей формуле  $\text{C}_{\text{H}_{1,78}\text{N}_{0,16}\text{O}_{0,54}}$ . Элементный анализ бактерий дает среднее содержание по массе углерода 48,2%, водорода 7,2, азота 9,7, кислорода 27,4, золы 7,5%, т. е. биомасса имеет простейшую брутто-формулу  $\text{C}_{\text{H}_{1,79}\text{N}_{0,17}\text{O}_{0,43}}$ .

Многочисленные исследования аэробного роста дрожжей рода *Candida* на глюкозе показали, что максимальное значение экономического коэффициента в этом случае составляет 0,51, т. е. на 1 г АСБ тратится 1,95 г глюкозы, а продуктами оказываются практически исключительно  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Это позволяет записать стехиометрическое уравнение биосинтеза (для приведенного выше среднего состава дрожжей):



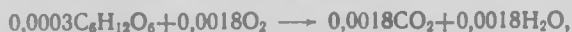
Минимальный расчетный расход глюкозы на построение биомассы — уравнение (5.4):



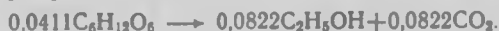
Появление в правой части этого формального уравнения воды и кислорода объясняется просто различным элементным составом источника углерода — глюкозы и биомассы. Уравнение (5.5), дополняющее зависимость (5.4) до стехиометрической, имеет в этом случае вид



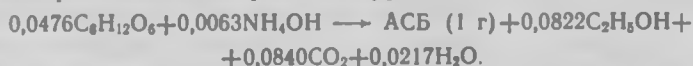
Анаэробный процесс превращения глюкозы дрожжами в этиловый спирт и  $\text{CO}_2$  приводит к накоплению 21 г АСБ при превращении 1 моль глюкозы. Минимальное расходное уравнение (5.4) остается таким же, как приведено выше, однако отсутствие кислорода в числе продуктов брожения указывает, что часть глюкозы окисляется, очевидно, до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ :



а остальная превращается в этанол и  $\text{CO}_2$ :

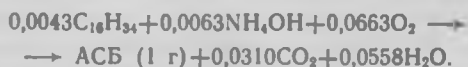


Суммарное стехиометрическое уравнение имеет вид



Для сравнения рассмотрим стехиометрическое описание важнейшего промышленного процесса производства белка однокле-

точных выращиванием кормовых дрожжей на жидких парафинах. На примере гексадекана  $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$  показано, что экономический коэффициент достигает в этом случае значения  $Y=1,03$ . С учетом молекулярной массы  $n$ -гексадекана и среднего состава биомассы дрожжей получаем стехиометрические уравнения



При этом формальное уравнение минимального расхода имеет вид



а доля гексадекана, подвергающаяся окислению, определяется выражением



Стехиометрические уравнения микробиологических процессов позволяют найти расходные коэффициенты по вспомогательным веществам и теоретические выходы продуктов. Так, при аэробном культивировании дрожжей на глюкозе расход кислорода составляет  $0,0264 \cdot 32 = 0,845$  г на 1 г АСБ, а выход диоксида углерода —  $0,0282 \cdot 44 = 1,24$  г на 1 г АСБ. Для культивирования на  $n$ -гексадекане соответствующие величины составляют  $0,0663 \cdot 32 = 2,12$  г кислорода на 1 г АСБ и  $0,0310 \cdot 44 = 1,36$  г  $\text{CO}_2$  на 1 г АСБ.

Стехиометрическое уравнение позволяет ответить еще на один важнейший для промышленной практики вопрос: каков тепловой эффект брутто-процесса ферментации? В соответствии с законом Гесса тепловой эффект  $\Delta H$  может быть рассчитан по теплотам сгорания биомассы  $(\Delta H_{\text{сг}})_{\text{АСБ}}$ , исходных веществ  $(\Delta H_{\text{сг}})_s$  и продуктов  $(\Delta H_{\text{сг}})_p$ :

$$\Delta H = \sum_{i=1}^n v_i (\Delta H_{\text{сг}})_s - (\Delta H_{\text{сг}})_{\text{АСБ}} - \sum_{j=1}^m v_j (\Delta H_{\text{сг}})_p. \quad (5.7)$$

В ответственных случаях теплоту сгорания абсолютно сухой биомассы находят экспериментально калориметрическими методами. Для приближенных расчетов можно с достаточной точностью принимать, что теплота сгорания определяется видом микроорганизмов. Для клеток дрожжей среднее значение  $\Delta H_{\text{сг}}$  составляет  $-20,4$  кДж/г АСБ, для бактерий эта величина равна  $-21,0$  кДж/г АСБ.

В термохимических расчетах обычно используют не теплоты сгорания, а стандартные теплоты образования реагентов  $\Delta_f H^0_{298}$ , которые невелики по абсолютной величине, что увеличивает точность расчета. В микробиологических процессах соответствующие

### 5.1. Тепловой эффект (в кДж/г АСБ) аэробного культивирования дрожжей и бактерий в различных средах

| Тепловой эффект | Дрожжи  |        |        |                                   | Бактерии |         |
|-----------------|---------|--------|--------|-----------------------------------|----------|---------|
|                 | Глюкоза | Этанол | Ацетат | и-С <sub>10</sub> H <sub>24</sub> | Метан    | Метанол |
| Расчет          | —11,02  | —18,60 | —19,48 | —24,85                            | —34,19   | —35,91  |
| Эксперимент     | —9,97   | —18,44 | —19,90 | —26,19                            | —        | —34,90  |

расчетное уравнение имеет вид

$$\Delta H_{298}^0 = \sum_{j=1}^m \nu_j (\Delta_f H_{298}^0)_p + (\Delta_f H_{298}^0)_{\text{АСБ}} - \sum_{i=1}^n \nu_i (\Delta_f H_{298}^0)_s. \quad (5.8)$$

Условная величина теплоты образования биомассы дрожжей и бактерий может быть вычислена по известным данным о теплотах сгорания на основании стехиометрических уравнений, если известны тепловые эффекты процессов. Используя литературные данные по теплотам микробиологического синтеза на различных субстратах, можно показать, что условная теплота образования абсолютно сухой биомассы дрожжей и бактерий  $\Delta_f H_{298}^0$  колеблется от —2,72 до —2,76 кДж/г АСБ. Этой величиной удобно пользоваться в расчетах, которые показывают вполне удовлетворительное совпадение с экспериментом, как это видно из приведенных данных в табл. 5.1.

Для сравнения укажем, что тепловой эффект при спиртовом брожении составляет —0,75 кДж/г АСБ для дрожжей, а при гликолизе — 1,88 кДж/г АСБ для бактерий.

### § 5.2. Энергетическая эффективность процессов микробиологического синтеза

Значительные различия между минимальным — по закону сохранения массы — и фактическим расходом субстрата в микробиологических процессах, т. е. несовпадение уравнений (5.4) и (5.1), представляют основную трудность не только при стехиометрическом, но и при энергетическом описании процессов биотехнологии. Действительно, хотя ясно, что «перерасход» субстрата — источника углерода и энергии по сравнению с минимумом является неизбежным следствием того, что многие анаболические реакции эндергоничны по своей природе и протекают только как сопряженные, затруднительно ответить на вопрос, какое именно количество свободной энергии необходимо клеткам для покрытия энергетических затрат на биосинтез, включая и так называемые затраты на поддержание.

Этой проблемы прямо или косвенно коснулось большое число исследователей, предложивших разные подходы к ее решению, но, к сожалению, большинство из них не делают разницы между

энергией вообще и свободной энергией Гиббса. Ни у кого, по-видимому, не возникает сомнений в том, что микробиологический процесс, в результате которого субстрат и вспомогательные вещества превращаются в биомассу вследствие утилизации клетками и их деления, не может идти по типу химической реакции со стехиометрией типа (5.4). Тем не менее, имеются публикации, авторы которых уверены, что теплоты сгорания субстрата и биомассы определяют энергетику микробного синтеза, и даже допускают, что в «оптимальном» режиме вся «энергия» субстрата, измеряемая теплотой его полного окисления, может перейти в такую же «энергию» биомассы. Часто эти взгляды основывают на известных с 30-х годов данных о том, что изменение энтальпии (тепловой эффект) при окислении органических соединений, отнесенное к количеству связей С—О и Н—О, возникших в ходе окисления, приблизительно постоянно и мало зависит от природы субстрата.

В первом приближении можно считать, что теплота сгорания пропорциональна так называемому числу доступных электронов, т. е. тому количеству валентных электронов, принадлежащих атомам углерода и водорода, которые образуют связи с атомами кислорода (переносятся на кислород) при сгорании. Расчет этой величины исходит из эмпирической формулы соединения  $C_nH_mO_p$  и по правилу «число доступных электронов» равно  $4m + n - 2p$ .

Таким образом, у гексадекана  $C_{16}H_{34}$ , например, это число равно  $4 \cdot 16 + 34 = 98$ , а для биомассы дрожжей состава  $CH_{1,78}O_{0,54}$  (без учета азота) —  $4 + 1,78 - 2 \cdot 0,54 = 4,7$ . Допущение о том, что сохранение энергии достигается при полном перенесении «химической энергии» субстрата на биомассу, сводится к тому, чтобы теплота сгорания биомассы и минимально необходимого количества субстрата совпадали. Это означает, что на 22,4 г биомассы ( $12 + 1,78 + 0,54 \cdot 16$ ) должно приходиться  $4,7 \cdot 226 / 98 = 10,8$  г гексадекана, т. е. именно это его количество содержит доступных электронов столько же, сколько их найдено для биомассы.

На основании таких расчетов делается вывод о том, что минимально необходимый расход гексадекана при культивировании дрожжей составляет  $10,8 / 22,4 = 0,48$  г/г АСБ, а реальная величина  $1/Y = 1/1,03 = 0,97$  г/г АСБ завышена вследствие «непроизводительных» затрат субстрата, причем «энергетический» КПД биосинтеза составляет  $0,48 / 0,97 = 0,49$ , т. е. 49%. Обращает на себя внимание в первую очередь тот факт, что рассчитанный таким образом минимальный расход субстрата — 0,48 г/г АСБ — меньше даже стехиометрически необходимого  $0,0023 \cdot 226 = 0,52$  г/г АСБ, т. е. противоречит закону сохранения массы.

Другим очевидным недостатком рассуждений об энергетическом КПД является противоречие опыту органической химии. Легко проверить, что для любой органической реакции правило

сохранения числа доступных электронов выполняется автоматически (газообразному кислороду надо при этом приписать —4 доступных электрона), однако никто не берет на себя смелость утверждать, что при этом сохраняется и энергия, понимаемая как сумма теплот сгорания. Действительно, такое абсурдное требование означало бы, что тепловые эффекты всех органических реакций должны быть равны нулю.

С термодинамической точки зрения такой подход, на котором основано вычисление энергетического КПД микробиологического синтеза, представляет собой попытку использовать закон сохранения энергии при полном пренебрежении вторым началом термодинамики. Естественно, приводимые в литературе оценки энергетического КПД по этому методу дают значения расходных коэффициентов по сырью, резко заниженные по сравнению с реальными.

Определенный интерес представляют работы, где дается оценка возможного расхода энергетического субстрата на основании сведений о биохимических путях его превращения в катаболических процессах. Так, в результате исследований по биохимии дыхательной цепи установлено, что окисление глюкозы сопровождается накоплением 38 моль АТФ на 1 моль превращенной глюкозы:



а гликолиз или спиртовое брожение приводят к появлению лишь 2 моль АТФ на 1 моль превращенной глюкозы:



К сожалению, точных сведений о расходе АТФ в эндэргонических реакциях синтеза пока недостаточно, имеются лишь приближенные брутто-оценки расхода АТФ на биосинтез 1 г биомассы (0,09—0,1 моль АТФ на 1 г АСБ). Очевидно, последнее затрудняет расчеты и делает их сугубо оценочными. По мере расширения наших знаний о механизме биосинтеза клеточных структур такой подход будет представлять все больший практический интерес.

В настоящее время имеются лишь ограниченные возможности энергетического описания процесса микробиологического синтеза как целого. Одна из трудностей здесь заключается в невозможности в большинстве случаев получить сведения о текущих концентрациях реагентов в клетках, что приводит к необходимости давать оценки на основании стандартного  $\Delta G^0$ .

Прежде всего, можно поставить вопрос об эффективности утилизации клетками свободной энергии, высвобождающейся при протекании катаболических процессов. В частности, если при

аэробном росте на глюкозе накопление АТФ идет по схеме (5.9), то рассчитанная ранее для окисления глюкозы величина  $\Delta G^0 = -2873,7$  кДж/моль должна быть соотнесена с накоплением в этом процессе 38 моль АТФ. Таким образом, на синтез 1 моль АТФ «расходуется»  $-2873,7/38 = -75,6$  кДж/моль АТФ. Процесс гликолиза оказывается — уравнение (5.10) — в этом смысле более «экономичным». При общем  $\Delta G^0 = -133,1$  кДж/моль накапливается 2 моль/АТФ, т. е. на каждый из них затрачено  $-133,1/2 = -66,5$  кДж/моль АТФ. Напротив, спиртовое брожение протекает по уравнению (5.11) с выделением  $\Delta G^0 = -230,5$  кДж/моль; таким образом, на 1 моль АТФ выделяется  $-115,2$  кДж/моль АТФ.

Разбиение стехиометрического уравнения (5.1) на две части, условно описывающие анаболические и катаболические процессы — уравнения (5.4) и (5.6) — позволяет использовать последнее уравнение для нахождения меры эффективности затрат свободной энергии на биосинтез. Независимо от конкретных путей анаболизма и катаболизма для термодинамических расчетов можно считать, что минимальное расходное уравнение (5.4) описывает брутто-стехиометрию всех процессов синтеза, приводящих к образованию биомассы. К сожалению, провести расчет изменения свободной энергии для этого уравнения не представляется возможным из-за отсутствия данных по энтропии или свободной энергии образования биомассы. Тем не менее, субстрат—источник энергии, израсходованной по уравнению (5.6), — подвергся превращению в диоксид углерода и воду по вполне определенным реакциям (дыхание, брожение и т. п.), в ходе которых протекали сопряженные процессы накопления макроэргических соединений. Таким образом, даже не рассматривая конкретного количества, например АТФ, синтезированного в катаболических процессах, можно утверждать, что свободная энергия, выделившаяся при катаболизме, была закономерно превращена клеткой в макроэргические соединения и далее использована в эндэргонических стадиях анаболизма.

Приведенные выше рассуждения позволяют сделать вывод о том, что изменение свободной энергии по реакции (5.6) является характеристикой всей совокупности метаболических путей для данных клеток в заданных условиях, и эта характеристика показывает, какое количество свободной энергии, выделившейся при катаболизме, «имели в своем распоряжении и роста популяции. Результаты подобных расчетов для различных случаев приведены в табл. 5.2.

Табл. 5.2 иллюстрирует, насколько велики различия в эффективности использования той свободной энергии, которая высвобождалась и была частично утилизирована клетками в катаболических реакциях. Это может быть следствием неэффективности

5.2. Удельный расход свободной энергии на биосинтез при росте микроорганизмов на различных субстратах

| Расход                                  | Дрожжи         |            |                        |           |          |      | Бактерии |            |
|-----------------------------------------|----------------|------------|------------------------|-----------|----------|------|----------|------------|
|                                         | дыхание        |            |                        | брожение  |          |      | дыхание  |            |
|                                         |                |            |                        | спиртовое | глюколиз |      |          |            |
|                                         | $C_6H_{12}O_6$ | $CH_3COOH$ | $n C_{12}H_{22}O_{11}$ | глюкоза   |          |      | $CH_3OH$ | $C_2H_5OH$ |
| Субстрата, г/г АСБ                      |                |            |                        |           |          |      |          |            |
| общий                                   | 1,47           | 2,78       | 1,23                   | 1,96      | 7,46     | 7,26 | 2,44     | 0,80       |
| на катаболизм                           | 0,61           | 1,55       | 0,71                   | 0,85      | 6,35     | 6,15 | 1,15     | 0,20       |
| Удельный $\Delta G_y^\circ$ , кДж/г АСБ | -17,5          | -22,5      | -32,4                  | -13,6     | -9,3     | -5,3 | -25,2    | -18,0      |

самого катаболизма, когда при том же количестве окисленного субстрата выход АТФ или других микроэргических соединений неодинаков. Известно, например, что при спиртовом брожении дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* используют путь Эмбдена—Мейергофа и накапливают 21 г биомассы на 1 моль сброженной глюкозы, тогда как бактерии *Zytoplas mobilis* превращают глюкозу по пути Энтнера—Дудорова, сбраживая то же количество субстрата с образованием 8,6 г АСБ, что дает величину удельного расхода свободной энергии —25,3 кДж/г АСБ по сравнению с —9,3 кДж/г АСБ в первом случае.

Данные табл. 5.2 ясно показывают также, что единственным мерилем энергетической эффективности любого процесса биосинтеза является удельный расход субстрата. Чем меньше эта величина, тем «лучше» протекает метаболизм и биосинтез в целом. Этот вывод основан на том, что в любых условиях для определенной культуры расход субстрата на построение клеточных структур — уравнение (5.4) — не меняется, т. к. не меняется элементный состав биомассы. Все колебания общего расхода и экономического коэффициента объясняются возрастанием или уменьшением расходов на энергетическое обеспечение эндэргонических реакций, необходимых для синтеза клеточных структур при делении или для поддержания клетки в жизнеспособном состоянии. Неоптимальный подбор условий культивирования потребует увеличения расхода субстрата на энергетическое обеспечение синтеза и на поддержание. Приближение к оптимальному режиму приведет к снижению нецелесообразных энергетических расходов и, как следствие, — к росту экономического коэффициента. Этот вывод подтверждается экспериментальными данными о росте расходных коэффициентов по сырью при культивировании микр-

микроорганизмов в отличающихся от оптимума условиях: рН среды, температура и т. д.

Другой вариант описания энергетики микробиологических процессов основан на использовании уравнения  $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$  для расчетов по стехиометрической зависимости (5.1). Нахождение теплового эффекта — изменения энтальпии  $\Delta H^0$  — для процессов микробиологического синтеза описано выше и не представляет труда. Проблема заключается в этом случае в нахождении  $\Delta S^0$ , поскольку процесс заведомо необратим, а сведений по энтропии биомассы в литературе нет. Представляется возможным тем не менее дать оценку общего изменения энтропии  $\Delta S^0$  на основании стехиометрического уравнения (5.1) и табличных данных по абсолютным энтропиям всех субстратов и продуктов, кроме биомассы. В приведенных ниже расчетах не принималось во внимание также превращение источника азота в азот биомассы, т. к. данные по абсолютной энтропии  $\text{NH}_3$  в водном растворе ненадежны, а содержание азота в биомассе очень невелико, и им допустимо пренебречь. В приведенных ниже уравнениях в левой части опущено 0,0063 и 0,0069 моль  $\text{NH}_4\text{OH}$  соответственно для дрожжей и бактерий; в правой части следовало бы добавить 0,0158 и 0,0173 моль  $\text{H}_2\text{O}$ .

Приведенные в табл. 5.3 расчеты при всей их заведомой неточности позволяют сделать некоторые выводы. Прежде всего обращает на себя внимание отрицательное значение  $\Delta G^0$  во всех без исключения случаях. Следует учесть при этом, что в расчет не включали неизвестную абсолютную энтропию биомассы, которая тем не менее очевидно, положительна, т. е. оценка  $\Delta G^0$  в табл. 5.3 занижена по абсолютной величине.

Второе, что обращает на себя внимание при рассмотрении табл. 5.3, это некоторая связь полученной оценки  $\Delta G^0$  с частотой встречаемости данного типа процессов. Относительно небольшие величины  $\Delta G^0$  характерны для роста микроорганизмов на глюкозе (в вариантах дыхания и брожения) и на этаноле. Отметим, что большое количество видов способно использовать глюкозу в качестве единственного источника углерода и энергии. Уместно также вспомнить о существовании известного явления катаболической репрессии, когда потребление глюкозы предпочтительно по сравнению со всеми другими субстратами.

Дрожжи, утилизирующие алканы, уксусную кислоту, а также бактерии-метилотрофы, встречаются реже, чем микроорганизмы, растущие на глюкозе и этаноле. Для первых характерно несколько более высокое отрицательное значение  $\Delta G^0$  (от  $-25$  до  $-35$  кДж/г АСБ). Совсем редко встречаются культуры, способные расти на изопропаноле. Для водородных бактерий, живущих в специфических условиях, оценка изменения свободной энергии  $\Delta G^0$  также дает большую отрицательную величину. Не преуве-

5.2. Удельный расход свободной энергии на биосинтез при росте микроорганизмов на различных субстратах

| Расход                                  | Дрожжи         |            |                  |            |           |      | Бактерии |          |
|-----------------------------------------|----------------|------------|------------------|------------|-----------|------|----------|----------|
|                                         | дыхание        |            |                  | брожение   |           |      | дыхание  |          |
|                                         |                |            |                  | спирт-овое | глюко-лиз |      |          |          |
|                                         | $C_6H_{12}O_6$ | $CH_3COOH$ | $n-C_{12}H_{24}$ | глюкоза    |           |      | $CH_3OH$ | $C_4H_8$ |
| Субстрата, г/г АСБ                      |                |            |                  |            |           |      |          |          |
| общий                                   | 1,47           | 2,78       | 1,23             | 1,96       | 7,46      | 7,26 | 2,44     | 0,96     |
| на катаболизм                           | 0,61           | 1,55       | 0,71             | 0,85       | 6,35      | 6,15 | 1,15     | 0,37     |
| Удельный $\Delta G_y^\circ$ , кДж/г АСБ | -17,5          | -22,5      | -32,4            | -13,6      | -9,3      | -5,3 | -25,2    | -18,7    |

самого катаболизма, когда при том же количестве окисленного субстрата выход АТФ или других микроэргических соединений неодинаков. Известно, например, что при спиртовом брожении дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* используют путь Эмбдена—Мейергофа и накапливают 21 г биомассы на 1 моль сброженной глюкозы, тогда как бактерии *Zyotomonas mobilis* превращают глюкозу по пути Энтнера—Дудорова, сбраживают то же количество субстрата с образованием 8,6 г АСБ, что дает величину удельного расхода свободной энергии —25,3 кДж/г АСБ по сравнению с —9,3 кДж/г АСБ в первом случае.

Данные табл. 5.2 ясно показывают также, что единственным мериллом энергетической эффективности любого процесса биосинтеза является удельный расход субстрата. Чем меньше эта величина, тем «лучше» протекает метаболизм и биосинтез в целом. Этот вывод основан на том, что в любых условиях для определенной культуры расход субстрата на построение клеточных структур — уравнение (5.4) — не меняется, т. к. не меняется элементный состав биомассы. Все колебания общего расхода и экономического коэффициента объясняются возрастанием или уменьшением расходов на энергетическое обеспечение эндэргонических реакций, необходимых для синтеза клеточных структур при делении или для поддержания клетки в жизнеспособном состоянии. Неоптимальный подбор условий культивирования потребует увеличения расхода субстрата на энергетическое обеспечение синтеза и на поддержание. Приближение к оптимальному режиму приведет к снижению нецелесообразных энергетических расходов и, как следствие, — к росту экономического коэффициента. Этот вывод подтверждается экспериментальными данными о росте расходных коэффициентов по сырью при культивировании

микроорганизмов в отличающихся от оптимума условиях: pH среды, температура и т. д.

Другой вариант описания энергетики микробиологических процессов основан на использовании уравнения  $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$  для расчетов по стехиометрической зависимости (5.1). Нахождение теплового эффекта — изменения энтальпии  $\Delta H^0$  — для процессов микробиологического синтеза описано выше и не представляет труда. Проблема заключается в этом случае в нахождении  $\Delta S^0$ , поскольку процесс заведомо необратим, а сведений по энтропии биомассы в литературе нет. Представляется возможным тем не менее дать оценку общего изменения энтропии  $\Delta S_{\text{в}}^0$  на основании стехиометрического уравнения (5.1) и табличных данных по абсолютным энтропиям всех субстратов и продуктов, кроме биомассы. В приведенных ниже расчетах не принималось во внимание также превращение источника азота в азот биомассы, т. е. данные по абсолютной энтропии  $\text{NH}_3$  в водном растворе ненадежны, а содержание азота в биомассе очень невелико, и им допустимо пренебречь. В приведенных ниже уравнениях в левой части опущено 0,0063 и 0,0069 моль  $\text{NH}_4\text{OH}$  соответственно для дрожжей и бактерий; в правой части следовало бы добавить 0,0158 и 0,0173 моль  $\text{H}_2\text{O}$ .

Приведенные в табл. 5.3 расчеты при всей их заведомой неточности позволяют сделать некоторые выводы. Прежде всего обращает на себя внимание отрицательное значение  $\Delta G^0$  во всех без исключения случаях. Следует учесть при этом, что в расчет не включали неизвестную абсолютную энтропию биомассы, которая тем не менее очевидно, положительна, т. е. оценка  $\Delta G^0$  в табл. 5.3 занижена по абсолютной величине.

Второе, что обращает на себя внимание при рассмотрении табл. 5.3, это некоторая связь полученной оценки  $\Delta G^0$  с частотой встречаемости данного типа процессов. Относительно небольшие величины  $\Delta G^0$  характерны для роста микроорганизмов на глюкозе (в вариантах дыхания и брожения) и на этаноле. Отметим, что большое количество видов способно использовать глюкозу в качестве единственного источника углерода и энергии. Уместно также вспомнить о существовании известного явления катаболической репрессии, когда потребление глюкозы предпочтительно по сравнению со всеми другими субстратами.

Дрожжи, утилизирующие алканы, уксусную кислоту, а также бактерии-метилотрофы, встречаются реже, чем микроорганизмы, растущие на глюкозе и этаноле. Для первых характерно несколько более высокое отрицательное значение  $\Delta G^0$  (от  $-25$  до  $-35$  кДж/г АСБ). Совсем редко встречаются культуры, способные расти на изопропанолем. Для водородных бактерий, живущих в специфических условиях, оценка изменения свободной энергии  $\Delta G^0$  также дает большую отрицательную величину. Не преуве-

## 5.3. Оценка свободной энергии некоторых процессов биосинтеза

| Тип микро-<br>организма | Субстрат                            | Стехиометрия биосинтеза*                                                                                                                                                    | $\Delta R^0$ в Дж/г<br>АСБ | Оценка $\Delta S_T$<br>(з. е.) | Оценка $\Delta G_T^0$<br>в Дж/г<br>АСБ |
|-------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------------------|
| Дрожжи                  | $n\text{-C}_{12}\text{H}_{24}$      | $0,0043\text{C}_{12}\text{H}_{24} + 0,0616\text{O}_2 \rightarrow \text{АСБ}(1\text{r}) +$<br>$+ 0,0310\text{CO}_2 + 0,0340\text{H}_2\text{O}$                               | -24,8                      | -0,06                          | -24,7                                  |
|                         | $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$     | $0,0289\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 0,0442\text{O}_2 \rightarrow \text{АСБ}(1\text{r}) +$<br>$+ 0,0202\text{CO}_2 + 0,0547\text{H}_2\text{O}$                            | -18,6                      | -0,46                          | -18,0                                  |
|                         | $\text{CH}_3\text{COOH}$            | $0,0258\text{CH}_3\text{COOH} + 0,0440\text{O}_2 \rightarrow \text{АСБ}(1\text{r}) +$<br>$+ 0,0516\text{CO}_2 + 0,0591\text{H}_2\text{O}$                                   | -19,5                      | +2,71                          | -22,9                                  |
|                         | $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4$ | $0,0109\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4 + 0,0217\text{O}_2 \rightarrow \text{АСБ}(1\text{r}) +$<br>$+ 0,282\text{CO}_2 + 0,0323\text{H}_2\text{O}$                         | -11,0                      | +1,58                          | -13,0                                  |
|                         | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ | $0,0477\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{АСБ}(1\text{r}) +$<br>$+ 0,0807\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 0,0872\text{CO}_2 + 0,0107\text{H}_2\text{O}$     | -4,4                       | +9,09                          | -16,1                                  |
|                         | $i\text{-C}_3\text{H}_7\text{OH}$   | $0,0388\text{C}_3\text{H}_7\text{OH} + 0,1357\text{O}_2 \rightarrow \text{АСБ}(1\text{r}) +$<br>$+ 0,0825\text{CO}_2 + 0,1230\text{H}_2\text{O}$                            | -60,1                      | +1,52                          | -62,1                                  |
|                         | $(=\text{CHCOOH})_2$                | $0,0253\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4 + 0,0272\text{O}_2 \rightarrow \text{АСБ}(1\text{r}) +$<br>$+ 0,0602\text{CO}_2 + 0,0171\text{H}_2\text{O}$                           | -13,7                      | +3,66                          | -18,4                                  |
|                         | $\text{CH}_4$                       | $0,0619\text{CH}_4 + 0,0749\text{O}_2 \rightarrow \text{АСБ}(1\text{r}) +$<br>$+ 0,0230\text{CO}_2 + 0,0863\text{H}_2\text{O}$                                              | -34,2                      | -2,82                          | -30,5                                  |
|                         | $\text{CH}_3\text{OH}$              | $0,0781\text{CH}_3\text{OH} + 0,0679\text{O}_2 \rightarrow \text{АСБ}(1\text{r}) +$<br>$+ 0,0377\text{CO}_2 + 0,1197\text{H}_2\text{O}$                                     | -35,9                      | -1,14                          | -35,7                                  |
|                         | $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{O}_6$ | $0,0465\text{C}_4\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{АСБ}(1\text{r}) +$<br>$+ 0,0785\text{CH}_3\text{CHONCOOH} + 0,0065\text{CO}_2 +$<br>$+ 0,0107\text{H}_2\text{O}$ | -4,9                       | +2,04                          | -7,5                                   |
| Бактерии                | $\text{CO}_2, \text{H}_2$           | $0,0493\text{CO}_2 + 0,391\text{H}_2 + 0,1453\text{O}_2 \rightarrow$<br>$\rightarrow \text{АСБ}(1\text{r}) + 0,3550\text{H}_2\text{O}$                                      | -87,2                      | -18,02                         | -64,1                                  |

\* Без учета потребления  $\text{NH}_4\text{OH} - 0,0063$  моль для дрожжей и 0,0660 моль для бактерий.

личивая значения этих выводов, можно полагать, что естественный отбор привел к преимущественному существованию тех микробных культур, популяции которых в наименее возможной степени снижают свободную энергию среды обитания.

В заключение отметим, что все рассмотренные выше приложения термодинамики к процессам биотехнологии определенно доказывают необходимость и целесообразность построения стехиометрических уравнений микробиологических превращений и их использования как научной основы для построения материальных и тепловых балансов, а также для описания энергетики биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов.

### § 5.3. Термодинамическое описание стационарного состояния биотехнологических систем

Одним из важных достижений термодинамики необратимых процессов является описание особых свойств открытых систем, находящихся в стационарном состоянии. Переход таких систем в состояние, когда все параметры остаются неизменными во времени, отмечен уже давно и является экспериментально установленным фактом. При неизменности внешних условий открытые системы приходят в так называемое стационарное состояние, когда концентрация всех компонентов, а также все термодинамические характеристики системы не изменяются во времени. Изменение внешних условий вызывает переход открытой системы из одного стационарного состояния в другое.

Эти принципы могут быть использованы для описания отдельных химических или биохимических реакций, если они осуществляются в проточных реакторах непрерывного действия. Однако особенно интересно их использование для термодинамического объяснения некоторых свойств микробных клеток, популяций и даже более сложных организмов, которые были известны ранее из биологических экспериментов.

Рассмотрим клетку как некоторую открытую систему, в которой протекает последовательная цепь из  $k$  биохимических превращений:



Для существования такой клетки как открытой системы характерно наличие постоянного потока исходного вещества (субстрата)  $S_1$  из внешней среды внутрь системы  $S_{вн} \rightarrow S_{кл}$  и непрерывное удаление конечного продукта метаболизма  $Q$  из клетки во внешнюю среду  $Q_{кл} \rightarrow Q_{вн}$ .

При достижении системой стационарного состояния концент-

раций всех компонентов ( $S_1 \dots Q$ ) внутри клетки будут оставаться постоянными:

$$\frac{d[S]_{\kappa l}}{d\tau} = \frac{d[M]_{\kappa l}}{d\tau} = \dots = \frac{d[Q]_{\kappa l}}{d\tau} = 0.$$

Это возможно только в том случае, когда скорость появления каждого вещества в системе будет равна скорости его расходования. В эту систему равенств должны включаться, естественно, и скорости переноса  $S_1$  и  $Q$ , т. е.  $\frac{d_e[S_1]}{d\tau}$  и  $\frac{d_e[Q]}{d\tau}$ . Из условия стационарности следует

$$\begin{aligned} \frac{d[S_1]_{\kappa\lambda}}{d\tau} &= \frac{d_e[S_1]}{d\tau} - v_1 = 0; \\ \frac{d[M]_{\kappa\lambda}}{d\tau} &= v_1 - v_2 = 0; \\ &\dots\dots\dots \\ \frac{d[Q]_{\kappa\lambda}}{d\tau} &= v_{\kappa} - \frac{d_e[Q]}{d\tau} = 0, \end{aligned} \quad (5.13)$$

причем обозначение обобщенных скоростей по стадиям  $v_i$  отвечает схеме (5.9).

Все протекающие в такой системе процессы связаны, т. е. продукт предыдущей стадии является исходным веществом для последующей, т. е. ко всей системе в целом можно применить неравенство

$$T \frac{d_l S}{d\tau} = \sum_l A_l v_l > 0,$$

из которого получается конкретное выражение

$$A_S \frac{d_e[S_1]}{d\tau} + A_1 v_1 + A_2 v_2 + \dots + A_n v_n + A_Q \frac{d_e[Q]}{d\tau} > 0. \quad (5.14)$$

По условию (5.13) все скорости отдельных стадий равны и могут быть обозначены через  $v$ , тогда из (5.14) следует

$$(A_0 + A_1 + A_2 + \dots + A_k + A_p)v > 0, \quad (5.15)$$

Расчет сродства на каждой из стадий должен производиться по общему правилу: сродство процесса равно разности химических потенциалов исходных веществ и продуктов, тогда

$$\begin{aligned} A_8 &= (\mu_s)_{ss} - (\mu_s)_{ss}; \\ A_7 &= (\mu_g)_{ss} - (\mu_M)_{ss}; \\ . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \\ A_k &= (\mu_p)_{ss} - (\mu_Q)_{ss}; \\ A_O &= (\mu_O)_{ss} - (\mu_O)_{ss}. \end{aligned} \tag{5.16}$$

Проведя суммирование в скобках уравнения (5.15) с учетом (5.16) получим окончательно

$$[(\mu_S)_{\text{вн}} - (\mu_Q)_{\text{вн}}] \nu > 0. \quad (5.17)$$

Это означает, что общее сродство сложной системы последовательных стадий переноса и биохимического превращения в открытой системе (клетке) равно сродству обобщенного процесса

$$S_{\text{вн}} \rightarrow Q_{\text{вн}}, \quad (5.18)$$

заключающегося в превращении субстрата  $S_1$  из внешней среды в продукт  $Q$  во внешней среде.

Из общего выражения изотермы Вант—Гоффа

$$-A_0 = \Delta G = -RT \ln K + RT \ln \frac{\prod_{j=1}^m a_{B_j}^{\nu_j}}{\prod_{i=1}^n a_{A_i}^{\nu_i}}$$

легко найти связь сродства с начальными и конечными концентрациями реагентов:

$$A_0 = RT \ln \left[ K \frac{\prod_{i=1}^n a_{A_i}^{\nu_i}}{\prod_{j=1}^m a_{B_j}^{\nu_j}} \right], \quad (5.19)$$

где  $a_{A_i}^{\nu_i}$  и  $a_{B_j}^{\nu_j}$  — активности исходных веществ и продуктов в стехиометрических степенях.

Для обобщенного процесса (5.18)

$$A_0 = RT \ln \left( K \frac{(a_S)_{\text{вн}}}{(a_Q)_{\text{вн}}} \right), \quad (5.20)$$

т. е. общее сродство процесса однозначно связано с активностями субстрата и продукта во внешней среде. Таким образом, в стационарном состоянии движущая сила превращения — сродство — определяется не только природой реагентов, но и количеством (активностью) исходного вещества и продукта во внешней среде. Это является термодинамическим обоснованием влияния внешней среды на протекание биохимических процессов в открытых системах — клетках, — хорошо известного из прямых биологических экспериментов.

Более подробное рассмотрение стационарных состояний открытых систем позволяет дать представление об особых термо-

динамических свойствах таких состояний. Для этого удобно использовать так называемые феноменологические соотношения, основанные на обобщенных понятиях силы (сродства) и скорости (потока) для сопряженных процессов.

Вводя обозначения силы  $X=A/T$  и скорости (потока)  $I=v$ , получим для любого необратимого процесса

$$\frac{d_i S}{d\tau} = \frac{A}{T} v = XI > 0. \quad (5.21)$$

Если процесс состоит из нескольких сопряженных стадий,  $\frac{d_i S}{d\tau} = \sum X_i I_i$ ; в простейшем случае при двух сопряженных стадиях

$$\frac{d_i S}{d\tau} = X_1 I_1 + X_2 I_2. \quad (5.22)$$

Как уже отмечалось в предыдущей главе, при достижении равновесия движущая сила процесса (сродство) обращается в нуль, поэтому нулевой становится и обобщенная скорость  $v = d\xi/d\tau$ . Следовательно, в равновесном состоянии  $X=0$  и  $I=0$ . При отклонении системы от равновесного состояния процесс описывается уравнением (5.22). В этом случае при достаточно малых отклонениях от равновесия можно показать наличие линейной связи потока (скорости) каждой из стадий с движущими силами

$$\left. \begin{aligned} I_1 &= L_{11}X_1 + L_{12}X_2; \\ I_2 &= L_{21}X_1 + L_{22}X_2. \end{aligned} \right\} \quad (5.23)$$

Коэффициенты в системе уравнений (5.23) называют феноменологическими; очевидно, они определяют характер, глубину взаимосвязи двух сопряженных стадий в общем процессе. Подстановка (5.23) в (5.22) дает выражение

$$d_i S/d\tau = L_{11}X_1^2 + (L_{12} + L_{21})X_1X_2 + L_{22}X_2^2 > 0. \quad (5.24)$$

Доказываемая в развернутых курсах термодинамики необратимых процессов теорема Онзагера утверждает, что для любых двух сопряженных стадий

$$L_{12} = L_{21}, \quad (5.25)$$

т. е. влияние первого процесса на второй, сопряженный с ним, такое же, как и обратное влияние второго процесса на первый. С учетом равенства (5.25) предыдущее неравенство приобретает вид

$$d_i S/d\tau = L_{11}X_1^2 + 2L_{12}X_1X_2 + L_{22}X_2^2 > 0. \quad (5.26)$$

Изменение энтропии, вызванное необратимостью процессов внутри системы  $d_i S$ , входит в (5.26) в виде производной по времени, которую принято называть скоростью ежекундного приращения энтропии. Можно рассмотреть зависимость этой величины от движущих сил отдельных стадий  $X_1$  и  $X_2$ , найдя производные дифференцированием (5.26)

$$\left. \begin{aligned} \frac{\partial}{\partial X_1} \left( \frac{d_i S}{d\tau} \right) &= 2L_{11}X_1 + 2L_{12}X_2 = 2I_1; \\ \frac{\partial}{\partial X_2} \left( \frac{d_i S}{d\tau} \right) &= 2L_{12}X_1 + 2L_{22}X_2 = 2I_2. \end{aligned} \right\} \quad (5.27)$$

При достижении системой стационарного состояния производные всех ее параметров по времени обращаются в нуль, иначе говоря,  $I_1 = 0$  и  $I_2 = 0$ , т. к. степень полноты всех реакций в системе остается неизменной во времени. Система (5.27) определяет в этом случае равенство нулю производных величины  $d_i S/d\tau$  по обобщенным силам  $X_1$  и  $X_2$ , т. е. задает условия экстремума, в данном случае — минимума. Физический смысл этого результата заключается в том, что при заданных движущих силах сопряженных стадий  $X_1$  и  $X_2$  переход открытой системы в стационарное состояние обеспечивает минимум ежесекундного прироста энтропии внутри системы.

Уравнения, аналогичные (5.27), могут быть получены для открытой системы любой сложности, в которой протекают сопряженные процессы. В связи с этим общий вывод заключается в том, что стационарное состояние клетки или организма, биологически определяемое как закон гомеостаза, обеспечивает протекание всех процессов наиболее экономично с точки зрения прироста энтропии внутри системы  $\frac{d_i S}{d\tau} = \min$ . Более того, для неменяющихся во времени феноменологических коэффициентов можно показать, что в стационарном состоянии открытой системы вторая производная  $\frac{d}{d\tau} \left( \frac{d_i S}{d\tau} \right) < 0$ , что обеспечивает стационарному состоянию устойчивость во времени и способность восстанавливаться после небольших случайных возмущений.

С учетом полученных выше результатов представляет интерес рассмотрение внутренних и внешних составляющих прироста энтропии для открытых систем. Если по обозначению, введенному ранее,  $dS = d_e S + d_i S$ , то

$$\frac{dS}{d\tau} = \frac{d_e S}{d\tau} + \frac{d_i S}{d\tau}. \quad (5.28)$$

В стационарном состоянии наряду с прочими параметрами постоянное значение приобретает и энтропия системы, т. е.  $dS/d\tau =$

динамических свойствах таких состояний. Для этого удобно использовать так называемые феноменологические соотношения, основанные на обобщенных понятиях силы (сродства) и скорости (потока) для сопряженных процессов.

Вводя обозначения силы  $X=A/T$  и скорости (потока)  $I=v$ , получим для любого необратимого процесса

$$\frac{d_i S}{d\tau} = \frac{A}{T} v = XI > 0. \quad (5.21)$$

Если процесс состоит из нескольких сопряженных стадий,  $\frac{d_i S}{d\tau} = \sum_i X_i I_i$ ; в простейшем случае при двух сопряженных стадиях

$$\frac{d_i S}{d\tau} = X_1 I_1 + X_2 I_2. \quad (5.22)$$

Как уже отмечалось в предыдущей главе, при достижении равновесия движущая сила процесса (сродство) обращается в нуль, поэтому нулевой становится и обобщенная скорость  $v = d\xi/d\tau$ . Следовательно, в равновесном состоянии  $X=0$  и  $I=0$ . При отклонении системы от равновесного состояния процесс описывается уравнением (5.22). В этом случае при достаточно малых отклонениях от равновесия можно показать наличие линейной связи потока (скорости) каждой из стадий с движущими силами

$$\left. \begin{aligned} I_1 &= L_{11}X_1 + L_{12}X_2; \\ I_2 &= L_{21}X_1 + L_{22}X_2. \end{aligned} \right\} \quad (5.23)$$

Коэффициенты в системе уравнений (5.23) называют феноменологическими; очевидно, они определяют характер, глубину взаимосвязи двух сопряженных стадий в общем процессе. Подстановка (5.23) в (5.22) дает выражение

$$d_i S/d\tau = L_{11}X_1^2 + (L_{12} + L_{21})X_1X_2 + L_{22}X_2^2 > 0. \quad (5.24)$$

Доказываемая в развернутых курсах термодинамики необратимых процессов теорема Онзагера утверждает, что для любых двух сопряженных стадий

$$L_{12} = L_{21}, \quad (5.25)$$

т. е. влияние первого процесса на второй, сопряженный с ним, такое же, как и обратное влияние второго процесса на первый. С учетом равенства (5.25) предыдущее неравенство приобретает вид

$$d_i S/d\tau = L_{11}X_1^2 + 2L_{12}X_1X_2 + L_{22}X_2^2 > 0. \quad (5.26)$$

Изменение энтропии, вызванное необратимостью процессов внутри системы  $d_i S$ , входит в (5.26) в виде производной по времени, которую принято называть скоростью ежесекундного приращения энтропии. Можно рассмотреть зависимость этой величины от движущих сил отдельных стадий  $X_1$  и  $X_2$ , найдя производные дифференцированием (5.26)

$$\left. \begin{aligned} \frac{\partial}{\partial X_1} \left( \frac{d_i S}{d\tau} \right) &= 2L_{11}X_1 + 2L_{12}X_2 - 2I_1; \\ \frac{\partial}{\partial X_2} \left( \frac{d_i S}{d\tau} \right) &= 2L_{12}X_1 + 2L_{22}X_2 - 2I_2. \end{aligned} \right\} \quad (5.27)$$

При достижении системой стационарного состояния производные всех ее параметров по времени обращаются в нуль, иначе говоря,  $I_1 = 0$  и  $I_2 = 0$ , т. е. степень полноты всех реакций в системе остается неизменной во времени. Система (5.27) определяет в этом случае равенство нулю производных величины  $d_i S/d\tau$  по обобщенным силам  $X_1$  и  $X_2$ , т. е. задает условия экстремума, в данном случае — минимума. Физический смысл этого результата заключается в том, что при заданных движущих силах сопряженных стадий  $X_1$  и  $X_2$  переход открытой системы в стационарное состояние обеспечивает минимум ежесекундного прироста энтропии внутри системы.

Уравнения, аналогичные (5.27), могут быть получены для открытой системы любой сложности, в которой протекают сопряженные процессы. В связи с этим общий вывод заключается в том, что стационарное состояние клетки или организма, биологически определяемое как закон гомеостаза, обеспечивает протекание всех процессов наиболее экономично с точки зрения прироста энтропии внутри системы  $\frac{d_i S}{d\tau} = \min$ . Более того, для не

меняющихся во времени феноменологических коэффициентов можно показать, что в стационарном состоянии открытой системы вторая производная  $\frac{d}{d\tau} \left( \frac{d_i S}{d\tau} \right) < 0$ , что обеспечивает стационарному состоянию устойчивость во времени и способность восстанавливаться после небольших случайных возмущений.

С учетом полученных выше результатов представляет интерес рассмотрение внутренних и внешних составляющих прироста энтропии для открытых систем. Если по обозначению, введенному ранее,  $dS = d_e S + d_i S$ , то

$$\frac{dS}{d\tau} = \frac{d_e S}{d\tau} + \frac{d_i S}{d\tau}. \quad (5.28)$$

В стационарном состоянии наряду с прочими параметрами постоянное значение приобретает и энтропия системы, т. е.  $dS/d\tau =$

$= 0$ . Поскольку ранее была доказана неотрицательность внутренней составляющей  $d_i S/d\tau > 0$ , то из уравнения (5.28) вытекает очевидное неравенство

$$\frac{d_e S}{d\tau} < 0, \quad (5.29)$$

$$\text{поскольку } \frac{dS}{d\tau} = \frac{d_e S}{d\tau} + \frac{d_i S}{d\tau} = 0$$

$$\text{и } \frac{d_i S}{d\tau} > 0.$$

Неравенство (5.29) имеет фундаментальное значение для понимания термодинамики взаимоотношения живых систем (клеток, популяций, организмов) с внешней средой. Действительно, условие (5.29) выполняется как в результате экзотермичности процессов ( $\delta q < 0$ ), так и специфически для живого — вследствие отрицательного энтропийного баланса матеряльного обмена с внешней средой. Последнее является правилом для всех микроорганизмов, не использующих прямую солнечную энергию: энтропия субстратов оказывается заметно ниже энтропии продуктов. Таким образом, поглощая низкоэнтропийные вещества — глюкозу, спирты, углеводороды, — микроорганизмы выделяют высокоэнтропийные продукты — углекислоту и воду.

В целом такое рассуждение позволяет заключить, что живые открытые системы могут существовать в стационарном состоянии благодаря тому, что они постоянно повышают энтропию окружающей среды. При этом особенно важным оказывается тот факт, что в стационарном состоянии  $d_i S/d\tau$  минимальна, т. е. минимальной оказывается и абсолютная величина  $\left| \frac{d_e S}{d\tau} \right| = \min$ . Это можно рассматривать как своего рода термодинамическое толкование существования живых клеток именно в стационарном состоянии.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какой вид имеют стехиометрические уравнения получения биомассы дрожжей и бактерий на субстратах, приведенных в табл. 5.2? Используйте имеющиеся в ней данные о расходных коэффициентах и считайте, что никаких продуктов, кроме  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , не образуется.

2. Для предыдущей задачи рассчитайте тепловые эффекты процессов, используя справочные данные о теплотах образования или теплотах сгорания субстратов.

3. Какой результат дают расчеты минимально необходимого расхода субстрата при культивировании дрожжей на метане и этаноле и бактерий на метаноле? Сравните результаты с формальным стехиометрическим уравнением синтеза (задание 1). Может ли расход субстрата быть меньше величины, определяемой законом сохранения массы?

4. Как доказать, что неблагоприятные изменения режима культивирования — смещение pH и температуры в неоптимальную область, приводящие к росту расходных коэффициентов по субстрату, уменьшают энергетическую эффективность биосинтеза?

5. Может ли ассоциативная культура использовать субстрат более эффективно, чем индивидуальная популяция? Докажите с термодинамических позиций.

6. Как рассчитать потребность в кислороде дрожжей, растущих на *n*-гексадекане и глюкозе? Как выполнить аналогичный расчет для бактерий, культивируемых на метане и метаноле? Чем объясняются наблюдаемые различия? (При расчете пользуйтесь данными табл. 5.2 или задания 1.)

7. Можно ли обеспечить эффективный рост дрожжей на *n*-гексадекане в аппарате, массообменные характеристики которого обеспечивают потребность той же культуры в кислороде на 80%, если она растет на глюкозе? Возможна ли обратная замена?

8. Как, используя данные задания 1, оценить значение  $d_s S$  на единицу прироста биомассы дрожжей и бактерий, культивируемых на различных субстратах?

9. Из феноменологических соотношений следует принцип минимума еже-секундного прироста энтропии для открытых систем. Отражается ли это на материальных балансах и величине экономического коэффициента при росте микроорганизмов?

10. Можно ли отрицательные значения тепловых эффектов микробиологического синтеза (экзотермичность) рассматривать как потерю энергии, полученной клеткой при катаболизме? Почему?

#### РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА КО ВТОРОМУ РАЗДЕЛУ

1. Биохимическая термодинамика/Под ред. М. Джоунс. — М.: Мир, 1982. — 374 с.
2. Иванов В. Н. Энергетика роста микроорганизмов. — Киев: Наукова думка, 1981. — 140 с.
3. Карапетьянц М. Х. Химическая термодинамика. — М.: Химия. — 354 с.
4. Ленниджер А. Биохимия. — М.: Мир, 1976. — 957 с.
5. Николаев Л. А. Основы физической химии биологических процессов. — М.: Высшая школа, 1976. — 262 с.
6. Рубин А. Б. Термодинамика биологических процессов. М.: Изд-во МГУ, 1984. — 284 с.

## КИНЕТИКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

### Глава 6. КИНЕТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

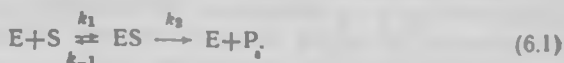
Процессы, протекающие в присутствии биологических катализаторов — ферментов, — имеют исключительно важное значение в современной биотехнологии. Это объясняется не только широким применением ферментов, но и тем, что процессы в живой природе протекают почти исключительно ферментативным путем. Таким образом, количественное изучение и кинетическое описание ферментативных реакций создают научные основы процессов инженерной энзимологии, а для микробиологических производств дают возможность обосновать выбор оптимального режима биосинтеза и открывают принципиальные пути регулирования и управления жизнедеятельностью микроорганизмов.

Вопросы механизма и кинетики ферментативных процессов стали в последнее время предметом подробного рассмотрения в ряде монографий советских и зарубежных авторов, прежде всего в работах школы И. В. Березина, поэтому в настоящей главе обсуждаются лишь основные принципы исследования и кинетического описания химических реакций, протекающих в присутствии ферментов. Важное практическое значение производств, использующих так называемые иммобилизованные ферменты, т. е. ферменты, закрепленные тем или иным способом на твердых носителях, заставило нас посвятить кинетике таких процессов отдельный раздел. В главе 6 речь идет исключительно о нативных ферментах, находящихся в реакционной массе в состоянии гомогенного раствора.

#### § 6.1. Основные принципы кинетического описания ферментативных реакций

На основании обширного и разнообразного экспериментального материала в настоящее время принято считать, что превращение субстрата  $S$  в продукт  $P$  под действием фермента  $E$  протекает через промежуточное образование фермент-субстратного комплекса, который обычно обозначается  $[ES]$ . Хотя количество

и разнообразие биохимических реакций очень велико, большая часть из них может быть вполне удовлетворительно описана простой кинетической схемой. Согласно ей на первой стадии субстрат быстро и обратимо присоединяется к ферменту, давая фермент-субстратный комплекс ES вполне определенной природы. Второй стадией реакции в простейшем случае является необратимый распад комплекса ES с образованием продукта и регенерацией фермента:



Константы скорости элементарных стадий в уравнении (6.1) обозначены через  $k_1$ ,  $k_{-1}$  и  $k_2$ , причем  $k_1$  относится к реакции второго порядка, а  $k_{-1}$  и  $k_2$  — к реакциям первого порядка. Схема не отрицает возможности участия на второй стадии какого-либо дополнительного реагента, который находится в большом избытке, что делает вторую стадию реакцией псевдопервого порядка.

Количественная обработка схемы (6.1) подробно рассмотрена в ряде работ, на основании изучения которых можно сказать, что существуют два принципиально различающихся, хотя и взаимодополняющих подхода, позволяющих получить кинетическое уравнение, носящее название уравнения Михаэлиса—Ментен.

Наиболее простое допущение, принимаемое при выводе уравнения по схеме (6.1), заключается в предположении, что фермент-субстратный комплекс все время находится в равновесии с исходными веществами, т. е. что равновесие на первой стадии устанавливается очень быстро и не нарушается частичным превращением комплекса ES в продукт с высвобождением фермента в форме, свободной от субстрата. В этом случае константу равновесия первой стадии принято обозначать через  $K_s$ , относя ее, однако, не к образованию, а к распаду фермент-субстратного комплекса. Очевидно, константа нестойкости комплекса ES

$$K_s = [E][S]/[ES] \quad (6.2)$$

связана с константами схемы (6.1) равенством

$$K_s = k_{-1}/k_1. \quad (6.3)$$

Скорость ферментативного превращения субстрата равна скорости образования продукта, т. е. скорости второй стадии, если концентрация субстрата много больше концентрации фермента, что обычно и наблюдается на практике. Тогда при  $[E]_0 \ll [S]$

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES], \quad (6.4)$$

где через  $[E]_0$  обозначена концентрация фермента в начальный момент превращения.

В ходе реакции, если нет посторонних эффектов, будет соблюдаться равенство

$$[E]_0 = [E] + [ES], \quad (6.5)$$

поскольку фермент, первоначально внесенный в реакционную массу, будет присутствовать в ней либо в свободном виде, либо в виде комплекса с субстратом.

Для преобразования уравнения (6.4) в форму, удобную для практического применения, необходимо выразить концентрацию комплекса ES через концентрацию субстрата, используя уравнения (6.2) и (6.5). Из уравнения (6.2)

$$[ES] = [E][S]/K_s, \quad (6.6)$$

а подстановка этого выражения в уравнение (6.5) дает

$$[E]_0 = [E] + \frac{[E][S]}{K_s} = [E] \frac{K_s + [S]}{K_s}. \quad (6.7)$$

Из уравнения (6.7) можно выразить неизвестную концентрацию свободного фермента

$$[E] = [E]_0 \frac{K_s}{K_s + [S]} \quad (6.8)$$

и подставить ее в (6.6), тогда

$$[ES] = \frac{K_s [E]_0 [S]}{K_s (K_s + [S])} = \frac{[E]_0 [S]}{K_s + [S]} \quad (6.9)$$

и окончательно уравнение (6.4) приобретает вид

$$-\frac{d[S]}{d\tau} = \frac{d[P]}{d\tau} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_s + [S]}. \quad (6.10)$$

Уравнение Михаэлиса—Ментен вида (6.10) может быть получено и другим путем, предполагающим возможность применения к схеме (6.1) принципа стационарности. При достаточно быстром протекании стадий образования фермент-субстратного комплекса и его превращения в продукт может быть реализовано состояние, когда концентрация ES меняется во времени гораздо медленнее, чем концентрации субстрата и продукта. Этот случай возможен при условии  $[E]_0 \ll [S]$ , что уже рассматривалось выше. Принцип стационарности позволяет записать

$$\frac{d[ES]}{d\tau} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (6.11)$$

и выразить концентрацию комплекса через  $[E]$  и  $[S]$

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S]. \quad (6.12)$$

Скорость расходования субстрата или образования продукта в этом случае описывается выражением (6.4), а для замены неизвестного значения  $[E]$  в (6.12) можно использовать уравнение (6.5) материального баланса по ферменту

$$[E]_0 = [E] + \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S] = [E] \left( 1 + \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [S] \right). \quad (6.13)$$

Находя  $[E]$  из выражения (6.13) и подставляя в уравнение (6.12), получим

$$[ES] = \frac{\frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E]_0 [S]}{1 + \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [S]} = \frac{[E]_0 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (6.14)$$

и окончательно

$$-\frac{d[S]}{d\tau} = \frac{d[P]}{d\tau} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_M + [S]}, \quad (6.15)$$

где  $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$  носит название константы Михаэлиса.

Нетрудно увидеть, что уравнение (6.15) переходит в форму (6.10), если  $k_{-1} \gg k_2$ , т. е. если обратный распад фермент-субстратного комплекса на исходные вещества происходит гораздо быстрее его превращения в продукт. Это условие совпадает с предположением о существовании равновесия на первой стадии в ходе всего процесса. Таким образом, принцип стационарности позволяет получить более общую форму уравнения Михаэлиса—Ментен, частным случаем которой оказывается выражение (6.10), включающее константу нестойкости фермент-субстратного комплекса.

Уравнение Михаэлиса—Ментен в целом хорошо описывает экспериментальные данные по кинетике ферментативных реакций. Чаще всего оно применяется в дифференциальной форме, связывающей начальную скорость превращения субстрата с его начальной концентрацией при заданном количестве внесенного фермента

$$r_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_M + [S]_0}. \quad (6.16)$$

Это объясняется тем, что в ходе реакции могут проявиться некоторые дополнительные эффекты — торможение продуктами, инактивация ферментов и т. п. — которые искажают ход временной зависимости по сравнению с уравнениями (6.10) и (6.15).

Взаимосвязь начальной скорости реакции и начальной концентрации субстрата по уравнению Михаэлиса—Ментен представляет собой дробную рациональную функцию (рис. 6.1), име-

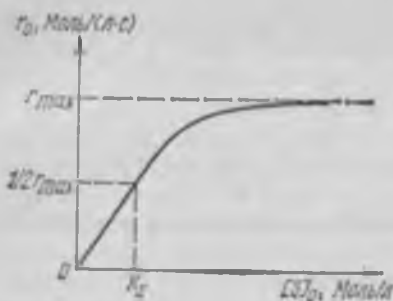


Рис. 6.1. Зависимость начальной скорости  $r_0$  ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата  $[S]_0$

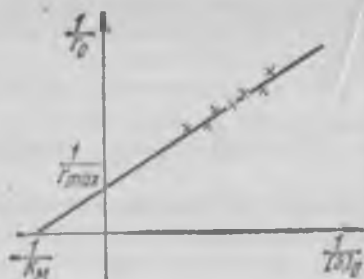


Рис. 6.2. Обработка экспериментальных данных в координатах Лайнуивера — Берка

ющую свои характерные особенности. При достаточно малых концентрациях субстрата, когда  $K_M \gg [S]_0$ , выражение (6.16) переходит в линейную форму

$$r_0 = \frac{k_2[E]_0}{K_M} [S]_0, \quad (6.17)$$

а при больших  $[S]_0$ , если  $[S]_0 \gg K_M$ , кривая (6.16) стремится к предельному значению  $k_2[E]_0$ , которое принято обозначать через  $r_{\max}$ . В силу изложенного выше уравнение Михаэлиса—Ментен часто представляют в форме, удобной для практической обработки экспериментальных данных:

$$r_0 = \frac{r_{\max}[S]_0}{K_M + [S]_0}. \quad (6.18)$$

Константы уравнения (6.18) характеризуют активность фермента и его сродство к данному субстрату, поэтому целью кинетического исследования является прежде всего нахождение значений  $r_{\max}$  и  $K_M$ . Наиболее просто такое исследование выполняется в виде серии экспериментов при постоянной концентрации фермента  $[E]_0$  и изменяющихся начальных концентрациях субстрата  $[S]_0$ . В ходе каждого опыта изучается лишь начальный участок кинетической кривой для определения начальной скорости реакции  $r_0$ . Имея набор значений  $r_0$  при известных  $[S]_0$ , легко найти кинетические константы. Для этой цели предложен ряд способов обработки, из которых наибольшее применение нашли две системы координат, обсуждаемых ниже.

Общим свойством дробных рациональных функций, имеющих в числителе произведение, а в знаменателе сумму некоторых величин, является их способность переходить в линейную форму

при обращении левой и правой частей равенства. Так, уравнение (6.18) переводится в линейную зависимость вида

$$\frac{1}{r_0} = \frac{K_M}{r_{\max}} \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{r_{\max}} \quad (6.19)$$

которая описывает прямую в координатах  $1/r_0 = f(1/[S]_0)$ . Такие координаты носят название координат Лайнуивера — Берка, по имени исследователей, рассматривавших этот способ обработки кинетических экспериментов в ферментативном катализе. Рис. 6.2 иллюстрирует зависимость (6.19), при этом характерно, что прямая пересекает оси абсцисс и ординат в точках, позволяющих легко найти константы уравнения, не прибегая к громоздким вычислениям. Действительно, при  $1/[S]_0 = 0$  имеем  $1/r_0 = 1/r_{\max}$ , т. е. прямая пересекает ось ординат в точке  $1/r_{\max}$ , а при  $1/r_0 = 0$ ,  $1/[S]_0 = -1/K_M$ . Таким образом, при продолжении прямой в отрицательную область до пересечения с осью абсцисс она отсекает на оси отрезок, равный  $-1/K_M$ .

Серьезным недостатком координат Лайнуивера — Берка, как это видно из рис. 6.2, является необходимость экстраполяции прямой влево до пересечения с осями координат, тогда как экспериментальные точки находятся в правой части графика. Это вполне понятно, т. к. часто бывает затруднительно обеспечить в эксперименте малые значения абсциссы  $1/[S]_0$ , т. е. использовать большие начальные концентрации субстрата. Данное обстоятельство влияет на точность нахождения кинетических констант и заставляет в некоторых случаях отказываться от координат Лайнуивера — Берка, заменяя их другими, не требующими экстраполяции.

Одно из удобных решений заключается в использовании координат  $r_0 = f(r_0/[S]_0)$ , представленных на рис. 6.3. Уравнение

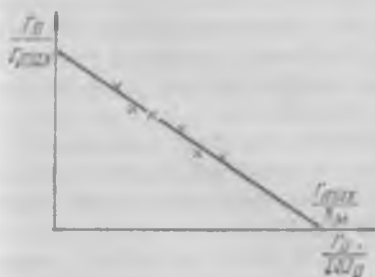


Рис. 6.3. Зависимость начальной скорости  $r_0$  ферментативной реакции от отношения  $r_0/[S]_0$

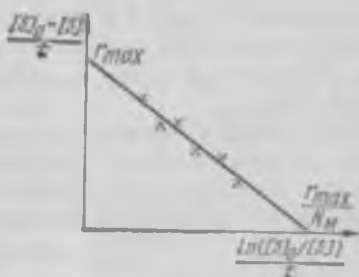


Рис. 6.4. Графическая интерпретация интегральной формы уравнения Михаэлиса — Ментен

(6.18) путем несложных преобразований, заключающихся в умножении на знаменатель и перегруппировке, приводят к виду

$$r_0 = r_{\max} - K_M(r_0/[S]_0). \quad (6.20)$$

В координатах рис. 6.3 прямая с отрицательным углом наклона отсекает на осях отрезки, равные  $r_{\max}$  на оси ординат и  $r_{\max}/K_M$  — на оси абсцисс. При этом все экспериментальные точки группируются, как правило, в середине отрезка или смещены от оси абсцисс. Недостатком такого метода обработки является возможность резкого возрастания ошибки при делении двух величин  $r_0$  и  $[S]_0$ , каждая из которых измерена с ошибкой.

Определенный интерес представляет интегральная форма уравнения Михаэлиса — Ментен, которая может быть использована в тех случаях, когда имеется твердая уверенность в отсутствии посторонних факторов. Уравнение в форме (6.15) может быть проинтегрировано методом разделения переменных:

$$\begin{aligned} -\frac{d[S]}{d\tau} &= \frac{r_{\max}[S]}{K_M + [S]}, \\ -d\tau &= \frac{K_M}{r_{\max}} \frac{d[S]}{[S]} + \frac{1}{r_{\max}} d[S]. \end{aligned} \quad (6.21)$$

Интегрирование в пределах времени от 0 до  $\tau$  и соответственно от  $[S]_0$  до  $[S]$  приводит к уравнению

$$[S]_0 - [S] = r_{\max} \tau - K_M \ln \frac{[S]_0}{[S]}, \quad (6.22)$$

которое может быть приведено к линейному виду в так называемых координатах Уокера — Шмидта (рис. 6.4):

$$\frac{[S]_0 - [S]}{\tau} = r_{\max} - K_M \frac{\ln \frac{[S]_0}{[S]}}{\tau}. \quad (6.23)$$

Координаты рис. 6.4 удобны для нахождения кинетических констант, поскольку прямая пересекает ось ординат в точке  $r_{\max}$ , а ось абсцисс — в точке  $r_{\max}/K_M$  и имеет тангенс угла наклона, равный  $-K_M$ .

Интегральная обработка экспериментальных данных по кинетике ферментативных процессов удобна прежде всего тем, что позволяет выявить тормозящее действие продуктов, если последние образуют комплекс с катализатором:



Совместно со схемой (6.1) уравнение (6.24) описывает кинетику расходования субстрата и накопления продукта в условиях обратимой инактивации фермента путем комплексообразования

с продуктом Р. Если константа нестойкости комплекса ЕР имеет вид

$$K_p = [E][P]/[EP], \quad (6.25)$$

фермент будет присутствовать в реакционной массе в трех формах — свободной, в виде комплексов с субстратом и с продуктом:

$$[E]_0 = [E] + [E][S]/K_s + [E][P]/K_p, \quad (6.26)$$

где  $K_p$  — константа равновесия.

После выражения концентрации свободного фермента  $[E]$  из (6.26) и подстановки в (6.6) и (6.4) получаем кинетическое уравнение (заменяв  $K_s$  на более общую величину  $K_M$ ):

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{r_{\max}[S]}{K_M + [S] + [P]/K_p}. \quad (6.27)$$

Учитывая, что согласно схеме (6.1)  $[P] = [S]_0 - [S]$  и  $[S] = [S]_0 - [P]$ , можем провести интегрирование уравнения (6.27) в пределах от 0 до  $\tau$  и от  $[S]_0$  до  $[S]$  методом разделения переменных, использованным выше. Полученная зависимость легко приводится к виду (6.23):

$$\frac{[P]}{\tau} = \frac{r_{\max}}{1 - K_M/K_p} - \frac{K_M(1 + [S]_0/K_p)}{1 - K_M/K_p} \frac{\ln \frac{[S]}{[S]_0 - [P]}}{\tau}. \quad (6.28)$$

Уравнение (6.28) описывает прямую в координатах Уокера — Шмидта (рис. 6.5), причем в зависимости от соотношения констант  $K_M$  и  $K_p$  угол наклона прямой может быть как положительным, так и отрицательным. Положительный угол наклона получается в том случае, когда  $K_M > K_p$  и, следовательно,  $(1 - K_M/K_p) < 0$ . Заметим, что в этих условиях, однако, и свободный член уравнения (6.28) становится отрицательным, т. е. прямая пересекает ось ординат в отрицательной области, отсекая отрезок  $r_{\max}/(1 - K_M/K_p)$ . Таким образом, уже сам факт линейной зависимости в координатах Уокера — Шмидта с  $\tan \alpha > 0$  и отрицательной точкой пересечения с осью ординат указывает на тормозящее действие продуктов, образующих с ферментом комплекс более устойчивый, чем фермент-субстратный, т. е.  $K_M > K_p$ .

Для выявления слабого тормозящего действия продуктов, когда

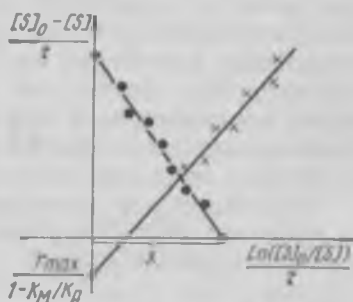


Рис. 6.5. Интегральная обработка экспериментальных данных при торможении продуктом

$K_M < K_P$  и  $(1 - K_N/K_P) > 0$ , необходимы дополнительные исследования, основанные на различиях в уравнениях (6.23) и (6.28). В последнем случае угол наклона прямой зависит от начальной концентрации субстрата, чего нет в отсутствие торможения продуктом. Выполняя ряд экспериментов с различными начальными значениями  $[S]_0$ , можно четко показать отсутствие торможения продуктами. В этом случае все экспериментальные точки в координатах Уокера — Шмидта должны укладываться на одну прямую.

Если тормозящее действие продуктов все же проявляется, то из полученного пучка прямых легко найти константу нестойкости комплекса фермента с продуктом  $K_P$ . Точки пересечения прямых, описываемых уравнением (6.28), с осью абсцисс отсекают на ней отрезки  $x$ , равные

$$\frac{\ln \frac{[S]_0}{[S]}}{\tau} = \frac{r_{\max} \left(1 - \frac{K_M}{K_P}\right)}{(1 - K_M/K_P)(1 + [S]_0/K_P)K_M} = \frac{r_{\max}}{K_M(1 + [S]_0/K_P)}$$

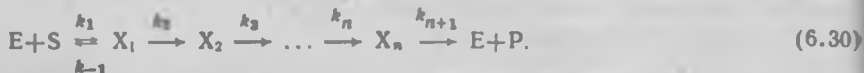
Обратные величины отрезков линейно зависят от  $S_0$

$$\frac{1}{x} = \frac{K_M}{r_{\max}} + \frac{K_M}{K_P r_{\max}} [S]_0. \quad (6.29)$$

Такая линейная зависимость дает в координатах  $1/x = f([S]_0)$  прямую, пересекающую, в свою очередь, ось абсцисс в точке  $-K_P$ . Это позволяет непосредственно оценить константу нестойкости комплекса фермент — продукт, а с помощью зависимости, приведенной на рис. 6.5, найти и остальные кинетические константы.

В целом можно заключить, что дифференциальная и интегральная обработки кинетических данных по уравнению Михаэлиса — Ментен хорошо дополняют друг друга и позволяют получить достаточно надежную информацию о каталитических свойствах фермента по отношению к данному субстрату. Осложняющим обстоятельством остается здесь лишь недостаточная устойчивость некоторых ферментов, необратимо теряющих активность в ходе превращения. Именно этот фактор заставляет многих исследователей ограничиваться дифференциальной обработкой зависимостей начальных скоростей реакции от начальных концентраций субстрата, не рассматривая более глубокие степени превращения.

Использование принципа стационарности позволяет описать кинетику многостадийных ферментативных реакций с неограниченным числом стадий:



Все промежуточные соединения  $X_1, X_2, \dots, X_n$  образуются и расходуются значительно быстрее, чем субстрат и продукт. Это

Дает основание считать, что

$$\frac{d[X_1]}{d\tau} = \frac{d[X_2]}{d\tau} = \dots = \frac{d[X_n]}{d\tau} = 0,$$

т. е. для первого комплекса  $X_1$

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[X_1] \quad (6.31)$$

и, значит,

$$[X_1] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S]. \quad (6.32)$$

Аналогично для соединения  $X_2$

$$[X_2] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \frac{k_2}{k_3} [E][S]. \quad (6.33)$$

И, наконец, для  $X_n$

$$[X_n] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \frac{k_2}{k_{n+1}} [E][S]. \quad (6.34)$$

Из условия  $[S] \gg [E]_0$  можно записать уравнение материального баланса по ферменту, выразить концентрацию свободной формы

$$[E] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} [S] \left( \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} + \dots + \frac{1}{k_{n+1}} \right)} \quad (6.35)$$

и далее — скорость образования продукта, а значит, и скорость расходования субстрата по схеме (6.30)

$$-\frac{d[S]}{d\tau} = k_{n+1}[X_n] = \frac{\frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} [E]_0 [S]}{1 + \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} [S] \left( \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} + \dots + \frac{1}{k_{n+1}} \right)}. \quad (6.36)$$

Преобразуя это уравнение и переходя к начальной скорости  $r_0$  подстановкой начальной концентрации субстрата  $[S]_0$ , получим

$$r_0 = \frac{\frac{1}{(1/k_2 + 1/k_3 + \dots + 1/k_{n+1})} [E]_0 [S]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1 k_2 (1/k_2 + 1/k_3 + \dots + 1/k_{n+1})} + [S]_0} = \frac{k_{кат} [E]_0 [S]_0}{K_M' + [S]_0}. \quad (6.37)$$

Таким образом, независимо от числа промежуточных стадий превращения субстрата в продукт кинетика процесса описывается уравнением Михаэлиса — Ментен с эффективными константами,

включающими константы скорости элементарных стадий:

$$\left. \begin{aligned} 1/k_{\text{кат}} &= 1/k_2 + 1/k_3 + \dots + 1/k_{n+1}; \\ K_M' &= \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 k_2 (1/k_2 + 1/k_3 + \dots + 1/k_{n+1})} \end{aligned} \right\} \quad (6.38)$$

В частности, для встречающихся на практике трехстадийных реакций

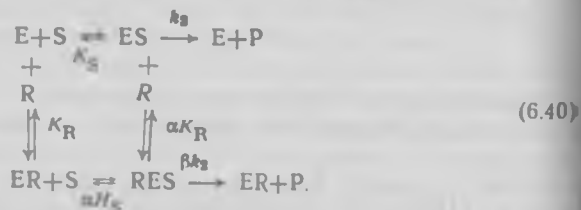
$$r_0 = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [E]_0 [S]_0}{K_M \frac{k_2}{k_2 + k_3} + [S]_0} \quad (6.39)$$

причем, как обычно,  $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$ .

## § 6.2. Количественное описание обратимого ингибирования и активации ферментов

Скорость протекания биохимических реакций, катализируемых ферментами, часто зависит не только от природы и концентрации фермента и субстрата, но и от присутствия некоторых веществ — ингибиторов или активаторов. В живой природе ингибирование и активация ферментов и ферментных систем являются важнейшими способами регулирования метаболизма и приспособления к условиям окружающей среды. При техническом использовании нативных или иммобилизованных ферментов небольшие количества ингибиторов и активаторов могут попадать в реакционную среду с ферментом при его недостаточной очистке, с субстратом, растворителем и т. п.

Простейшая схема влияния некоторого вещества R на ферментативное превращение субстрата S в продукт P, протекающее по уравнению (6.1), включает обратимое взаимодействие добавки с ферментом или фермент-субстратным комплексом:



Через  $K_S$  и  $K_R$  обозначены константы нестойкости комплексов фермента с субстратом и с добавкой R. Из общих термодинамических соображений очевидно, что для замкнутой системы равновесий (6.40) константы нестойкости тройного комплекса RES при его распаде по двум возможным направлениям должны отличаться от констант нестойкости соответствующих двойных ком-

плексов в одинаковое число раз, что и учитывается коэффициентом  $\alpha$ . Если распад фермент-субстратного комплекса с образованием продукта происходит с константой скорости  $k_2$ , тройной комплекс может превращаться с выделением того же продукта с некоторой другой константой скорости  $\beta k_2$ . Величина  $\beta$  и определяет характер влияния добавленного вещества: при  $\beta > 1$  оно ускоряет реакцию и называется активатором (A); при  $\beta < 1$  реакция замедляется и добавка называется ингибитором (I), при чем случай  $\beta = 0$  называется полным ингибированием.

Кинетическую обработку схемы (6.40) проводят в предположении об установлении всех равновесий в системе и соблюдении не только условия  $[S] \gg [E]_0$ , но и неравенства  $[R] \gg [E]_0$ . Это дает возможность не учитывать распределение субстрата и добавки по различным комплексам, а рассматривать лишь материальный баланс по ферменту, существующему в свободном виде и в комплексах ES, ER и RES:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [ER] + [RES]. \quad (6.41)$$

Выражая концентрации комплексов через соответствующие константы нестойкости, из зависимости (6.41) можно найти концентрацию свободной формы фермента

$$[E] = \frac{\alpha K_R K_S [E]_0}{\alpha K_R K_S + \alpha K_R [S] + [R][S] + \alpha K_S [R]}$$

и далее — концентрации комплексов

$$[ES] = \frac{\alpha K_R [E]_0 [S]}{\alpha K_R K_S + \alpha K_R [S] + [R][S] + \alpha K_S [R]}$$

$$[RES] = \frac{[E]_0 [S][R]}{\alpha K_R K_S + \alpha K_R [S] + [R][S] + \alpha K_S [R]}.$$

Общая скорость превращения субстрата в продукт по схеме (6.40) складывается из скоростей двух параллельных стадий:

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_2 [ES] + \beta k_2 [RES] = \frac{k_2 \alpha K_R [E]_0 [S] + \beta k_2 [E]_0 [S][R]}{\alpha K_R K_S + \alpha K_R [S] + [R][S] + \alpha K_S [R]}. \quad (6.42)$$

Проведя преобразование в знаменателе и разделив числитель и знаменатель на  $(\alpha K_R + [R])$ , получим общее выражение для начальной скорости ферментативной реакции, протекающей в присутствии постороннего активатора или ингибитора:

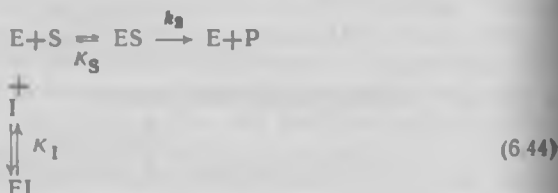
$$r_0 = \frac{k_2 \frac{\alpha K_R + \beta [R]}{\alpha K_R + [R]} [E]_0 [S]_0}{\frac{K_S}{\alpha K_R + [R]} + [S]_0}. \quad (6.43)$$

Уравнение (6.43) представляет собой дробную рациональную функцию, аналогичную уравнению Михаэлиса — Ментен. В частности, уравнение (6.43) может быть линеаризовано в координатах Лайнуивера — Берка, причем в серии экспериментов с меняющимся значением  $[R]$  при постоянном  $[E]_0$  должен получиться пучок прямых, пересекающихся в первом, втором или третьем квадрантах в точке с координатами

$$\frac{1}{[S]_0} = \frac{1}{K_S} \frac{\beta - 1}{\alpha - \beta} \quad \text{и} \quad \frac{1}{r_0} = \frac{1}{r_{\max}} \frac{\alpha - 1}{\alpha - \beta},$$

где  $r_{\max} = k_2[E]_0$ .

Значительный теоретический и практический интерес представляют два варианта ингибирования, получивших название конкурентного и неконкурентного. В этих случаях константу равновесия  $K_R$  принято обозначить  $K_I$ . Полное конкурентное ингибирование имеет место в тех случаях, когда ингибитор препятствует образованию фермент-субстратного комплекса в результате «конкуренции» за активный центр фермента. С точки зрения общей схемы (6.40) это означает, что комплекс RES не может существовать, т. е.  $\alpha \rightarrow \infty$ , а значение  $\beta$  не определено, т. к. этот путь образования продуктов исключен:



Кинетическое описание полного конкурентного ингибирования может быть получено из общего уравнения (6.43) при переходе к пределу при  $\alpha \rightarrow \infty$ .

$$r_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S(1 + [I]/K_I) + [S]_0}. \quad (6.45)$$

Зависимость (6.45) имеет форму уравнения Михаэлиса — Ментен, причем характерно, что измененной оказывается лишь константа  $K_M$ , тогда как  $r_{\max}$  остается без изменений. Это указывает на то, что при любой концентрации ингибитора экспериментальные данные по зависимости  $r_0$  от  $[S]_0$  должны образовывать в координатах Лайнуивера — Берка прямую, пересекающую ось ординат в точке  $1/r_{\max}$ . В серии экспериментов при изменяющихся концентрациях ингибитора будет получаться пучок прямых (рис. 6.6), пересекающихся в одной точке на оси ординат, отсе-

кая отрезок  $1/r_{\max}$ . Поскольку каждая из прямых будет отсека́ть на оси абсцисс отрезок, равный  $-1/K_M$ , то из найденных этим способом значений  $K_M$  легко найти  $K_S$  и  $K_I$ , строя на рис. 6.7 линейную зависимость в координатах  $K_M \text{ эксп} = f([I])$ :

$$K_M = K_S + \frac{K_S}{K_I} [I]. \quad (6.46)$$

Если значения  $r_{\max}$  и  $K_S$  для фермента известны и требуется найти лишь константу ингибирования  $K_I$ , удобно использовать координаты Диксона, связывающие  $1/r_0$  с  $[I]$ . Обращая уравнение (6.35), имеем

$$\frac{1}{r_0} = \frac{K_S + [S]_0}{k_2[E]_0[S]_0} + \frac{K_S}{k_2 K_I [E]_0 [S]_0} [I]. \quad (6.47)$$

т. е. в координатах  $1/r_0 = f([I])$  можно получить пучок прямых, угол наклона которых будет определяться начальной концентрацией субстрата (рис. 6.8). Нетрудно увидеть, что при  $[I] = -K_I$  все прямые, описываемые выражением (6.47), проходят через точку с абсциссой  $-K_I$  и ординатой  $1/r_{\max}$ . Это свидетельствует о том, что при полном конкурентном ингибировании серия экспериментов по зависимости начальной скорости реакции от концентрации ингибитора при различных начальных концентрациях субстрата и постоянном значении  $[E]_0$  дает в координатах Диксона пучок прямых, пересекающихся в одной точке. Ее абсцисса по-



Рис. 6.6. Зависимость обратных величин  $r_0$  и  $[S]_0$  при полном конкурентном ингибировании

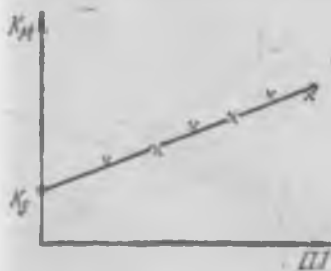


Рис. 6.7. Нахождение константы  $K_S$  при полном конкурентном ингибировании

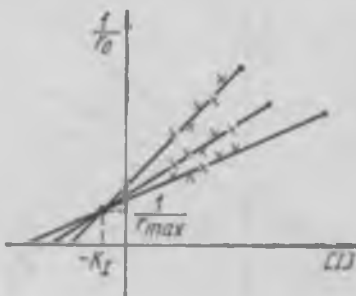
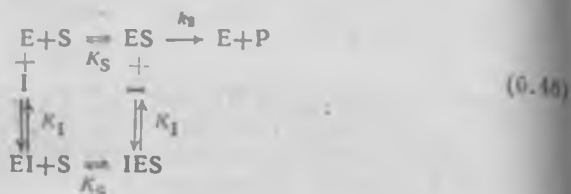


Рис. 6.8. Обработка данных при полном конкурентном ингибировании в координатах Диксона

звolyет найти константу нестойкости комплекса фермент — ингибитор  $K_I$ .

В противоположность полному конкурентному ингибированию неконкурентные ингибиторы снижают активность ферментов, не затрагивая его активного центра, т. е. не препятствуя образованию фермент-субстратного комплекса. Согласно схеме (6.40) полное неконкурентное ингибирование возможно при  $\beta=0$ , если  $\alpha=1$ . Таким образом, нестойкость тройного комплекса по каждому из направлений его распада не зависит от третьей частицы:



Подстановка значений  $\alpha$  и  $\beta$  в общее уравнение (6.43) приводит к зависимости

$$r_0 = \frac{k_2}{K_S + [S]_0} [E]_0 [S]_0, \quad (6.49)$$

которая совпадает по форме с уравнением Михаэлиса — Ментен, однако  $r_{\max}$  становится зависимой от концентрации ингибитора:

$$\frac{r_{\max}}{[E]_0} = k_{\text{кат}} = \frac{k_2}{1 + [I]/K_I}. \quad (6.50)$$

В координатах Лайнуивера — Берка для опытов с разными  $[I]$  в этом случае должен получаться пучок прямых, пересекающихся в общей точке  $-1/K_S$  на оси абсцисс (рис. 6.9). В серии экспериментов по определению  $r_0$  при различных  $[I]$  и постоян-

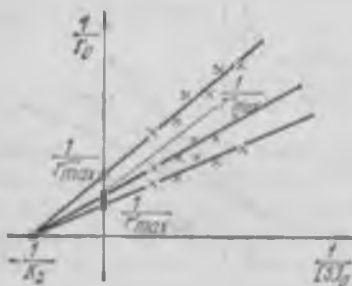


Рис. 6.9. Зависимость обратных величин  $r_0$  и  $[S]_0$  при полном неконкурентном ингибировании

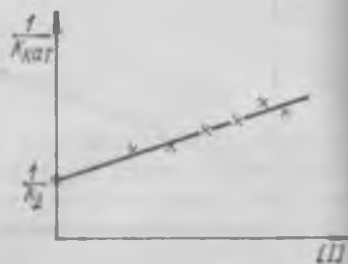


Рис. 6.10. Нахождение константы  $k_2$  при полном неконкурентном ингибировании

ных  $[S]_0$  и  $[E]_0$  на рис. 6.10 должна получаться прямая в координатах  $1/k_{кат} = f([I])$ :

$$\frac{1}{k_{кат}} = \frac{[E]_0}{r_{max}} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_2 K_I} [I]. \quad (6.51)$$

Для обработки серии опытов по измерению  $r_0$  при различных  $[I]$  и  $[S]_0$  можно использовать координаты Диксона, поскольку уравнение (6.39) может быть приведено к виду

$$\frac{1}{r_0} = \frac{K_S + [S]_0}{k_2 [E]_0 [S]_0} + \frac{K_S + [S]_0}{k_2 K_I [E]_0 [S]_0} [I]. \quad (6.52)$$

При  $[I] = -K_I$  все прямые, описываемые зависимостью (6.52), пересекаются в общей точке на оси абсцисс (рис. 6.11). Это позволяет легко находить константу нестойкости комплекса фермента с полным неконкурентным ингибитором, а также удобно для качественного определения типа ингибитора. Пучок прямых в координатах  $1/r_0 = f([I])$  пересекается в общей точке на оси абсцисс при полном неконкурентном ингибировании и в общей точке во втором квадранте при полном конкурентном ингибировании. В обоих случаях абсцисса точки пересечения равна  $-K_I$ .

Не касаясь других случаев ингибирования, встречающихся значительно реже, рассмотрим механизм и кинетику наиболее важного варианта активации: действие неконкурентных активаторов. Очевидно, активаторы не могут действовать по конкурентному типу, присоединяясь к активному центру фермента и препятствуя тем самым превращению субстрата. Неконкурентная активация, напротив, встречается часто, поскольку такие активаторы не влияют на образование фермент-субстратного комп-

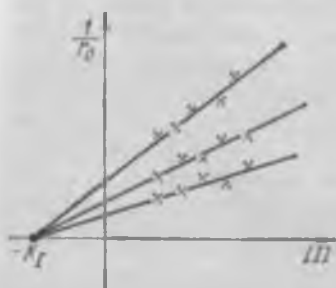


Рис. 6.11. Обработка данных при полном неконкурентном ингибировании в координатах Диксона

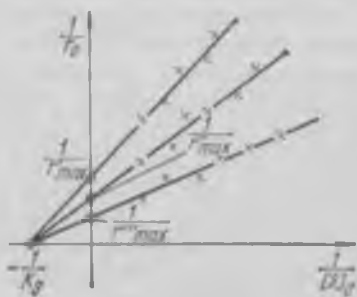
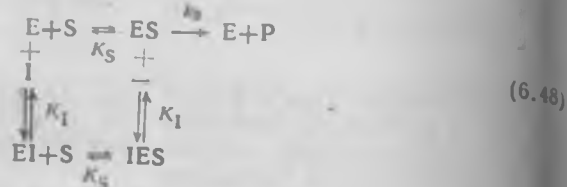


Рис. 6.12. Зависимость обратных величин  $r_0$  и  $[S]_0$  при неконкурентной активации

звolyет найти константу нестойкости комплекса фермент — ингибитор  $K_I$ .

В противоположность полному конкурентному ингибированию неконкурентные ингибиторы снижают активность ферментов, не затрагивая его активного центра, т. е. не препятствуя образованию фермент-субстратного комплекса. Согласно схеме (6.40) полное неконкурентное ингибирование возможно при  $\beta=0$ , если  $\alpha=1$ . Таким образом, нестойкость тройного комплекса по каждому из направлений его распада не зависит от третьей частицы:



Подстановка значений  $\alpha$  и  $\beta$  в общее уравнение (6.43) приводит к зависимости

$$r_0 = \frac{k_2}{1 + [I]/K_I} \frac{[E]_0[S]_0}{K_S + [S]_0}, \quad (6.49)$$

которая совпадает по форме с уравнением Михаэлиса — Ментен, однако  $r_{\max}$  становится зависимой от концентрации ингибитора:

$$\frac{r_{\max}}{[E]_0} = k_{\text{кат}} = \frac{k_2}{1 + [I]/K_I}. \quad (6.50)$$

В координатах Лайнуивера — Берка для опытов с разными  $[I]$  в этом случае должен получаться пучок прямых, пересекающихся в общей точке  $-1/K_S$  на оси абсцисс (рис. 6.9). В серии экспериментов по определению  $r_0$  при различных  $[I]$  и постоян-

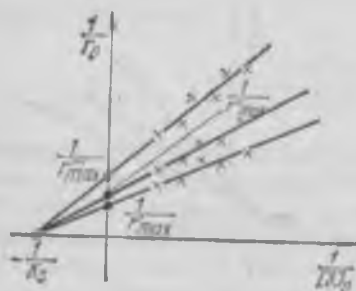


Рис. 6.9. Зависимость обратных величин  $r_0$  и  $[S]_0$  при полном неконкурентном ингибировании



Рис. 6.10. Нахождение константы  $k_2$  при полном неконкурентном ингибировании

ных  $[S]_0$  и  $[E]_0$  на рис. 6.10 должна получаться прямая в координатах  $1/k_{\text{кат}} = f([I])$ :

$$\frac{1}{k_{\text{кат}}} = \frac{[E]_0}{r_{\max}} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_2 K_I} [I]. \quad (6.51)$$

Для обработки серии опытов по измерению  $r_0$  при различных  $[I]$  и  $[S]_0$  можно использовать координаты Диксона, поскольку уравнение (6.39) может быть приведено к виду

$$\frac{1}{r_0} = \frac{K_S + [S]_0}{k_2 [E]_0 [S]_0} + \frac{K_S + [S]_0}{k_2 K_I [E]_0 [S]_0} [I]. \quad (6.52)$$

При  $[I] = -K_I$  все прямые, описываемые зависимостью (6.52), пересекаются в общей точке на оси абсцисс (рис. 6.11). Это позволяет легко находить константу нестойкости комплекса фермента с полным неконкурентным ингибитором, а также удобно для качественного определения типа ингибитора. Пучок прямых в координатах  $1/r_0 = f([I])$  пересекается в общей точке на оси абсцисс при полном неконкурентном ингибировании и в общей точке во втором квадранте при полном конкурентном ингибировании. В обоих случаях абсцисса точки пересечения равна  $-K_I$ .

Не касаясь других случаев ингибирования, встречающихся значительно реже, рассмотрим механизм и кинетику наиболее важного варианта активации: действие неконкурентных активаторов. Очевидно, активаторы не могут действовать по конкурентному типу, присоединяясь к активному центру фермента и препятствуя тем самым превращению субстрата. Неконкурентная активация, напротив, встречается часто, поскольку такие активаторы не влияют на образование фермент-субстратного комп-

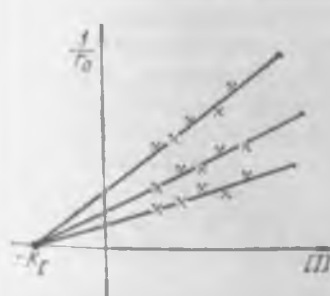


Рис. 6.11. Обработка данных при полном неконкурентном ингибировании в координатах Диксона

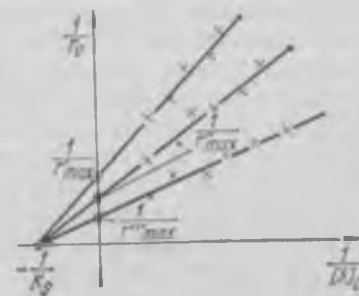
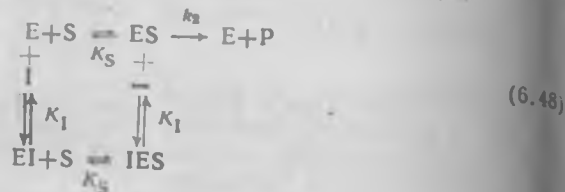


Рис. 6.12. Зависимость обратных величин  $r_0$  и  $[S]_0$  при неконкурентной активации

звolyет найти константу нестойкости комплекса фермент — ингибитор  $K_I$ .

В противоположность полному конкурентному ингибированию, неконкурентные ингибиторы снижают активность ферментов, не затрагивая его активного центра, т. е. не препятствуя образованию фермент-субстратного комплекса. Согласно схеме (6.40) полное неконкурентное ингибирование возможно при  $\beta=0$ , если  $\alpha=1$ . Таким образом, нестойкость тройного комплекса по каждому направлению его распада не зависит от третьей частицы:



Подстановка значений  $\alpha$  и  $\beta$  в общее уравнение (6.43) приводит к зависимости

$$r_0 = \frac{k_2}{1 + [I]/K_I} \frac{[E]_0 [S]_0}{K_S + [S]_0} \quad (6.49)$$

которая совпадает по форме с уравнением Михаэлиса — Ментен, однако  $r_{\max}$  становится зависимой от концентрации ингибитора:

$$\frac{r_{\max}}{[E]_0} = k_{\text{кат}} = \frac{k_2}{1 + [I]/K_I} \quad (6.50)$$

В координатах Лайнуивера — Берка для опытов с разными  $[I]$  в этом случае должен получаться пучок прямых, пересекающихся в общей точке  $-1/K_S$  на оси абсцисс (рис. 6.9). В серии экспериментов по определению  $r_0$  при различных  $[I]$  и постоян-



Рис. 6.9. Зависимость обратных величин  $r_0$  и  $[S]_0$  при полном неконкурентном ингибировании

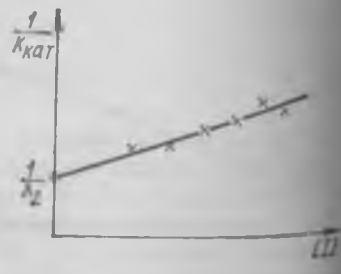


Рис. 6.10. Нахождение константы  $K_S$  при полном неконкурентном ингибировании

ных  $[S]_0$  и  $[E]_0$  на рис. 6.10 должна получаться прямая в координатах  $1/k_{\text{кат}} = f([I])$ :

$$\frac{1}{k_{\text{кат}}} = \frac{[E]_0}{r_{\max}} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_2 K_I} [I]. \quad (6.51)$$

Для обработки серии опытов по измерению  $r_0$  при различных  $[I]$  и  $[S]_0$  можно использовать координаты Диксона, поскольку уравнение (6.39) может быть приведено к виду

$$\frac{1}{r_0} = \frac{K_S + [S]_0}{k_2 [E]_0 [S]_0} + \frac{K_S + [S]_0}{k_2 K_I [E]_0 [S]_0} [I]. \quad (6.52)$$

При  $[I] = -K_I$  все прямые, описываемые зависимостью (6.52), пересекаются в общей точке на оси абсцисс (рис. 6.11). Это позволяет легко находить константу нестойкости комплекса фермента с полным неконкурентным ингибитором, а также удобно для качественного определения типа ингибитора. Пучок прямых в координатах  $1/r_0 = f([I])$  пересекается в общей точке на оси абсцисс при полном неконкурентном ингибировании и в общей точке во втором квадранте при полном конкурентном ингибировании. В обоих случаях абсцисса точки пересечения равна  $-K_I$ .

Не касаясь других случаев ингибирования, рассмотрим наиболее важный вариант активации: действие неконкурентных активаторов. Очевидно, активаторы не могут действовать по конкурентному типу, присоединяясь к активному центру фермента и препятствуя тем самым превращению субстрата. Неконкурентная активация, напротив, встречается часто, поскольку такие активаторы не влияют на образование фермент-субстратного комп-

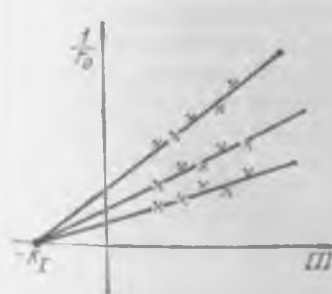


Рис. 6.11. Обработка данных при полном неконкурентном ингибировании в координатах Диксона

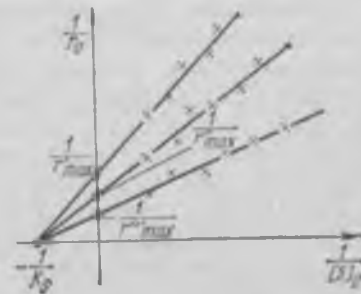
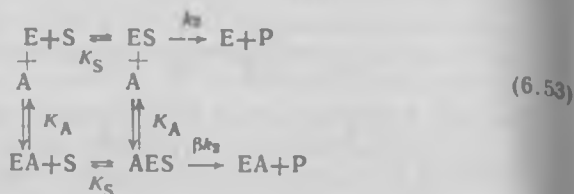


Рис. 6.12. Зависимость обратных величин  $r_0$  и  $[S]_0$  при неконкурентной активации

лекса ( $\alpha=1$ ) и ускоряют превращение субстрата в продукт ( $\beta>1$ ):



Подстановка  $\alpha=1$  в общее уравнение (6.53) приводит его к виду

$$r_p = \frac{K_A + \beta[A]}{K_A + [A]} \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S + [S]_0} \quad (6.54)$$

совпадающему с уравнением Михаэлиса — Ментен, причем

$$\frac{r_{\max}}{[E]_0} = k_{\text{кат}} = k_2 \frac{K_A + \beta[A]}{K_A + [A]} \quad (6.55)$$

В координатах Лайнуивера — Берка уравнение (6.54) дает прямую, пересекающую ось абсцисс в точке  $-1/K_S$  (рис. 6.12). Точки пересечения прямых при различных концентрациях активатора с осью ординат дают значения  $1/r_{\max}$  и соответственно  $k_{\text{кат}}$  по уравнению (6.55). Для установления кинетических характеристик в этом случае находят вначале  $k_2$  (в опытах без активатора), а далее, меняя концентрации активатора и находя  $k_{\text{кат}}$ , определяют величину  $\beta$  по графику в координатах  $1/(k_{\text{кат}}/k_2 - 1) = f(1/[A])$ , представляющему собой прямую

$$\frac{1}{k_{\text{кат}}/k_2 - 1} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{K_A}{\beta - 1} \frac{1}{[A]} \quad (6.56)$$

Более сложные случаи ингибирования и активации описываются уравнениями, аналогичными приведенным выше. В частности, двухкомпонентное ингибирование в зависимости от характера взаимодействия ингибиторов с ферментом приводит к кинетическим выражениям, определяемым как типом комплексобразования ингибитора с ферментом (конкурентное или неконкурентное), так и взаимосвязью между ингибиторами. По последнему признаку они могут быть взаимонезависимыми, т. е. способными одновременно связываться с ферментом, или взаимозависимыми, если одновременное комплексообразование двух ингибиторов с ферментом невозможно.

Полное конкурентное ингибирование взаимозависимыми ингибиторами  $I_1$  и  $I_2$  описывается уравнением

$$r_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S(1 + [I_1]/K_{I,1} + [I_2]/K_{I,2}) + [S]_0} \quad (6.57)$$

Для взаимонезависимых ингибиторов уравнение имеет вид

$$r_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s (1 + [I_1]/K_{I,1}) (1 + [I_2]/K_{I,2}) + [S]_0} \quad (6.58)$$

Полное неконкурентное ингибирование приводит к следующим кинетическим выражениям:  
для взаимозависимых ингибиторов

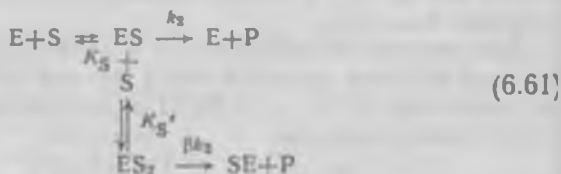
$$r_0 = \frac{k_2}{1 + [I_1]/K_{I,1} + [I_2]/K_{I,2}} \frac{[E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0}; \quad (6.59)$$

для взаимонезависимых ингибиторов

$$r_0 = \frac{k_2}{(1 + [I_1]/K_{I,1}) (1 + [I_2]/K_{I,2})} \frac{[E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0} \quad (6.60)$$

Как правило, исследование совместного ингибирования проводится для каждого ингибитора в отдельности, полученные значения констант используют далее для описания сложного процесса по одному из уравнений (6.57) — (6.60).

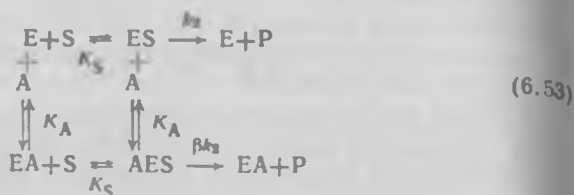
Особый интерес представляет ингибирование или активация фермента самим субстратом в отсутствие каких-либо посторонних добавок. Это становится возможным, если фермент способен образовывать комплекс не только с одной, но и с двумя молекулами реагирующего вещества:



Полная неактивность комплекса  $ES_2$  ( $\beta=0$ ) приводит к торможению субстратом. При  $0 < \beta < 1$  наблюдается ингибирование субстратом, поскольку комплекс с двумя молекулами менее активен, чем обычный фермент-субстратный комплекс. Наконец, при  $\beta > 1$  вторая молекула субстрата оказывает активирующее действие на фермент по типу неконкурентной активации. Обозначая константы нестойкости комплексов  $ES$  и  $ES_2$  через  $K_S$  и  $K_S'$ , вводя условие  $[E]_0 \ll [S]$ , можно записать уравнение материального баланса по ферменту

$$[E]_0 = [E] + \frac{[E][S]}{K_S} + \frac{[E][S]^2}{K_S K_S'} \quad (6.62)$$

лекса ( $\alpha=1$ ) и ускоряют превращение субстрата в продукт ( $\beta>1$ ):



Подстановка  $\alpha=1$  в общее уравнение (6.53) приводит его к виду

$$r_0 = \frac{K_A + \beta[A]}{K_A + [A]} \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S + [S]_0}, \quad (6.54)$$

совпадающему с уравнением Михаэлиса — Ментен, причем

$$\frac{r_{\max}}{[E]_0} = k_{\text{кат}} = k_2 \frac{K_A + \beta[A]}{K_A + [A]}. \quad (6.55)$$

В координатах Лайнуивера — Берка уравнение (6.54) дает прямую, пересекающую ось абсцисс в точке  $-1/K_S$  (рис. 6.12). Точки пересечения прямых при различных концентрациях активатора с осью ординат дают значения  $1/r_{\max}$  и соответственно  $k_{\text{кат}}$  по уравнению (6.55). Для установления кинетических характеристик в этом случае находят вначале  $k_2$  (в опытах без активатора), а далее, меняя концентрации активатора и находя  $k_{\text{кат}}$ , определяют величину  $\beta$  по графику в координатах  $1/(k_{\text{кат}}/k_2 - 1) = f(1/[A])$ , представляющему собой прямую

$$\frac{1}{k_{\text{кат}}/k_2 - 1} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{K_A}{\beta - 1} \frac{1}{[A]}. \quad (6.56)$$

Более сложные случаи ингибирования и активации описываются уравнениями, аналогичными приведенным выше. В частности, двухкомпонентное ингибирование в зависимости от характера взаимодействия ингибиторов с ферментом приводит к кинетическим выражениям, определяемым как типом комплексообразования ингибитора с ферментом (конкурентное или неконкурентное), так и взаимосвязью между ингибиторами. По последнему признаку они могут быть взаимонезависимыми, т. е. способными одновременно связываться с ферментом, или взаимозависимыми, если одновременное комплексообразование двух ингибиторов с ферментом невозможно.

Полное конкурентное ингибирование взаимозависимыми ингибиторами  $I_1$  и  $I_2$  описывается уравнением

$$r_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S(1 + [I_1]/K_{I1} + [I_2]/K_{I2}) + [S]_0}. \quad (6.57)$$

Для взаимонезависимых ингибиторов уравнение имеет вид

$$r_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s (1 + [I_1]/K_{i,1}) (1 + [I_2]/K_{i,2}) + [S]_0} \quad (6.58)$$

Полное неконкурентное ингибирование приводит к следующим кинетическим выражениям:

для взаимозависимых ингибиторов

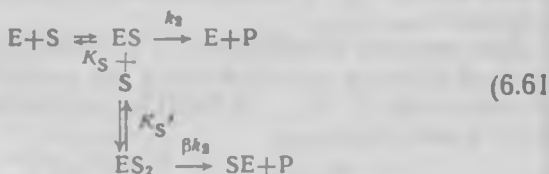
$$r_0 = \frac{\frac{k_2}{1 + [I_1]/K_{i,1} + [I_2]/K_{i,2}} [E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0}; \quad (6.59)$$

для взаимонезависимых ингибиторов

$$r_0 = \frac{\frac{k_2}{(1 + [I_1]/K_{i,1}) (1 + [I_2]/K_{i,2})} [E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0} \quad (6.60)$$

Как правило, исследование совместного ингибирования проводится для каждого ингибитора в отдельности, полученные значения констант используют далее для описания сложного процесса по одному из уравнений (6.57) — (6.60).

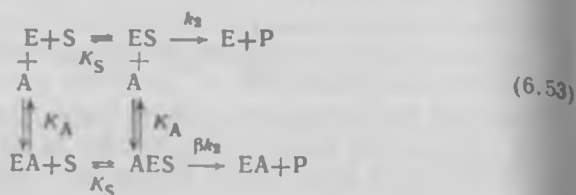
Особый интерес представляет ингибирование или активация фермента самим субстратом в отсутствие каких-либо посторонних добавок. Это становится возможным, если фермент способен образовывать комплекс не только с одной, но и с двумя молекулами реагирующего вещества:



Полная неактивность комплекса  $ES_2$  ( $\beta=0$ ) приводит к томожению субстратом. При  $0 < \beta < 1$  наблюдается ингибирование субстратом, поскольку комплекс с двумя молекулами менее активен, чем обычный фермент-субстратный комплекс. Наконец, при  $\beta > 1$  вторая молекула субстрата оказывает активирующее действие на фермент по типу неконкурентной активации. Обозначив константы нестойкости комплексов  $ES$  и  $ES_2$  через  $K_s$  и  $K_s'$ , вводя условие  $[E]_0 \ll [S]$ , можно записать уравнение материального баланса по ферменту

$$[E]_0 = [E] + \frac{[E][S]}{K_s} + \frac{[E][S]^2}{K_s K_s'} \quad (6.62)$$

лекса ( $\alpha=1$ ) и ускоряют превращение субстрата в продукт ( $\beta>1$ ):



Подстановка  $\alpha=1$  в общее уравнение (6.53) приводит его к виду

$$r_0 = \frac{K_A + \beta[A]}{K_A + [A]} \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S + [S]_0}, \quad (6.54)$$

совпадающему с уравнением Михаэлиса — Ментен, причем

$$\frac{r_{\max}}{[E]_0} = k_{\text{кат}} = k_2 \frac{K_A + \beta[A]}{K_A + [A]}. \quad (6.55)$$

В координатах Лайнуивера — Берка уравнение (6.54) дает прямую, пересекающую ось абсцисс в точке  $-1/K_S$  (рис. 6.12). Точки пересечения прямых при различных концентрациях активатора с осью ординат дают значения  $1/r_{\max}$  и соответственно  $k_{\text{кат}}$  по уравнению (6.55). Для установления кинетических характеристик в этом случае находят вначале  $k_2$  (в опытах без активатора), а далее, меняя концентрации активатора и находя  $k_{\text{кат}}$ , определяют величину  $\beta$  по графику в координатах  $1/(k_{\text{кат}}/k_2 - 1) = f(1/[A])$ , представляющему собой прямую

$$\frac{1}{k_{\text{кат}}/k_2 - 1} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{K_A}{\beta - 1} \frac{1}{[A]}. \quad (6.56)$$

Более сложные случаи ингибирования и активации описываются уравнениями, аналогичными приведенным выше. В частности, двухкомпонентное ингибирование в зависимости от характера взаимодействия ингибиторов с ферментом приводит к кинетическим выражениям, определяемым как типом комплексообразования ингибитора с ферментом (конкурентное или неконкурентное), так и взаимосвязью между ингибиторами. По последнему признаку они могут быть взаимонезависимыми, т. е. способными одновременно связываться с ферментом, или взаимозависимыми, если одновременное комплексообразование двух ингибиторов с ферментом невозможно.

Полное конкурентное ингибирование взаимозависимыми ингибиторами  $I_1$  и  $I_2$  описывается уравнением

$$r_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S(1 + [I_1]/K_{I,1} + [I_2]/K_{I,2}) + [S]_0}. \quad (6.57)$$

Для взаимонезависимых ингибиторов уравнение имеет вид

$$r_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s (1 + [I_1]/K_{i,1}) (1 + [I_2]/K_{i,2}) + [S]_0} \quad (6.58)$$

Полное неконкурентное ингибирование приводит к следующим кинетическим выражениям:

для взаимозависимых ингибиторов

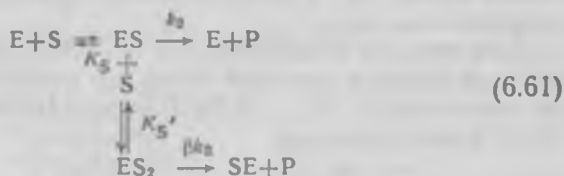
$$r_0 = \frac{k_2}{K_s + [S]_0} \frac{[E]_0 [S]_0}{1 + [I_1]/K_{i,1} + [I_2]/K_{i,2}}; \quad (6.59)$$

для взаимонезависимых ингибиторов

$$r_0 = \frac{k_2}{K_s + [S]_0} \frac{[E]_0 [S]_0}{(1 + [I_1]/K_{i,1}) (1 + [I_2]/K_{i,2})} \quad (6.60)$$

Как правило, исследование совместного ингибирования проводится для каждого ингибитора в отдельности, полученные значения констант используют далее для описания сложного процесса по одному из уравнений (6.57) — (6.60).

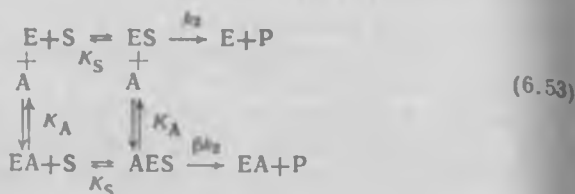
Особый интерес представляет ингибирование или активация фермента самим субстратом в отсутствие каких-либо посторонних добавок. Это становится возможным, если фермент способен образовывать комплекс не только с одной, но и с двумя молекулами реагирующего вещества:



Полная неактивность комплекса  $ES_2$  ( $\beta=0$ ) приводит к торможению субстратом. При  $0 < \beta < 1$  наблюдается ингибирование субстратом, поскольку комплекс с двумя молекулами менее активен, чем обычный фермент-субстратный комплекс. Наконец, при  $\beta > 1$  вторая молекула субстрата оказывает активирующее действие на фермент по типу неконкурентной активации. Обозначая константы нестойкости комплексов  $ES$  и  $ES_2$  через  $K_S$  и  $K_{S'}$  и вводя условие  $[E]_0 \ll [S]$ , можно записать уравнение материального баланса по ферменту

$$[E]_0 = [E] + \frac{[E][S]}{K_S} + \frac{[E][S]^2}{K_S K_{S'}} \quad (6.62)$$

лекса ( $\alpha=1$ ) и ускоряют превращение субстрата в продукт ( $\beta>1$ ):



Подстановка  $\alpha=1$  в общее уравнение (6.53) приводит его к виду

$$r_0 = \frac{K_A + \beta[A]}{K_A + [A]} \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S + [S]_0} \quad (6.54)$$

совпадающему с уравнением Михаэлса — Ментен, причем

$$\frac{r_{\max}}{[E]_0} = k_{\text{кат}} = k_2 \frac{K_A + \beta[A]}{K_A + [A]} \quad (6.55)$$

В координатах Лайнуивера — Берка уравнение (6.54) дает прямую, пересекающую ось абсцисс в точке  $-1/K_S$  (рис. 6.12). Точки пересечения прямых при различных концентрациях активатора с осью ординат дают значения  $1/r_{\max}$  и соответственно  $k_{\text{кат}}$  по уравнению (6.55). Для установления кинетических характеристик в этом случае находят вначале  $k_2$  (в опытах без активатора), а далее, меняя концентрации активатора и находя  $k_{\text{кат}}$ , определяют величину  $\beta$  по графику в координатах  $1/(k_{\text{кат}}/k_2 - 1) = f(1/[A])$ , представляющему собой прямую

$$\frac{1}{k_{\text{кат}}/k_2 - 1} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{K_A}{\beta - 1} \frac{1}{[A]} \quad (6.56)$$

Более сложные случаи ингибирования и активации описываются уравнениями, аналогичными приведенным выше. В частности, двухкомпонентное ингибирование в зависимости от характера взаимодействия ингибиторов с ферментом приводит к кинетическим выражениям, определяемым как типом комплексобразования ингибитора с ферментом (конкурентное или неконкурентное), так и взаимосвязью между ингибиторами. По последнему признаку они могут быть взаимонезависимыми, т. е. способными одновременно связываться с ферментом, или взаимозависимыми, если одновременное комплексобразование двух ингибиторов с ферментом невозможно.

Полное конкурентное ингибирование взаимозависимыми ингибиторами  $I_1$  и  $I_2$  описывается уравнением

$$r_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S(1 + [I_1]/K_{I,1} + [I_2]/K_{I,2}) + [S]_0} \quad (6.57)$$

Для взаимонезависимых ингибиторов уравнение имеет вид

$$r_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s (1 + [I_1]/K_{I,1}) (1 + [I_2]/K_{I,2}) + [S]_0} \quad (6.58)$$

Полное неконкурентное ингибирование приводит к следующим кинетическим выражениям:

для взаимозависимых ингибиторов

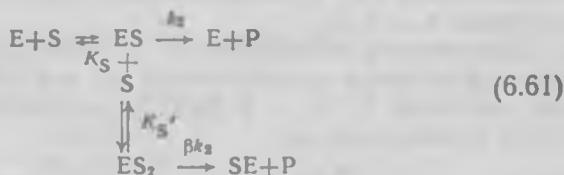
$$r_0 = \frac{k_2}{K_s + [S]_0} \frac{[E]_0 [S]_0}{1 + [I_1]/K_{I,1} + [I_2]/K_{I,2}}; \quad (6.59)$$

для взаимонезависимых ингибиторов

$$r_0 = \frac{k_2}{K_s + [S]_0} \frac{[I_1]_0 [S]_0}{(1 + [I_1]/K_{I,1}) (1 + [I_2]/K_{I,2})} \quad (6.60)$$

Как правило, исследование совместного ингибирования проводится для каждого ингибитора в отдельности, полученные значения констант используют далее для описания сложного процесса по одному из уравнений (6.57) — (6.60).

Особый интерес представляет ингибирование или активация фермента самим субстратом в отсутствие каких-либо посторонних добавок. Это становится возможным, если фермент способен образовывать комплекс не только с одной, но и с двумя молекулами реагирующего вещества:



Полная неактивность комплекса  $ES_2$  ( $\beta=0$ ) приводит к торможению субстратом. При  $0 < \beta < 1$  наблюдается ингибирование субстратом, поскольку комплекс с двумя молекулами менее активен, чем обычный фермент-субстратный комплекс. Наконец, при  $\beta > 1$  вторая молекула субстрата оказывает активирующее действие на фермент по типу неконкурентной активации. Обозначая константы нестойкости комплексов  $ES$  и  $ES_2$  через  $K_s$  и  $K_s'$  и вводя условие  $[E]_0 \ll [S]$ , можно записать уравнение материального баланса по ферменту

$$[E]_0 = [E] + \frac{[E][S]}{K_s} + \frac{[E][S]^2}{K_s K_s'} \quad (6.62)$$

и выразить скорость превращения субстрата

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_2[ES] + \beta k_2[ES_2],$$

откуда

$$r_0 = \frac{\left(k_2 + \frac{\beta k_2[S]_0}{K_{S'}}\right)[E]_0[S]_0}{K_S + [S]_0 + [S]_0^2/K_{S'}}. \quad (6.53)$$

Особенно частый случай торможения субстратом, когда  $\beta=0$ , приводит к зависимости

$$r_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S + [S]_0 + [S]_0^2/K_{S'}}, \quad (6.54)$$

которая заметно отличается от обычного уравнения Михаэлиса — Ментен и переходит в него только при достаточно малых концентрациях субстрата, когда  $[S]_0^2 \ll K_{S'}$  и членом  $[S]_0^2/K_{S'}$  в знаменателе можно пренебречь.

При больших концентрациях  $[S]_0$  обычно удается достичь выполнения неравенства  $[S]_0 \gg K_S$ , при котором константой в знаменателе можно пренебречь; уравнение (6.54) приобретает вид

$$r_0 = \frac{k_2[E]_0}{1 + [S]_0/K_{S'}},$$

или

$$\frac{1}{r_0} = \frac{1}{r_{\max}} + \frac{1}{r_{\max}K_{S'}}[S]_0. \quad (6.55)$$

По линейной зависимости (6.55) в координатах  $1/r_0 = f([S]_0)$  можно найти  $K_{S'}$  и дополнительно проверить найденные ранее величины  $r_{\max}$  и  $k_2$ .

Для случаев ингибирования и активации субстратом стратегия исследования остается такой же: при очень малых  $[S]_0$  находят константы  $k_2$  ( $r_{\max}$ ) и  $K_S$ . При достаточно больших  $[S]_0$  уравнение (6.53) приобретает вид

$$\frac{r_0}{[E]_0} = k_{\text{кат}} = k_2 \frac{1 + \beta[S]_0/K_{S'}}{1 + [S]_0/K_{S'}}. \quad (6.56)$$

Для нахождения неизвестных значений  $\beta$  и  $K_{S'}$  эта зависимость преобразуется к виду:

при  $0 < \beta < 1$  (ингибирование)

$$k_{\text{эф}} = \frac{1}{1 - \frac{r_0/[E]_0}{k_2}} = \frac{1}{1 - \beta} + \frac{K_{S'}}{1 - \beta} \frac{1}{[S]_0}; \quad (6.67)$$

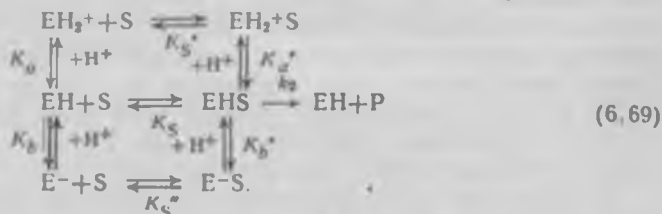
при  $\beta > 1$  (активация)

$$k_{\text{эф}} = \frac{1}{\frac{r_0/[E]_0}{k_2} - 1} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{K_{S'}}{\beta - 1} \frac{1}{[S]_0}. \quad (6.68)$$

Две последние зависимости дают прямые в координатах,  $k_{\text{эф}} = f(1/[S]_0)$ , что позволяет определить  $\beta$  и  $K_s'$ , поскольку  $k_2$  найдено из экспериментов при малых концентрациях субстрата.

Рассматривая ингибирование и активацию ферментов как общее явление, можно заключить, что при воздействии посторонних веществ кинетика реакции описывается уравнением типа Михаэлиса — Ментен с видоизмененными константами. Дополнительное влияние самого субстрата заметно меняет вид кинетической зависимости, которая только в определенных условиях — при достаточно малых  $[S]_0$  — переходит в уравнение Михаэлиса — Ментен.

В рамках общих представлений об ингибировании и активации ферментов удастся объяснить и количественно описать влияние pH среды на скорость ферментативных превращений. В этом случае обычно предполагают, что сам фермент содержит как активные атомы водорода, способные отщепляться в виде протона, так и центры, способные протонироваться извне. Обозначая «нормальную» форму фермента через EH, а его протонированную и депротонированную формы через  $\text{EH}_2^+$  и  $\text{E}^-$ , можно представить обобщенную схему влияния pH на ферментативные реакции:



Значения констант равновесия в схеме (6.69)

$$K_s = \frac{[\text{EH}][\text{S}]}{[\text{EHS}]}; \quad K_a = \frac{[\text{EH}][\text{H}^+]}{[\text{EH}_2^+]}; \quad K_b = \frac{[\text{E}^-][\text{H}^+]}{[\text{EH}]}; \\
 K_a' = \frac{[\text{EHS}][\text{H}^+]}{[\text{EH}_2^+ \text{S}]}; \quad K_b' = \frac{[\text{E}^- \text{S}][\text{H}^+]}{[\text{EHS}]}$$

дают возможность записать уравнение материального баланса по ферменту, учитывающего его формы:

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}^-] + [\text{EH}] + [\text{EH}_2^+] + [\text{EHS}] + [\text{EH}_2^+ \text{S}] + [\text{E}^- \text{S}],$$

$$\begin{aligned}
 \text{или } [\text{E}]_0 = & [\text{E}^-] + \frac{[\text{E}^-][\text{H}^+]}{K_b} + \frac{[\text{E}^-][\text{H}^+]^2}{K_a K_b} + \\
 & + \frac{[\text{E}^-][\text{H}^+][\text{S}]}{K_b K_s} + \frac{[\text{E}^-][\text{H}^+]^2[\text{S}]}{K_b K_s K_a'} + \frac{K_b'[\text{E}^-][\text{S}]}{K_b K_s}.
 \end{aligned}$$

Скорость расходования субстрата

$$-\frac{d[\text{S}]}{d\tau} = k_2[\text{EHS}] = k_2 \frac{[\text{E}^-][\text{H}^+][\text{S}]}{K_b K_s}$$

может быть получена подстановкой  $E^-$  из материального баланса

$$r = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_s \frac{1 + [H^+]/K'_a + K'_b/[H^+]}{1 + [H^+]/K_a + K_b/[H^+]} + [S]} \quad (6.70)$$

Начальную скорость реакции находят из выражения (6.70) и записывают в виде уравнения Михаэлиса — Ментен:

$$r_0 = \frac{k_{кат} [E]_0 [S]_0}{K''_{мн} + [S]_0} \quad (6.71)$$

причем

$$\left. \begin{aligned} k_{кат} &= \frac{k_2}{1 + [H^+]/K'_a + K'_b/[H^+]} \\ K''_{мн} &= K_s \frac{1 + [H^+]/K_a + K_b/[H^+]}{1 + [H^+]/K'_a + K'_b/[H^+]} \end{aligned} \right\} \quad (6.72)$$

Схема (6.69) раскрывает зависимость скорости ферментативных реакций от pH, т. е. от  $[H^+]$ , которая хорошо согласуется с экспериментальными данными, поскольку и константа скорости распада фермент-субстратного комплекса в продукты  $k_2$  и константа нестойкости этого комплекса  $K_s$  входят в выражения (6.72) в виде сомножителей. Второй член этих произведений меняется с изменением кислотности среды. Соответствуют эксперименту и частные случаи общей зависимости (6.71):

а) активный центр фермента полностью дезактивируется как при протонировании ( $K'_a \rightarrow \infty$ ), так и при отщеплении протона ( $K'_b \rightarrow 0$ ), тогда

$$r_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s (1 + [H^+]/K_a + K_b/[H^+]) + [S]_0} \quad (6.73)$$

Форма уравнения (6.73) показывает, что этот случай аналогичен полному конкурентному ингибированию;

б) ионизация фермента не влияет на активный центр, а фермент-субстратный комплекс ионизируется так же, как и свободный фермент, т. е.  $K_a = K'_a$ ,  $K_b = K'_b$ ,  $K_s = K'_s = K''_s$ , в этом случае

$$r_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0} \quad (6.74)$$

и уравнение аналогично зависимости, описывающей полное неконкурентное ингибирование.

В общем случае исследование pH-зависимости скорости фер-

ментативных реакций проводят в виде серии экспериментов при разных рН. При этом протонирование и депротонирование фермент-субстратного комплекса ( $K_a'$ ,  $K_b'$ ) удобно оценивать по зависимости  $k_{кат}$  от  $[H^+]$ . Для нахождения  $K_a$  и  $K_b$ , характеризующих фермент, обычно используют значения отношения  $k_{кат}/K_M''$  при разных рН, поскольку согласно (6.72)

$$\frac{k_{кат}}{K_M''} = \frac{k_2/K_b}{1 + [H^+]/K_a + K_b/[H^+]}. \quad (6.75)$$

Оценка величин  $K_a$  и  $K_b$  может быть проведена по колоколообразной кривой в координатах  $\ln(k_{кат}/K_M'') = f(\text{pH})$ , как это показано на рис. 6.13.

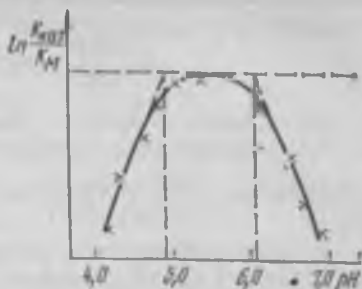
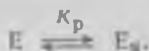
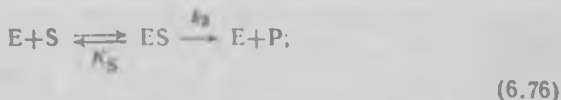


Рис. 6.13. Оценка констант  $K_a$  и  $K_b$  по влиянию рН на скорость ферментативных реакций

### § 6.3. Учет спонтанной инактивации ферментов в ходе ферментативных превращений

Потеря активности, связанная с переходом фермента в неактивную форму, является причиной снижения производительности биореакторов и должна обязательно учитываться при создании биотехнологических процессов. При этом требуется тщательно исследовать причины инактивации, что позволяет подобрать условия, при которых сохраняется наивысшая возможная активность фермента.

Изомеризация ферментов под воздействием факторов окружающей среды часто приводит к обратимой инактивации, протекающей в ходе реакции по схеме



По этой схеме концентрации активной  $[E]$  и неактивной  $[E_n]$  форм фермента связаны через константу равновесия изомеризации:  $[E_n] = K_p[E]$ .

Концентрация свободного фермента, найденная из материального баланса по ферменту (при условии  $[E]_0 \ll [S]$ )

$$[E] = \frac{K_p[E]_0}{K_S + [S] + K_p K_S},$$

следовательно, скорость процесса

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_s + [S] + K_r K_s} \quad (6.77)$$

Начальная скорость реакции, выраженная по уравнению (6.77), преобразуется к виду

$$r_0 = -\frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_s + [S]_0 + K_r K_s} = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_s + [S]_0} \frac{1 + [S]_0/K_s}{1 + [S]_0/K_s + K_r} \quad (6.78)$$

Анализ уравнения в форме (6.78) показывает, что при больших значениях  $[S]_0$  может быть выполнено неравенство  $(1 + [S]_0/K_s) \gg K_r$ , когда уравнение (6.78) приводится к уравнению Михаэлиса — Ментен, т. е. инактивации фермента практически не происходит. Напротив, при достаточно малых  $[S]_0$ , когда  $[S]_0 \ll K_s$  и  $[S]_0/K_s \ll 1$ , равенство (6.78) приобретает вид

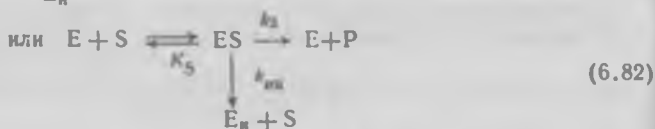
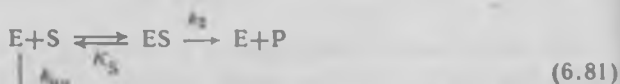
$$r_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_s(1 + K_r)} \quad (6.79)$$

или в обращенной форме

$$\frac{1}{r_0} = (1 + K_r) \frac{K_s}{k_2[E]_0} \frac{1}{[S]_0} \quad (6.80)$$

Таким образом, при малых начальных концентрациях субстрата зависимость  $1/r_0 = f(1/[S]_0)$  линейна, однако прямая проходит через начало координат, тогда как при больших  $[S]_0$  в тех же координатах Лайнуивера — Берка получается нормальная зависимость, позволяющая найти  $r_{\max}$  и  $K_s$ . Исследования в широком интервале  $[S]_0$  позволяют не только качественно обнаружить обратную инактивацию фермента, но и найти константу равновесия  $K_r$ .

Значительно большую опасность с точки зрения технологического применения представляет необратимая инактивация фермента в ходе реакции. Результатом этого часто является неполное превращение субстрата, часть которого не успевает прореагировать до полной инактивации фермента. Дезактивация ферментов может протекать по-разному в зависимости от влияния субстрата на этот процесс. Последний может либо предохранять фермент, если комплекс ES неспособен к инактивации, либо способствовать потере активности:



Если общую концентрацию фермента, сохранившего активность к данному моменту, обозначить  $[E^*]_0$ , то на всем протяжении реакции сохраняются равенства

$$\begin{aligned} [E]_0 &= [E^*]_0 + [E_*]; \\ [E^*]_0 &= [E] + [ES]. \end{aligned} \quad (6.83)$$

В первом варианте, когда инактивируется только свободный фермент, скорость дезактивации

$$-\frac{d[E^*]_0}{d\tau} = k_{ин}[E], \quad (6.84)$$

где  $k_{ин}$  — константа скорости инактивации, а скорость расхода субстрата

$$-\frac{d[S]}{d\tau} = k_1[ES] = k_2 \frac{[E][S]}{K_S}. \quad (6.85)$$

Отношение (6.84) к (6.85) приводит к равенству

$$\frac{d[E^*]_0}{d[S]} = \frac{k_{ин}[E]K_S}{k_2[E][S]} = \frac{k_{ин}K_S}{k_2[S]}. \quad (6.86)$$

Разделение переменных позволяет проинтегрировать уравнение (6.86) с учетом начальных условий: при  $\tau=0$   $[E^*]_0 = [E]_0$  и  $[S] = [S]_0$

$$\int_{[E]_0}^{[E^*]_0} d[E^*]_0 = \frac{k_{ин}K_S}{k_2} \int_{[S]_0}^{[S]} \frac{d[S]}{[S]}, \quad (6.87)$$

откуда

$$[E^*]_0 = [E]_0 - \frac{k_{ин}K_S}{k_2} \ln \frac{[S]_0}{[S]}. \quad (6.88)$$

При полной инактивации фермента  $[E^*]_0$  обращается в нуль, при этом часть субстрата  $[S]_к$  остается непревращенной, последняя величина может быть легко определена в эксперименте.

Зная  $[S]_к$ , можно вычислить константу скорости инактивации  $k_{ин}$ , поскольку

$$[E]_0 = \frac{k_{ин}K_S}{k_2} \ln \frac{[S]_0}{[S]_к} \quad (6.89)$$

$$\text{или } k_{ин} = \frac{r_{max}}{K_S \ln \frac{[S]_0}{[S]_к}}, \quad (6.90)$$

а  $r_{max}$  и  $K_S$  известны из независимых опытов.

Второй вариант, когда инактивируется фермент-субстратный комплекс, приводит к следующим выражениям:

$$\left. \begin{aligned} -\frac{d[E^*]_0}{dt} &= k_{ин}[ES]; \\ -\frac{d[S]}{dt} &= k_2[ES], \end{aligned} \right\} \quad (6.91)$$

$$\text{т.е.} \quad \frac{d[E^*]_0}{d[S]} = \frac{k_{ин}}{k_2} \quad (6.92)$$

Интегрирование при тех же начальных условиях дает

$$[E]_0 - [E^*]_0 = \frac{k_{ин}}{k_1} ([S]_0 - [S]). \quad (6.93)$$

Когда  $[E^*]_0 = 0$  и  $[S] = [S]_k$ ,

$$[E]_0 = \frac{k_{ин}}{k_2} ([S]_0 - [S]_k). \quad (6.94)$$

$$\text{или} \quad k_{мин} = \frac{r_{мин}}{[S]_0 - [S]_k}. \quad (6.95)$$

Сравнивая выражения (6.90) и (6.95), можно показать способ различить два описанных варианта инактивации: при проведении серии опытов с разными начальными концентрациями субстрата  $[S]_0$  конечные концентрации  $[S]_k$  должны получаться такими, чтобы в первом случае сохранялось постоянным отношение  $[S]_0/[S]_k$ , а во втором — разность  $([S]_0 - [S]_k)$ . Очевидно, исследование склонности ферментов к необратимой инактивации позволяет выявить влияние внешних факторов — температуры, pH, природы растворителя и т. п. — на величину  $k_{ин}$  и тем самым обосновать выбор оптимального режима процесса.

#### § 6.4. Влияние температуры на скорость ферментативных реакций

Константа скорости превращения фермент-субстратного комплекса  $k_2$  меняется с температурой по уравнению Аррениуса

$$k_2 = k_{2,0} \exp(-e/RT), \quad (6.96)$$

где  $k_{2,0}$  — предэкспонента.

Независимо от величины энергии активации  $e$  константа  $k_2$  всегда растет с температурой.

Если рассматривать уравнение Михаэлиса — Ментен в форме, содержащей в знаменателе константу нестойкости фермент-субстратного комплекса  $K_s$ , то температурные изменения этой кон-

станты, как и любой константы равновесия, подчиняются закону

$$\frac{d \ln K_s}{dT} = \frac{\Delta H_p^0}{RT^2}, \quad (6.97)$$

где  $\Delta H_p^0$  — теплота распада комплекса на исходные вещества.

Рост или снижение  $K_s$  с температурой определяет знак  $\Delta H_p^0$ , и можно сказать, что большинство экспериментальных значений  $K_s$  находятся в пределах  $10^{-3}$ — $10^{-5}$  моль/л, т. е. фермент-субстратный комплекс образуется с константой равновесия  $\sim 10^4$  л/моль, а значит, для этого процесса  $\Delta G^0$  имеет отрицательное значение. С другой стороны, если не учитывать влияния растворителя, соединение фермента и субстрата в единую частицу протекает с отрицательным изменением энтропии, как и все реакции, протекающие с уменьшением числа молей реагирующих веществ, т. е.  $\Delta S^0 < 0$ . В таком случае оказывается, что в равенстве  $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$ , описывающем термодинамику образования комплекса ES, левая часть отрицательна, а член  $(-T\Delta S^0)$  — положителен, что может иметь место только при  $\Delta H^0 < 0$ . Сольватация фермента и субстрата может отразиться на знаке  $\Delta S^0$ , что затруднит вывод о величине  $\Delta H^0$ .

Часто оказывается, тем не менее, что теплота образования фермент-субстратного комплекса отрицательна, а теплота обратной реакции его распада — положительна, т. е. разложение комплекса ES на исходные вещества протекает как эндотермический процесс с  $\Delta H_p^0 > 0$ . Из этого вывода следует, что константа  $K_s$  будет расти с температурой по уравнению (6.97), имеющему положительную правую часть. Если пренебречь температурной зависимостью величины  $\Delta H_p^0$ , то в интегральном виде

$$K_s = K_{s,0} \exp \left( -\frac{\Delta H_p^0}{RT} \right) \quad (6.98)$$

и уравнение Михаэлиса — Ментен приобретает вид

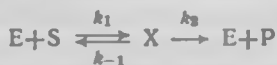
$$r_0 = \frac{k_{2,0} \exp(-e/RT) [E]_0 [S]_0}{K_{s,0} \exp(\Delta H^0/RT) + [S]_0}. \quad (6.99)$$

Рост с температурой констант  $k_2$  и  $K_s$  в числителе и знаменателе уравнения (6.99) не позволяет сделать однозначного теоретического заключения о влиянии температуры на скорость  $r_0$ . На практике оказывается, что скорость ферментативных реакций растет при низких температурах, проходит через более или менее пологий максимум и падает в той температурной области, где начинается термическая деструкция ферментов, в основном из-за денатурации их белковой части. Это заставляет при технологическом использовании ферментов обязательно поддерживать температуру в пределах оптимума, найденного экспериментально, и

делает понятным интерес исследователей и технологов к ферментам термофильных микроорганизмов, имеющим оптимум активности при 70—80 °C и выше.

Рассмотрение более общего вида уравнения Михаэлиса — Ментен, включающего в знаменателе константу  $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$ , позволяет точнее описать температурную зависимость скорости ферментативных реакций. Однако для этого необходимо раздельное знание констант скорости образования ( $k_1$ ) и распада ( $k_{-1}$ ) фермент-субстратного комплекса и его превращения в продукты ( $k_2$ ). В стационарных условиях ( $[E]_0 \ll [S]$ ) может быть найдено только значение  $k_2$  (из  $r_{max} = k_2[E]_0$ ), тогда как  $k_2$  и  $k_{-1}$  определяют совместно в виде  $K_M$ . Для нахождения  $k_1$  и  $k_{-1}$  приходится прибегать к исследованиям ферментативных процессов в нестационарной области.

Для простейшей схемы реакции



скорость накопления продукта

$$d[P]/d\tau = k_2[X],$$

причем промежуточный комплекс  $X$  образуется и расходуется со скоростью

$$d[X]/d\tau = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[X].$$

На всем протяжении реакции сохраняются равенства

$$[E]_0 = [E] + [X];$$

$$[S]_0 = [S] + [X] + [P]. \quad (6.100)$$

При выполнении условия  $[E]_0 \gg [S]_0$  долей фермента в составе комплекса  $X$  можно пренебречь, считая, что  $[E]_0 \approx [E]$ . В этом случае  $X$  накапливается как обычный промежуточный продукт. Выражая текущую концентрацию  $[S]$  из (6.100) как  $[S] = [S]_0 - [P] - [X]$  и подставляя ее в уравнение скорости, получаем

$$d[X]/d\tau = k_1[E]_0([S]_0 - [P] - [X]) - (k_{-1} + k_2)[X]$$

и далее после повторного дифференцирования

$$\frac{d^2[X]}{d\tau^2} = k_1[E]_0 \left( \frac{d[P]}{d\tau} - \frac{d[X]}{d\tau} \right) - (k_{-1} + k_2) \frac{d[X]}{d\tau}.$$

Поскольку  $d[P]/d\tau = k_2[X]$ , то

$$\frac{d^2[X]}{d\tau^2} + (k_{-1} + k_2 + k_1[E]_0) \frac{d[X]}{d\tau} + k_1 k_2 [E]_0 [X] = 0.$$

Это линейное дифференциальное уравнение второго порядка имеет решение

$$[X] = k_2[E][S]_0 \left( \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_1 \tau} + \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1} e^{\lambda_2 \tau} \right), \quad (6.101)$$

причем

$$\lambda_{1,2} = -\frac{k_1[E]_0 + k_{-1} + k_2}{2} \pm \sqrt{\frac{(k_1[E]_0 + k_{-1} + k_2)^2}{4} - k_1 k_2 [E]_0}.$$

Дифференцирование уравнения (6.101) позволяет найти текущую концентрацию субстрата

$$[S] = [S]_0 \left( \frac{\lambda_1 + k_{-1} + k_2}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_1 \tau} + \frac{\lambda_2 + k_{-1} + k_2}{\lambda_2 - \lambda_1} e^{\lambda_2 \tau} \right) \quad (6.102)$$

и продукта

$$[P] = k_1 k_2 [E][S]_0 \left[ \frac{1}{\lambda_1(\lambda_1 - \lambda_2)} (e^{\lambda_1 \tau} - 1) + \frac{1}{\lambda_2(\lambda_2 - \lambda_1)} (e^{\lambda_2 \tau} - 1) \right]. \quad (6.103)$$

Экспериментальное исследование текущих концентраций субстрата и продукта, а если возможно, и комплекса  $X$  (рис. 6.14) позволяет найти значения всех кинетических констант. Хотя основная цель оказывается достигнутой, этот метод не пользуется популярностью у исследователей не только потому, что требует большого расхода фермента, но и из-за возможных посторонних влияний на протяжении эксперимента, занимающего довольно длительное время.

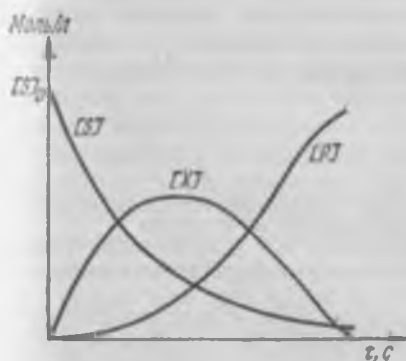


Рис. 6.14. Кинетические кривые субстрата  $[S]$ , продукта  $[P]$  и промежуточного комплекса  $[X]$  в нестационарном режиме ( $E_0 \gg [S]_0$ )

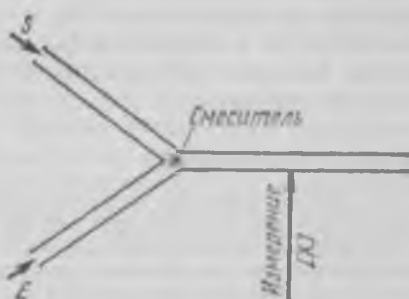


Рис. 6.15. Схема струйного реактора для исследования предстационарной кинетики ферментативных реакций

В последние годы с развитием экспериментальной техники большую популярность приобрело исследование так называемой предстационарной кинетики ферментативных реакций, основанное на изучении текущей концентрации фермент-субстратного комплекса  $X$  в условиях  $[E]_0 \ll [S]_0$  в тот промежуток времени, пока еще не достигнуто стационарное состояние. В этом случае  $[E] = [E]_0 - [X]$  и

$$d[X]/d\tau = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[X] = k_1[S]([E]_0 - [X]) - (k_{-1} + k_2)[X].$$

На коротком отрезке времени до установления стационарного состояния  $[S] \approx [S]_0 = \text{const.}$  Решение дифференциального уравнения (при условии  $\tau = 0$ ;  $[X] = 0$ ):

$$[X] = \frac{[E]_0[S]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]_0} [1 - e^{-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)\tau}]. \quad (6.104)$$

При увеличении  $\tau[X]$  стремится к стационарному значению

$$[X]_{\text{стац}} = \frac{[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0}.$$

Как показывает эксперимент, время достижения стационарного значения  $[X]_{\text{стац}} = 10^{-6} \div 10^{-2}$  с. Проведение эксперимента за такое короткое время требует использования специальных методов, обычно основанных на применении соответствующей техники (рис. 6.15). Таким методом было найдено, что образование фермент-субстратного комплекса происходит с константой скорости порядка  $k_1 = 10^6 \div 10^{10}$  моль/л·с, тогда как константа Михаэлиса — Ментен  $K_M$  имеет значение порядка  $10^{-5} \div 10^{-3}$  моль/л. Зная величины  $k_1$ ,  $k_{-1}$  и  $k_2$ , можно количественно определить температурную зависимость  $K_M$  и таким образом выявить влияние температуры на скорость ферментативной реакции, а также получить важную информацию о механизме каталитического действия фермента.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы основные достоинства и недостатки дифференциального и интегрального методов изучения кинетики ферментативных реакций?
2. Какова точность результатов, получаемых при использовании разных типов координат (см. в тексте) для обработки экспериментальных данных по кинетике ферментативных реакций?
3. Как вы объясняете различия в механизме взаимодействия ферментов с конкурентными и неконкурентными ингибиторами? Почему не может быть конкурентных активаторов?
4. Какую роль играет протонирование в рамках схемы, объясняющей влияние pH среды на активность ферментов?
5. Известно, что ферментативная реакция ингибируется продуктом и тормозится субстратом. Как поставить и обработать эксперименты по кинетическому описанию такой ферментативной реакции?

6. Ферменты одного и того же типа могут быть получены из психрофильных, мезофильных и термофильных микроорганизмов, при этом они имеют почти одинаковую активность при соответствующей оптимальной температуре и близки по стойкости. Какие соображения могут послужить основой для выбора того или иного образца при практическом осуществлении процесса?

7. Некоторый ферментный препарат выбран для использования в промышленном процессе. Какие сведения об этом ферменте должен иметь инженер-проектировщик и как он будет их использовать в ходе проектирования биореактора?

8. Гидролиз бензилпенициллина, катализируемый пенициллинамидазой, при  $25^\circ\text{C}$  и pH 7,5 протекает с кинетическими параметрами  $k_2 = 1,5 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_M = 3 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$  и ингибируется продуктом — фенилуксусной кислотой с константой  $K_I = 3 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ . Какова степень конверсии субстрата за 15, 30 и 60 мин, если начальные концентрации субстрата и фермента равны соответственно  $1 \cdot 10^{-2} \text{ моль/л}$  и  $2 \cdot 10^{-7} \text{ моль/л}$ ?

9. При изучении ферментативной реакции методом начальных скоростей удалось найти параметры  $k_2 = 0,6 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_M = 4 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$  ( $[E]_0 = 2,1 \cdot 10^4 \text{ моль/л}$ ). Дальнейшие исследования показали, что процесс превращения субстрата не удается завершить, причем конечные концентрации субстрата  $[S]_x$  связаны с его начальными концентрациями  $[S]_0$  следующими соотношениями:

|                                    |       |       |       |       |       |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $[S]_0 \cdot 10^4, \text{ моль/л}$ | 0,125 | 0,143 | 0,167 | 0,210 | 0,250 |
| $[S]_x \cdot 10^4, \text{ моль/л}$ | 0,068 | 0,086 | 0,110 | 0,151 | 0,193 |

Как вы объясните и количественно опишете наблюдаемое явление?

10. Как вы оцените допустимое время смешения потоков субстрата и фермента при изучении нестационарной кинетики ферментативных реакций методом «составленной струи»?

## Глава 7. ОСНОВНЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РОСТА ГЛУБИНЫХ КУЛЬТУР И НАКОПЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА

Наряду с рассмотренными в предыдущей главе ферментативными реакциями все большее значение в настоящее время приобретают промышленные процессы, включающие в качестве основной стадии рост и размножение микроорганизмов, а также биосинтез и продукты метаболизма. Для количественного описания и масштабирования таких процессов требуются исследования по кинетике накопления биомассы или продуктов. Необходимо отметить, что кинетика микробиологических процессов в ее количественном варианте разработана относительно слабо. Зачастую авторы принимают математические модели роста и размножения клеток, а также биосинтеза метаболитов, не задаваясь целью придать этим моделям определенный физический смысл, а ограничиваясь лишь требованием адекватности описания реально наблюдаемых явлений.

Сложность создания физически обоснованной модели биосинтеза приводит к тому, что некоторые крупные специалисты, такие как С. Дж. Перт, ограничиваются рассмотрением одной наиболее употребительной модели, избегая обсуждения ее обоснованности, достоинств и недостатков.

В последние годы с развитием экспериментальной техники большую популярность приобрело исследование так называемой предстационарной кинетики ферментативных реакций, основанное на изучении текущей концентрации фермент-субстратного комплекса  $X$  в условиях  $[E]_0 \ll [S]_0$  в тот промежуток времени, пока еще не достигнуто стационарное состояние. В этом случае  $[E] = [E]_0 - [X]$  и

$$d[X]/d\tau = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[X] = k_1[S]([E]_0 - [X]) - (k_{-1} + k_2)[X].$$

На коротком отрезке времени до установления стационарности  $[S] \approx [S]_0 = \text{const.}$  Решение дифференциального уравнения (при условии  $\tau = 0; [X] = 0$ ):

$$[X] = \frac{[E]_0[S]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]_0} [1 - e^{-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)\tau}]. \quad (6.104)$$

При увеличении  $\tau$   $[X]$  стремится к стационарному значению

$$[X]_{\text{стац}} = \frac{[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0}.$$

Как показывает эксперимент, время достижения стационарного значения  $[X]_{\text{стац}} = 10^{-6} \div 10^{-2}$  с. Проведение эксперимента за такое короткое время требует использования специальных методов, обычно основанных на применении соответствующей техники (рис. 6.15). Таким методом было найдено, что образование фермент-субстратного комплекса происходит с константой скорости порядка  $k_1 = 10^6 \div 10^{10}$  Моль/л·с, тогда как константа Мяхазелиса — Ментен  $K_M$  имеет значение порядка  $10^{-5} - 10^{-3}$  моль/л. Зная величины  $k_1$ ,  $k_{-1}$  и  $k_2$ , можно количественно определить температурную зависимость  $K_M$  и таким образом выявить влияние температуры на скорость ферментативной реакции, а также получить важную информацию о механизме каталитического действия фермента.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы основные достоинства и недостатки дифференциального и интегрального методов изучения кинетики ферментативных реакций?
2. Какова точность результатов, получаемых при использовании разных типов координат (см. в тексте) для обработки экспериментальных данных по кинетике ферментативных реакций?
3. Как вы объясняете различия в механизме взаимодействия ферментов с конкурентными и неконкурентными ингибиторами? Почему не может быть конкурентных активаторов?
4. Какую роль играет протонирование в рамках схемы, объясняющей влияние pH среды на активность ферментов?
5. Известно, что ферментативная реакция ингибируется продуктом и тормозится субстратом. Как поставить и обработать эксперименты по кинетическому описанию такой ферментативной реакции?

6. Ферменты одного и того же типа могут быть получены из психрофильных, мезофильных и термофильных микроорганизмов, при этом они имеют почти одинаковую активность при соответствующей оптимальной температуре и близки по стойкости. Какие соображения могут послужить основой для выбора того или иного образца при практическом осуществлении процесса?

7. Некоторый ферментный препарат выбран для использования в промышленном процессе. Какие сведения об этом ферменте должен иметь инженер-разработчик и как он будет их использовать в ходе проектирования биореактора?

8. Гидролиз бензилпенициллина, катализируемый пенициллинамидазой, при  $30^\circ\text{C}$  и pH 7,5 протекает с кинетическими параметрами  $k_2=1,5\text{ с}^{-1}$ ,  $K_m=3\cdot 10^{-4}\text{ моль/л}$  и ингибируется продуктом — фенилуксусной кислотой с константой  $K_i=3\cdot 10^{-5}\text{ моль/л}$ . Какова степень конверсии субстрата за 15, 30 и 60 мин, если начальные концентрации субстрата и фермента равны соответственно  $1\cdot 10^{-3}\text{ моль/л}$  и  $2\cdot 10^{-7}\text{ моль/л}$ ?

9. При изучении ферментативной реакции методом начальных скоростей удалось найти параметры  $k_2=0,6\text{ с}^{-1}$ ,  $K_m=4\cdot 10^{-5}\text{ моль/л}$  ( $[E]_0=2,1\cdot 10^{-6}\text{ моль/л}$ ). Дальнейшие исследования показали, что процесс превращения субстрата не удается завершить, причем конечные концентрации субстрата  $[S]_k$  связаны с его начальными концентрациями  $[S]_0$  следующими соотношениями:

|                                   |       |       |       |       |       |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $[S]_0\cdot 10^4, \text{ моль/л}$ | 0,125 | 0,143 | 0,167 | 0,210 | 0,250 |
| $[S]_k\cdot 10^4, \text{ моль/л}$ | 0,068 | 0,086 | 0,110 | 0,151 | 0,193 |

Как вы объясните и количественно опишете наблюдаемое явление?

10. Как вы оцените допустимое время смешения потоков субстрата и фермента при изучении нестационарной кинетики ферментативных реакций методом составленной струи?

## Глава 7. ОСНОВНЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РОСТА ГЛУБИННЫХ КУЛЬТУР И НАКОПЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА

Наряду с рассмотренными в предыдущей главе ферментативными реакциями все большее значение в настоящее время приобретают промышленные процессы, включающие в качестве основной стадии рост и размножение микроорганизмов, а также биосинтез ими продуктов метаболизма. Для количественного описания и масштабирования таких процессов требуются исследования по кинетике накопления биомассы или продуктов. Необходимо отметить, что кинетика микробиологических процессов в ее количественном варианте разработана относительно слабо. Зачастую авторы принимают математические модели роста и размножения клеток, а также биосинтеза метаболитов, не задаваясь целью придать этим моделям определенный физический смысл, а ограничиваясь лишь требованием адекватности описания реально наблюдаемых явлений.

Сложность создания физической обоснованной модели биосинтеза приводит к тому, что некоторые крупные специалисты, такие как С. Дж. Перт, ограничиваются рассмотрением одной наиболее употребительной модели, избегая обсуждения ее обоснованности, достоинств и недостатков.

В данной главе приведено сравнительное описание различных вариантов процессов микробиологического синтеза, в основу которых положены те или иные представления о механизме явления. К сожалению, мы вынуждены ограничиться лишь обсуждением кинетики глубинного культивирования, т. к. поверхностное культивирование создает пока что непреодолимые трудности для разработки количественных моделей.

### **§ 7.1. Феноменологическое описание процессов культивирования микроорганизмов**

Многолетние исследования роста микробных популяций привели к выводу, что зависимость концентрации биомассы от времени обычно описывается сложной кривой, приведенной на рис. 7.1. Она может быть разбита на 5—6 участков. Измерение концентрации клеток в культуральной среде само по себе представляет непростую задачу, поэтому концентрацию биомассы  $[X]$  выражают чаще всего числом клеток в единице объема жидкой фазы (кл/мл) либо через массу клеток, приходящуюся на единицу объема. Массу клеток измеряют путем взвешивания после высушивания в стандартных условиях и говорят поэтому об абсолютно сухой биомассе  $[г АСБ/л]$ . Второй вариант технически более удобен для мицелиальных культур.

Первый участок кривой рис. 7.1 носит название лаг-фазы и может иметь большую или меньшую продолжительность в зависимости от степени подготовленности инокулята к потреблению питательных веществ из среды, в которую он помещен. Во многих случаях отмечалось даже некоторое первоначальное снижение концентрации клеток в ходе лаг-фазы, которое затем сменялось их медленным размножением. Известно, что существуют минимальные посевные дозы, поскольку внесение инокулята в чрезмерно малых количествах приводит к его полному отмиранию. Это явление практически не изучено с количественной стороны, хотя его нельзя не учитывать в практике культивирования. Открытым остается вопрос и о фиксации времени выхода культуры из лаг-фазы. Обычно за момент окончания лаг-фазы принимают время, когда после снижения  $[X]$  достигается его первоначальное значение  $[X]_0$ .

После завершения фазы привыкания культуры к окружающей питательной среде начинаются рост и размножение клеток, которые происходят характерным для данного типа микроорганизмов способом — делением (бактерии), почкованием с последующим разделением (дрожжи) или ростом мицелия. После некоторого времени, в течение которого культура размножается со все возрастающей скоростью (фаза ускоренного роста), накопление АСБ идет по логарифмическому закону. В этой основной фазе роста,

которую принято называть экспоненциальной, зависимость  $[X]$  от времени обычно хорошо straighten в полулогарифмических координатах, что, как известно, характерно для процессов, описываемых кинетическим уравнением первого порядка.

В силу ряда причин, рассматриваемых ниже, экспоненциальный рост по прошествии некоторого времени затормаживается, т. е. прямая в координатах  $\ln[X] = \varphi(\tau)$  переходит в кривую, асимптотически приближающуюся к предельному значению. Этот участок кривой на рис. 7.1 обычно называют фазой торможения роста, за ней у многих микроорганизмов наступает стационарная фаза, когда концентрация биомассы не меняется во времени, а далее — фаза отмирания, в ходе которой число жизнеспособных клеток уменьшается.

Было бы неправильным понимать зависимость, приведенную на рис. 7.1, так, что в стационарной фазе клетки находятся в некотором покое, не делясь и не отмирая. Напротив, в этот период идут более или менее интенсивное отмирание и лизис отдельных клеток, в результате остальные представители популяции получают дополнительные источники питания. Строго говоря, отмирание клеток наблюдается в небольшой степени и на стадии экспоненциального роста, хотя там этим процессом часто пренебрегают.

Фаза отмирания, как это показано на рис. 7.1, может начинаться и непосредственно после замедления роста, в результате на кривой наблюдается пологий максимум, а не плато, как это характерно для большинства культур.

Количественное описание всей кривой роста чрезвычайно затруднительно и на практике не применяется. Наибольший практический интерес представляют экспоненциальная фаза, когда идет образование биомассы и продуктов метаболизма; фаза торможения, в ходе которой накапливаются так называемые вторичные метаболиты, и, наконец, фаза отмирания, которая особенно важна для процессов стерилизации, предшествующих проведению любого асептического процесса в биотехнологии.

При периодическом культивировании микроорганизмов большое влияние на производительность биореактора оказывает продолжительность лаг-фазы. Однако до сих пор отсутствуют какие-либо надежные количественные характеристики этой стадии, кс

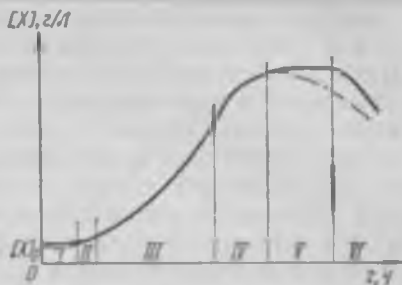


Рис. 7.1. Зависимость концентрации биомассы от времени при периодическом культивировании микроорганизмов

В данной главе приведено сравнительное описание различных вариантов процессов микробиологического синтеза, в основу которых положены те или иные представления о механизме явлений. К сожалению, мы вынуждены ограничиться лишь обсуждением кинетики глубинного культивирования, т. к. поверхностное культивирование создает пока что непреодолимые трудности для разработки количественных моделей.

### **§ 7.1. Феноменологическое описание процессов культивирования микроорганизмов**

Многолетние исследования роста микробных популяций привели к выводу, что зависимость концентрации биомассы от времени обычно описывается сложной кривой, приведенной на рис. 7.1. Она может быть разбита на 5—6 участков. Измерение концентрации клеток в культуральной среде само по себе представляет непростую задачу, поэтому концентрацию биомассы  $[X]$  выражают чаще всего числом клеток в единице объема жидкой фазы (кл/мл) либо через массу клеток, приходящуюся на единицу объема. Массу клеток измеряют путем взвешивания после высушивания в стандартных условиях и говорят поэтому об абсолютно сухой биомассе  $[г АСБ/л]$ . Второй вариант технически более удобен для мицелиальных культур.

Первый участок кривой рис. 7.1 носит название лаг-фазы и может иметь большую или меньшую продолжительность в зависимости от степени подготовленности инокулята к потреблению питательных веществ из среды, в которую он помещен. Во многих случаях отмечалось даже некоторое первоначальное снижение концентрации клеток в ходе лаг-фазы, которое затем сменялось их медленным размножением. Известно, что существуют минимальные посевные дозы, поскольку внесение инокулята в чрезмерно малых количествах приводит к его полному отмиранию. Это явление практически не изучено с количественной стороны, хотя его нельзя не учитывать в практике культивирования. Открытым остается вопрос и о фиксации времени выхода культуры из лаг-фазы. Обычно за момент окончания лаг-фазы принимают время, когда после снижения  $[X]$  достигается его первоначальное значение  $[X]_0$ .

После завершения фазы привыкания культуры к окружающей питательной среде начинаются рост и размножение клеток, которые происходят характерным для данного типа микроорганизмов способом — делением (бактерии), почкованием с последующим разделением (дрожжи) или ростом мицелия. После некоторого времени, в течение которого культура размножается со все возрастающей скоростью (фаза ускоренного роста), накопление АСБ идет по логарифмическому закону. В этой основной фазе роста,



которые позволили бы связать ее длительность со свойствами культуры и условиями ферментации. Известно, что лаг-фаза обычно бывает тем короче, чем больше засевная доза и чем лучше выносливые клетки адаптированы к конкретным условиям культивирования — составу среды, pH, температуре и т. п. Это заставляет на заводах с периодическим режимом работы стадии ферментации вводить отделение чистой культуры, где готовят посевной материал путем постепенного увеличения масштаба ферментационного оборудования от колб и 10—20-литровых стеклянных емкостей до ферментаторов объемом 10 м<sup>3</sup>. Ряд промежуточных стадий осуществляется в аппаратах объемом 100 л и 1 м<sup>3</sup>.

Количественному описанию фазы экспоненциального роста посвящено огромное число работ, в которых предлагаются самые различные подходы к решению задачи. Наиболее простой из них основан только на внешнем виде кривой роста на участках II и III (рис. 7.1), которая имеет здесь S-образный характер. Такие кривые обычно удается описать более или менее сложными экспоненциальными функциями. Вводя понятие предельной концентрации микроорганизмов  $[X]_{\infty}$ , ряд авторов описывают активный участок кривой уравнениями вида

$$[X] = \frac{[X]_{\infty}}{1 + k_1 \exp(-k_2 \tau)} \quad (7.1)$$

$$[X] = \frac{[X]_{\infty}}{1 + \exp(k_1 + k_2 \tau)} + k_3 \quad (7.2)$$

$$[X] = \frac{[X]_{\infty}}{1 + \exp(k_1 + k_2 \tau + k_3 \tau^2 + \dots)} \quad (7.3)$$

$$[X] = [X]_{\infty} \exp[-k_1 \exp(-k_2 \tau)] \quad (7.4)$$

Последнее из этих уравнений является общим видом зависимости, описывающей кривые S-образного типа. В приведенных примерах  $\tau$  — время,  $k_1$ ,  $k_2$  и  $k_3$  — константы. Из уравнений, формально описывающих рост любой популяции — от микроорганизмов до народонаселения, — наиболее известна так называемая логистическая кривая

$$[X] = \frac{k_1 \exp(k_2 \tau)}{1 + k_3 \exp(k_2 \tau)} \quad (7.5)$$

которая не отличается в принципе от зависимостей (7.1) — (7.4), поскольку при  $\tau \rightarrow \infty$  функция  $[X] \rightarrow k_1/k_3 = [X]_{\infty}$ .

Общие недостатки такого подхода к описанию кривой роста очевидны, поскольку константы всех приведенных выше уравнений не имеют физического смысла, могут быть найдены только из конкретного эксперимента и применимы поэтому в строго ограниченной области.

Значительно большее рас пространение получило коли чественное описание II, III и отчасти IV фаз роста с по мощью моделей процесса, от ражающих реально наблю даемые под микроскопом яв ления, т. е. принимающих те или иные допущения о меха низме роста и размножения клеток. Наиболее известной и применимой из таких схем оказалась модель экспонен циального роста, которая ис ходит из следующих посту латов:

1) увеличение численности популяции микроорганизмов есть результат актов удвоения каждой особи, которая делится через одинаковые интервалы времени  $g$ ;

2) рост, развитие и деление любой клетки происходит неза висимо от присутствия других микроорганизмов;

3) в некоторых пределах изменение концентрации компонен тов питательной среды не влияет на время удвоения клеток  $g$  которое определяется только типом микроорганизма и условиями культивирования.

Использование этих постулатов приводит к очевидной связи текущей концентрации клеток  $[X]$  в любой момент времени  $\tau$  с начальной концентрацией  $[X]_0$  при  $\tau=0$ :

$$[X] = [X]_0 \cdot 2^{\tau/g}. \quad (7.6)$$

Простое логарифмирование выражения (7.6) показывает, что оно описывает прямую в координатах  $\lg[X] = \varphi(\tau)$  (рис. 7.2):

$$\begin{aligned} \ln [X] &= \ln [X]_0 + \frac{\tau}{g} \ln 2, \\ \text{или } \ln \frac{[X]}{[X]_0} &= \frac{\ln 2}{g} \tau = \mu \tau. \end{aligned} \quad (7.7)$$

Дифференцирование завнсимости (7.6) позволяет найти ско рость роста культуры

$$\begin{aligned} \frac{d[X]}{d\tau} &= [X]_0 \cdot 2^{\tau/g} \frac{\ln 2}{g} = [X] \cdot \frac{\ln 2}{g}, \quad \text{т. е. при } \frac{\ln 2}{g} = \mu \\ & \quad d[X]/d\tau = \mu [X] \quad (7.8) \\ \text{или } \frac{d[X]}{d\tau} \frac{1}{[X]} &= \mu. \quad (7.9) \end{aligned}$$

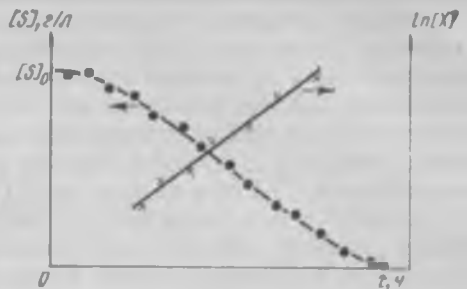


Рис. 7.2. Логарифмическая фаза роста и изменение концентрации субстрата  $S$  во времени при периодическом культивировании

которые позволили бы связать ее длительность со свойствами культуры и условиями ферментации. Известно, что лаг-фаза обычно бывает тем короче, чем больше засевная доза и чем лучше вносимые клетки адаптированы к конкретным условиям культивирования — составу среды, pH, температуре и т. п. Это заставляет на заводах с периодическим режимом работы стадии ферментации вводить отделение чистой культуры, где готовят посевной материал путем постепенного увеличения масштаба ферментационного оборудования от колб и 10–20-литровых стеклянных емкостей до ферментаторов объемом 10 м³. Ряд промежуточных стадий осуществляется в аппаратах объемом 100 л и 1 м³.

Количественному описанию фазы экспоненциального роста посвящено огромное число работ, в которых предлагаются самые различные подходы к решению задачи. Наиболее простой из них основан только на внешнем виде кривой роста на участках II и III (рис. 7.1), которая имеет здесь S-образный характер. Такие кривые обычно удается описать более или менее сложными экспоненциальными функциями. Вводя понятие предельной концентрации микроорганизмов  $[X]_{\infty}$ , ряд авторов описывают активный участок кривой уравнением вида

$$[X] = \frac{[X]_{\infty}}{1 + k_1 \exp(-k_2 \tau)}; \quad (7.1)$$

$$[X] = \frac{[X]_{\infty}}{1 + \exp(k_1 + k_2 \tau)} + k_3; \quad (7.2)$$

$$[X] = \frac{[X]_{\infty}}{1 + \exp(k_1 + k_2 \tau + k_3 \tau^2 + \dots)}; \quad (7.3)$$

$$[X] = [X]_{\infty} \exp[-k_1 \exp(-k_2 \tau)]. \quad (7.4)$$

Последнее из этих уравнений является общим видом зависимости, описывающей кривые S-образного типа. В приведенных примерах  $\tau$  — время,  $k_1$ ,  $k_2$  и  $k_3$  — константы. Из уравнений, формально описывающих рост любой популяции — от микроорганизмов до народонаселения — наиболее известна так называемая логистическая кривая

$$[X] = \frac{k_1 \exp(k_2 \tau)}{1 + k_3 \exp(k_2 \tau)}, \quad (7.5)$$

которая не отличается в принципе от зависимостей (7.1)–(7.4), поскольку при  $\tau \rightarrow \infty$  функция  $[X] \rightarrow k_1/k_3 = [X]_{\infty}$ .

Общие недостатки такого подхода к описанию кривой роста очевидны, поскольку константы всех приведенных выше уравнений не имеют физического смысла, могут быть найдены только из конкретного эксперимента и применимы поэтому в строго ограниченной области.

Значительно большее пространство получило количественное описание II, III и отчасти IV фаз роста с помощью моделей процесса, отражающих реально наблюдаемые под микроскопом явления, т. е. принимающих те или иные допущения о механизме роста и размножения клеток. Наиболее известной и применимой из таких схем оказалась модель экспоненциального роста, которая исходит из следующих постулатов:

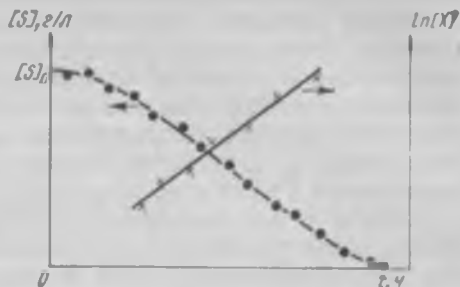


Рис. 7.2. Логарифмическая фаза роста и изменение концентрации субстрата  $S$  во времени при периодическом культивировании

1) увеличение численности популяции микроорганизмов есть результат актов удвоения каждой особи, которая делится через одинаковые интервалы времени  $g$ ;

2) рост, развитие и деление любой клетки происходит независимо от присутствия других микроорганизмов;

3) в некоторых пределах изменение концентрации компонентов питательной среды не влияет на время удвоения клеток  $g$ , которое определяется только типом микроорганизма и условиями культивирования.

Использование этих постулатов приводит к очевидной связи текущей концентрации клеток  $[X]$  в любой момент времени  $\tau$  с начальной концентрацией  $[X]_0$  при  $\tau=0$ :

$$[X] = [X]_0 \cdot 2^{\tau/g}. \quad (7.6)$$

Простое логарифмирование выражения (7.6) показывает, что оно описывает прямую в координатах  $\lg[X] = \varphi(\tau)$  (рис. 7.2):

$$\ln [X] = \ln [X]_0 + \frac{\tau}{g} \ln 2, \\ \text{или} \quad \ln \frac{[X]}{[X]_0} = \frac{\ln 2}{g} \tau = \mu \tau. \quad (7.7)$$

Дифференцирование зависимости (7.6) позволяет найти скорость роста культуры

$$\frac{d[X]}{d\tau} = [X]_0 \cdot 2^{\tau/g} \frac{\ln 2}{g} = [X] \cdot \frac{\ln 2}{g}, \quad \text{т. е. при} \quad \frac{\ln 2}{g} = \mu \\ d[X]/d\tau = \mu [X] \quad (7.8)$$

$$\text{или} \quad \frac{d[X]}{d\tau} \frac{1}{[X]} = \mu. \quad (7.9)$$

Таким образом, согласно последнему уравнению удельная скорость роста микроорганизмов  $\mu$  по экспоненциальной модели должна быть величиной постоянной, обратно пропорциональной времени удвоения биомассы  $g$ . Понятно, что интегрирование (7.8) или (7.9) в пределах изменения времени от 0 до  $\tau$  приводит к выражению (7.7), которое хорошо описывает экспериментальную зависимость  $[X]$  от  $\tau$  на участке III рис. 7.1.

Вместе с тем очевидно, что первый постулат соответствует лишь процессу размножения бактерий, т. к. другие микроорганизмы могут увеличивать свою биомассу и по-другому. Тем не менее, оказалось, что если концентрацию биомассы выражать через количество АСБ в единице объема, экспоненциальная модель вполне удовлетворительно описывает практически все варианты размножения, характерные для дрожжей, мицеллиальных культур и др.

Более всего обращает на себя внимание слабая обоснованность третьего постулата, который предполагает отсутствие связи между концентрацией источников углерода и энергии и других компонентов питательной среды и удельной скоростью роста, хотя многочисленные прямые экспериментальные данные показывают, что это не так. В рамках модели это противоречие разрешить невозможно, однако существует ряд дополнений к рассматриваемой модели, которые позволяют выразить удельную скорость роста как функцию концентрации субстрата. Этот вопрос подробно рассматривается в следующем разделе. Там же обсуждены и соображения о достоверности второго постулата, т. е. о взаимном влиянии клеток в ходе культивирования.

Экспоненциальная модель роста не отрицает в принципе и гибели части клеток в ходе роста и размножения. Действительно, выражение (7.8) допускает и более широкое толкование, поскольку константу в правой части уравнения можно понимать не только как удельную скорость роста, но и как разность константы скорости роста и константы гибели клеток:

$$d[X]d\tau = k_p[X] - k_r[X] = (k_p - k_r)[X], \quad (7.10)$$

т. е.  $\mu = k_p - k_r$ . Тем самым предполагается, что скорость гибели клеток пропорциональна их количеству. Этот вывод хорошо согласуется с экспериментом (см. ниже).

Следует отметить, что, кроме приведенного выше детерминированного подхода, экспоненциальная модель допускает и вероятностное толкование. Если вероятность деления клетки за время  $d\tau$  равна  $\mu d\tau$ , то математическое ожидание числа клеток к моменту времени  $\tau$  равно  $[X] = [X]_0 \exp(\mu\tau)$ , что не отличается от интегральной формы уравнения (7.9).

Кроме модели, рассмотренной выше, существуют и другие подходы к описанию процесса деления клеток микробной попу-

ляции, которые учитывают взаимодействие клеток. Наиболее известна модель, разработанная еще в XIX в. Ферхюльстом, который допускал наличие внутривидовой борьбы, взаимодействие двух клеток одной популяции, приводящие к гибели одной из них. В этом случае скорость роста популяции описывается уравнением

$$\begin{aligned} \frac{d[X]}{d\tau} &= k_p[X] - k_r[X]^2, \\ \text{или} \quad \frac{d[X]}{d\tau} \cdot \frac{1}{[X]} &= \mu = k_p - k_r[X]. \end{aligned} \quad (7.11)$$

По сравнению с экспоненциальной моделью (7.10) уравнение (7.11) предполагает, что скорость гибели клеток пропорциональна квадрату их концентрации, т. е. отмирание одной из клеток может произойти только в результате ее взаимодействия с другой. Хотя это и не соответствует результатам прямых наблюдений за делением клеток и ростом популяций, но уравнение (7.11) часто получается и при использовании совершенно других посылок, принципиально отличающихся от концепции внутривидовой борьбы, поэтому целесообразно рассмотреть его интегральную форму. Если обозначить отношение констант роста  $k_p$  и гибели  $k_r$  особой через  $[X]_\infty = k_p/k_r$ , то

$$[X] = [X]_0 \frac{[X]_\infty}{([X]_\infty - [X]_0) \exp(-k_p \tau) + [X]_0}. \quad (7.12)$$

Из выражения (7.12) видно, что при  $\tau=0$   $[X] = [X]_0$ , а при  $\tau \rightarrow \infty$   $[X] \rightarrow k_p/k_r = [X]_\infty$ .

Большой практический интерес представляет вопрос о росте смешанных популяций микроорганизмов, который в настоящее время освещен очень слабо. Имеется лишь один простейший вариант количественного описания роста таких культур, допускающий негативное взаимодействие между двумя видами микроорганизмов по типу «жертва — хищник». Согласно модели Вольтерра гибель «жертв»  $X_1$  и рост «хищников»  $X_2$  происходит при непосредственном взаимодействии, поэтому скорость гибели пропорциональна произведению концентраций того и другого вида микроорганизмов, тогда как скорости роста первых и гибели вторых линейно связаны с соответствующими концентрациями:

$$\left. \begin{aligned} \frac{d[X_1]}{d\tau} &= k_p[X_1] - k_0[X_1][X_2]; \\ \frac{d[X_2]}{d\tau} &= k_0[X_1][X_2] - k_1[X_2]. \end{aligned} \right\} \quad (7.13)$$

Константы  $k_p$ ,  $k_r$  и  $k_0$  характеризуют рост «жертв», гибель «хищников» и межвидовую борьбу. Описаны и более сложные

Обобщая, их равенство в ходе культивирования из каких-либо законов и должно проверяться. В большинстве случаев, к счастью, коэффициент не меняется в ходе процесса, как это, например, при росте дрожжей на этаноле.

$$r = \left| \frac{d[X]}{d[S]} \right| = \frac{[X]_t - [X]_0}{[S]_0 - [S]_t} \quad (7.17)$$

относится к любому моменту времени в процессе.

Важной связи между приростом биомассы и расходом субстрата позволило Моно предложить уравнение его и связывающее удельную скорость реакции лимитирующего субстрата  $[S]$ :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (7.18)$$

Уравнение (7.18) взято по аналогии с уравнением Михаэлиса-Ментен из ферментативной кинетики на основе «узкого места»: поскольку все реакции в клетке с участием ферментов, то скорость роста в целом определяется скоростью некоторой стадии метаболизма. Следовательно, зависимость скорости от концентрации субстрата должна быть такой же, как и зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации реагентов.

Из уравнения Михаэлиса-Ментен константы  $\mu_{\max}$  и  $K_s$  не имеют явного физического смысла, их легко найти экспериментально. По существу, оно дополняет экспоненциальную модель роста, добавляя ее третий, наиболее уязвимый постулат, зависимость между текущими значениями  $[X]$  и

$$\frac{d[X]}{d\tau} = \mu[X] = \mu_{\max} \frac{[X][S]}{K_s + [S]} \quad (7.19)$$

в экспоненциальной модели в форме (7.19) позволяют, рассчитывая не только текущие концентрации, но и субстрата, поскольку  $d[S] = -\frac{1}{Y} d[X]$ ,

и  $[S]_t = [S]_0 - \frac{1}{Y}([X]_t - [X]_0)$ :

$$-\frac{d[S]}{d\tau} = \frac{\mu_{\max}([X]_0 + Y([S]_0 - [S]))}{Y(K_s + [S])} \quad (7.20)$$

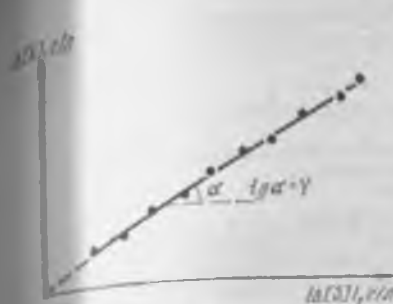


Рис. 7.3. Взаимосвязь прироста биомассы и расходования субстрата при периодическом культивировании

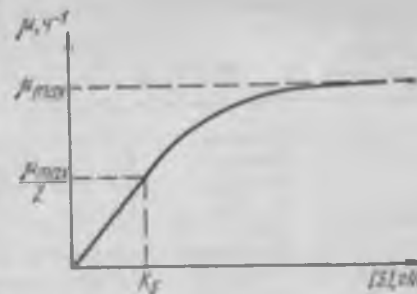


Рис. 7.4. Зависимость удельной скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата по уравнению Моно

Чаше эту зависимость выражают через удельную скорость метаболизма  $q$

$$-\frac{d[S]}{d\tau} \frac{1}{[X]} = q = \frac{\mu_{\max}}{Y} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (7.21)$$

Уравнения (7.19) или (7.20) позволяют получить интегральную форму зависимости  $[X]$  и  $[S]$  от времени. При интегрировании выражения (7.19) используют подстановку

$$[S] = \frac{[X]_0 + Y[S]_0 - [X]}{Y} = \frac{[X]_{\max} - [X]}{Y},$$

где  $[X]_{\max} = [X]_0 + Y[S]_0$  — условная величина, соответствующая теоретически полному превращению субстрата в биомассу.

Уравнение (7.20) может быть проинтегрировано непосредственно, поскольку зависимости  $[X]$  от  $\tau$  и  $[S]$  от  $\tau$  взаимосвязаны через  $Y$  и  $[X]_{\max}$ :

$$\tau = \frac{1}{\mu_{\max}} \left\{ \frac{YK_s}{[X]_{\max}} \ln \frac{Y[S]_0}{[X]_{\max} - [X]} + \left( 1 + \frac{YK_s}{[X]_{\max}} \right) \ln \frac{[X]}{[X]_0} \right\}; \quad (7.22)$$

$$\tau = \frac{1}{\mu_{\max}} \left\{ \frac{YK_s}{[X]_{\max}} \ln \frac{[S]_0}{[S]} + \left( 1 + \frac{YK_s}{[X]_{\max}} \right) \ln \frac{[X]_{\max} - Y[S]}{[X]_0} \right\}. \quad (7.23)$$

Зависимость (7.18), как любая дробная рациональная функция, описывает кривую с насыщением (рис. 7.4), которая асимптотически стремится к  $\mu_{\max}$ . Величина  $K_s$  численно равна концентрации субстрата  $[S]$ , при которой  $\mu = \mu_{\max}/2$ , и имеет размерность концентрации. Интегральные формы (7.22) и (7.23) вполне удовлетворительно описывают связь концентраций биомассы и субстрата со временем при очень малых концентрациях

го коэффициента, вообще говоря, их равенство в ходе культивирования не следует из каких-либо законов и должно проверяться в ходе исследований. В большинстве случаев, экологический коэффициент не меняется в ходе процесса, как это было показано, например, при росте дрожжей на этаноле (рис. 7.3), поэтому

$$Y = \left| \frac{d[X]}{d[S]} \right| = \frac{[X]_t - [X]_0}{[S]_0 - [S]_t}, \quad (7.17)$$

причем индекс  $t$  относится к любому моменту времени в фазе активного роста.

Наличие однозначной связи между приростом биомассы и потреблением субстрата позволило Моно предложить уравнение, носящее сейчас его имя и связывающее удельную скорость роста с концентрацией лимитирующего субстрата  $[S]$ :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]}. \quad (7.18)$$

Форма уравнения (7.18) взята по аналогии с уравнением Михаэлиса — Ментен из ферментативной кинетики на основании концепции «узкого места»: поскольку все реакции в клетках протекают с участием ферментов, то скорость роста в целом будет определяться скоростью некоторой стадии метаболизма — узким местом. Следовательно, зависимость скорости роста клеток от концентрации субстрата должна быть такой же по форме, как и зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации соответствующих реагентов.

В отличие от уравнения Михаэлиса — Ментен константы уравнения Моно —  $\mu_{\max}$  и  $K_s$  — не имеют явного физического смысла, хотя их легко найти экспериментально. По существу, уравнение Моно дополняет экспоненциальную модель роста (см. § 7.1), исправляя ее третий, наиболее уязвимый постулат, и выявляя зависимость между текущими значениями  $[X]$  и  $[S]$ :

$$\frac{d[X]}{dt} = \mu[X] = \mu_{\max} \frac{[X][S]}{K_s + [S]}. \quad (7.19)$$

Уравнение экспоненциальной модели в форме (7.19) позволяет, таким образом, рассчитывать не только текущие концентрации клеток, но и субстрата, поскольку  $d[S] = -\frac{1}{Y} d[X]$ ,

а  $[X] = [X]_0 + Y([S]_0 - [S])$ :

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{\mu_{\max} \{ [X]_0 + Y([S]_0 - [S]) \} [S]}{Y(K_s + [S])}. \quad (7.20)$$

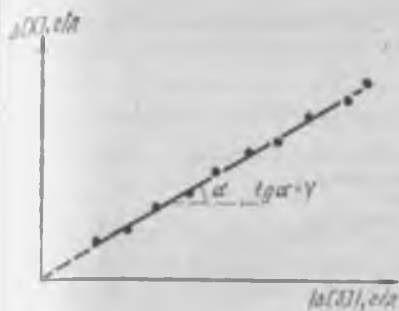


Рис. 7.3. Взаимосвязь прироста биомассы и расходования субстрата при периодическом культивировании

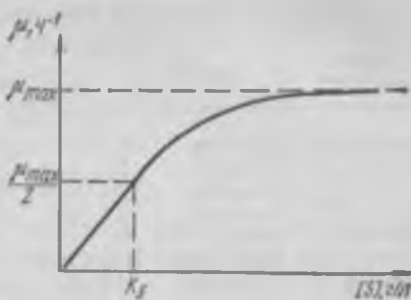


Рис. 7.4. Зависимость удельной скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата по уравнению Моно

Чаще эту зависимость выражают через удельную скорость метаболизма  $q$

$$-\frac{d[S]}{d\tau} \frac{1}{[X]} = q = \frac{\mu_{\max}}{Y} \frac{[S]}{K_S + [S]}; \quad (7.21)$$

Уравнения (7.19) или (7.20) позволяют получить интегральную форму зависимости  $[X]$  и  $[S]$  от времени. При интегрировании выражения (7.19) используют подстановку

$$[S] = \frac{[X]_0 + Y[S]_0 - [X]}{Y} = \frac{[X]_{\max} - [X]}{Y},$$

где  $[X]_{\max} = [X]_0 + Y[S]_0$  — условная величина, соответствующая теоретически полному превращению субстрата в биомассу.

Уравнение (7.20) может быть проинтегрировано непосредственно, поскольку зависимости  $[X]$  от  $\tau$  и  $[S]$  от  $\tau$  взаимосвязаны через  $Y$  и  $[X]_{\max}$ :

$$\tau = \frac{1}{\mu_{\max}} \left\{ \frac{YK_S}{[X]_{\max}} \ln \frac{Y[S]_0}{[X]_{\max} - [X]} + \left( 1 + \frac{YK_S}{[X]_{\max}} \right) \ln \frac{[X]}{[X]_0} \right\}; \quad (7.22)$$

$$\tau = \frac{1}{\mu_{\max}} \left\{ \frac{YK_S}{[X]_{\max}} \ln \frac{[S]_0}{[S]} + \left( 1 + \frac{YK_S}{[X]_{\max}} \right) \ln \frac{[X]_{\max} - Y[S]}{[X]_0} \right\}. \quad (7.23)$$

Зависимость (7.18), как любая дробная рациональная функция, описывает кривую с насыщением (рис. 7.4), которая асимптотически стремится к  $\mu_{\max}$ . Величина  $K_S$  численно равна концентрации субстрата  $[S]$ , при которой  $\mu = \mu_{\max}/2$ , и имеет размерность концентрации. Интегральные формы (7.22) и (7.23) вполне удовлетворительно описывают связь концентраций биомассы и субстрата со временем при очень малых концентрациях

го коэффициента, вообще говоря, их равенство в ходе культивирования не следует из каких-либо законов и должно проверяться в ходе исследований. В большинстве случаев, к счастью, экономический коэффициент не меняется в ходе процесса, как это было показано, например, при росте дрожжей на этаноле (рис. 7.3), поэтому

$$Y = \left| \frac{d[X]}{d[S]} \right| = \frac{[X]_t - [X]_0}{[S]_0 - [S]_t}, \quad (7.17)$$

причем индекс  $t$  относится к любому моменту времени в фазе активного роста.

Наличие однозначной связи между приростом биомассы и потреблением субстрата позволило Моно предложить уравнение, носящее сейчас его имя и связывающее удельную скорость роста с концентрацией лимитирующего субстрата  $[S]$ :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]}. \quad (7.18)$$

Форма уравнения (7.18) взята по аналогии с уравнением Михаэлиса — Ментен из ферментативной кинетики на основании концепции «узкого места»: поскольку все реакции в клетках протекают с участием ферментов, то скорость роста в целом будет определяться скоростью некоторой стадии метаболизма — узким местом. Следовательно, зависимость скорости роста клеток от концентрации субстрата должна быть такой же по форме, как и зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации соответствующих реагентов.

В отличие от уравнения Михаэлиса — Ментен константы уравнения Моно —  $\mu_{\max}$  и  $K_s$  — не имеют явного физического смысла, хотя их легко найти экспериментально. По существу, уравнение Моно дополняет экспоненциальную модель роста (см. § 7.1), исправляя ее третий, наиболее уязвимый постулат, и выявляя зависимость между текущими значениями  $[X]$  и  $[S]$ :

$$\frac{d[X]}{dt} = \mu[X] = \mu_{\max} \frac{[X][S]}{K_s + [S]}. \quad (7.19)$$

Уравнение экспоненциальной модели в форме (7.19) позволяет, таким образом, рассчитывать не только текущие концентрации клеток, но и субстрата, поскольку  $d[S] = -\frac{1}{Y} d[X]$ ,

а  $[X] = [X]_0 + Y([S]_0 - [S])$ :

$$-\frac{d[S]}{dt} \approx \frac{\mu_{\max} ([X]_0 + Y([S]_0 - [S])) [S]}{Y(K_s + [S])}. \quad (7.20)$$

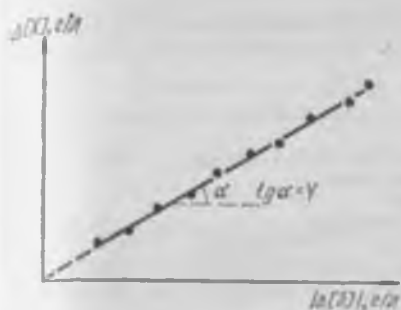


Рис. 7.3. Взаимосвязь прироста биомассы и расходования субстрата при периодическом культивировании

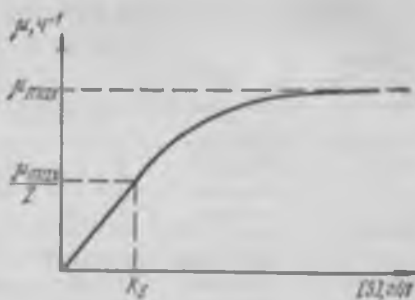


Рис. 7.4. Зависимость удельной скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата по уравнению Моно

Чаще эту зависимость выражают через удельную скорость метаболизма  $q$

$$-\frac{d[S]}{d\tau} \frac{1}{[X]} = q = \frac{\mu_{\max}}{Y} \frac{[S]}{K_s + [S]}; \quad (7.21)$$

Уравнения (7.19) или (7.20) позволяют получить интегральную форму зависимости  $[X]$  и  $[S]$  от времени. При интегрировании выражения (7.19) используют подстановку

$$[S] = \frac{[X]_0 + Y[S]_0 - [X]}{Y} = \frac{[X]_{\max} - [X]}{Y},$$

где  $[X]_{\max} = [X]_0 + Y[S]_0$  — условная величина, соответствующая теоретически полному превращению субстрата в биомассу.

Уравнение (7.20) может быть проинтегрировано непосредственно, поскольку зависимости  $[X]$  от  $\tau$  и  $[S]$  от  $\tau$  взаимосвязаны через  $Y$  и  $[X]_{\max}$ :

$$\tau = \frac{1}{\mu_{\max}} \left\{ \frac{YK_s}{[X]_{\max}} \ln \frac{Y[S]_0}{[X]_{\max} - [X]} + \left( 1 + \frac{YK_s}{[X]_{\max}} \right) \ln \frac{[X]}{[X]_0} \right\}; \quad (7.22)$$

$$\tau = \frac{1}{\mu_{\max}} \left\{ \frac{YK_s}{[X]_{\max}} \ln \frac{[S]_0}{[S]} + \left( 1 + \frac{YK_s}{[X]_{\max}} \right) \ln \frac{[X]_{\max} - Y[S]}{[X]_0} \right\}. \quad (7.23)$$

Зависимость (7.18), как любая дробная рациональная функция, описывает кривую с насыщением (рис. 7.4), которая асимптотически стремится к  $\mu_{\max}$ . Величина  $K_s$  численно равна концентрации субстрата  $[S]$ , при которой  $\mu = \mu_{\max}/2$ , и имеет размерность концентрации. Интегральные формы (7.22) и (7.23) вполне удовлетворительно описывают связь концентраций биомассы и субстрата со временем при очень малых концентрациях

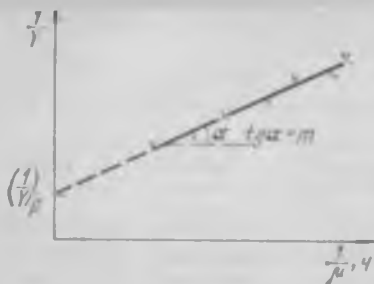


Рис. 7.5. Графическое определение затрат на поддержание (эндогенный метаболизм) по данным об экономическом коэффициенте роста

поненциальной модели роста и уравнения Моно в приложении к периодическим процессам микробиологического синтеза.

Наряду с экспоненциальной моделью, которая первоначально не учитывает роли субстрата и лишь затем дополняется зависимостью  $\mu = \varphi([S], [X], \dots)$ , существует множество моделей, которые с самого начала рассматривают рост популяции как своеобразное взаимодействие клеток микроорганизмов с субстратом, приводящее к их росту и размножению, т. е. к превращению субстрата в биомассу. Такие модели роста принято называть кинетическими. Несмотря на разнообразные и часто оригинальные исходные посылки, можно показать, что конечные уравнения, получаемые по кинетическим моделям, не отличаются в принципе от приведенных в § 7.1.

Наиболее простая из кинетических моделей рассматривает клетки и субстрат как необратимо взаимодействующие компоненты, что приводит к удвоению биомассы и появлению продуктов по схеме



Скорость такого процесса пропорциональна концентрациям клеток и субстрата

$$d[X]/d\tau = k[X][S],$$

однако, учитывая связь  $[S] = \frac{1}{Y}([X]_{\max} - [X])$ , имеем

$$\frac{d[X]}{d\tau} = \frac{k}{Y}[X]([X]_{\max} - [X]) = \frac{k[X]_{\max}}{Y}[X] - \frac{k}{Y}[X]^2.$$

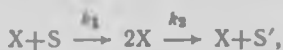
Это уравнение не отличается от полученного ранее выражения (7.11), поскольку оно преобразуется к такой же форме:

$$\frac{d[X]}{d\tau} \frac{1}{[X]} = \frac{k[X]_{\max}}{Y} - \frac{k}{Y}[X]. \quad (7.30)$$

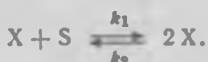
В итоге предположение о взаимодействии X и S приводит к уравнению, учитывающему квадратичную гибель клеток.

Большой интерес у исследователей вызвали идеи Н. И. Кобозева о росте микроорганизмов как обратном «равновесном» или «неравновесном» процессе, в ходе которого субстрат

S («разупорядоченное» X) взаимодействует с клетками и превращается в биомассу X («упорядоченное» S). В общем случае схема имеет вид «неравновесного» процесса



однако если S' не отличается от S, то схема переходит в форму «равновесного» процесса



Различия вариантов схемы отражаются только на уравнении расходования субстрата, тогда как скорость накопления биомассы описывается одним и тем же выражением:

$$\frac{d[X]}{d\tau} = k_1[X][S] - k_2[X]^2. \quad (7.31)$$

Как уже было отмечено, Н. И. Кобозев не делает различий между X и S, поэтому принимает  $d[X]/d[S] = -1$ . Если считать, как это общепринято, что такая производная равна не  $-1$ , а  $-Y$ , то, ничего не меняя в существе вывода, из (7.31) можно получить

$$\frac{d[X]}{d\tau} = k_1[X] \frac{1}{Y} ([X]_{\max} - [X]) - k_2[X]^2; \quad (7.32)$$

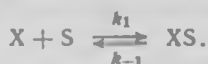
$$\frac{d[X]}{d\tau} \frac{1}{[X]} = \frac{k_1[X]_{\max}}{Y} - \left( k_2 + \frac{k_1}{Y} \right) [X].$$

Вновь оказывается, что уравнение (7.32) не отличается от выражения (7.11), только константы имеют другой физический смысл. По-видимому, это обстоятельство, а также слишком глубокая «химизация» схемы, предлагаемой для биологического процесса, привели к тому, что модели обратного равновесного и неравновесного роста не получили распространения на практике.

Отметим, наконец, что любые модели «кинетического» типа, предусматривающие взаимодействие клеток с субстратом, скорость которого пропорциональна и  $[X]$ , и  $[S]$ , неизбежно приводят к выражениям, содержащим член с  $[X]^2$ , т. е. к уравнению вида (7.11).

Можно показать, однако, что кинетическая модель способна привести к результатам, соответствующим экспоненциальной модели с добавлением уравнения Моно. Действительно, рост биомассы, сопровождающийся потреблением субстрата, может быть представлен как трехстадийный ферментативный

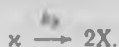
процесс, в котором на первой стадии образуется комплекс субстрата с клеткой:



Такие комплексы с транспортными белками — пермеазами, — безусловно, образуются при активном переносе через клеточную стенку. Образование своеобразных ассоциатов предполагается при росте микроорганизмов на нерастворимых субстратах типа парафинов и в ряде других случаев. Следствием за комплексообразованием стадией является перенос субстрата внутрь клетки и его утилизация, приводящая к росту массы клеток (биомассы)  $x$  и возникновению метаболитов  $p$ .



В результате дальнейшего развития клеток они достигают фазы деления, которое приводит к росту  $X$ :



Хотя связывание субстрата с поверхностными элементами клетки происходит не по всей ее поверхности, а на определенных участках, количество таких участков, очевидно, пропорционально концентрации клеток  $[X]$ , а с точки зрения способности присоединять субстрат  $x$  не отличается от  $X$ .

При достаточно большом объеме популяции должно достигаться стационарное состояние по  $[x]$  и  $[XS]$ , т. е. схема будет полностью совпадать с трехстадийной ферментативной реакцией (см. главу 6). В результате этого в стационарном состоянии

$$[XS] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [X]_{ca} [S],$$

где  $[X]_{ca}$  относится к клеткам или к их активным центрам, способным связывать субстрат, т. е. не образовавшим еще комплекса  $XS$ . При условии  $[X] \ll [S]$ , которое практически всегда выполняется, если сравнивать количество клеток и число молекул субстрата в единице объема среды:

$$[X]_{ca} = \frac{(k_{-1} + k_2) [X]}{(k_{-1} + k_2) + k_1 [S]}.$$

Из условия стационарности по  $[x]$ , которая определяется хаотичностью деления отдельных клеток в популяции, если культура растет не синхронно, получается выражение

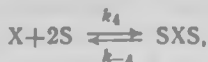
скорости роста:

$$\frac{d[X]}{d\tau} = k_2[X] = k_2[XS] = \frac{k_2[X][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (7.33)$$

$$\text{или } \frac{d[X]}{d\tau} \frac{1}{[X]} = k_2 \frac{[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (7.34)$$

Таким образом, рассмотренная схема приводит к выражению, аналогичному уравнению Моно, причем  $k_2 = \mu_{\max}$ , а  $K_s = (k_{-1} + k_2)/k_1$ , либо при малых  $k_2$ , когда  $k_2 \ll k_{-1}$ ,  $K_s$  обращается в константу нестойкости комплекса X, равную  $k_{-1}/k_1$ .

Если допустить, что избыток субстрата приводит к возникновению неактивных комплексов SXS



то по аналогии с ферментативной кинетикой получим

$$\frac{d[X]}{d\tau} = \frac{k_2[X][S]}{K_s + [S] + K_s K_4 [S]^2}, \quad (7.35)$$

где  $K_4 = k_4/k_{-4}$ ; уравнение аналогично (7.24).

Обсуждаемая модель способна учесть и частичное отмирание клеток в ходе развития популяции, причем это изменит только константу в правой части уравнения (7.34). Если гибель характерна только для клеток  $[X]_{cb}$ , не присоединивших субстрат



то уравнение имеет вид

$$\frac{d[X]}{d\tau} \frac{1}{[X]} = \frac{k_2[S] - k_r}{K_s + [S]} \quad (7.36)$$

Если гибель возможна только для промежуточного комплекса XS, то

$$\begin{aligned} XS &\xrightarrow{k'_r} X_n + S. \\ \frac{d[X]}{d\tau} \frac{1}{[X]} &= \frac{(k_2 - k'_r)[S]}{K_s + [S]}. \end{aligned} \quad (7.37)$$

Наконец, в общем случае

$$\frac{d[X]}{d\tau} \frac{1}{[X]} = \frac{(k_2 - k'_r)[S] - k_r}{K_s + [S]}. \quad (7.38)$$

Таким образом, трехстадийная кинетическая модель приводит к рассмотренным ранее на основании экспоненциальной модели выражениям и придает известный физический смысл константам уравнения Моно.  $\mu_{\max}$  оказывается равной константе скорости превращения комплекса субстрата с пермеазой клетки, а  $K_s$  в простейшем случае совпадает с константой нестойкости этого комплекса.

Общим недостатком экспоненциальной модели в варианте, использующем уравнение Моно (7.18), является ее пригодность только для описания процессов непрерывного культивирования в аппаратах полного смешения (см. ниже). При описании этим уравнением данных по периодическому росту культуры или росту тубулярных культур оказывается, что удельная скорость роста  $\mu$  в течение длительного времени не зависит от концентрации субстрата, а фаза торможения роста протекает за очень короткий промежуток времени, не дающий возможности получить достаточное число экспериментальных точек.

Независимость удельной скорости роста от  $[S]$  объясняется в рамках выражения (7.18) соотношением  $K_s \ll [S]$ , которое действительно в силу малых значений константы, приведенных в табл. 7.1. Оказывается, однако, что, несмотря на отсутствие влияния текущей концентрации субстрата, при периодическом культивировании наблюдается четкая корреляция удельной скорости роста с начальной концентрацией субстрата  $[S]_0$ , показанная на рис. 7.6. Отмечено также, что в ряде случаев начальная концентрация субстрата оказывает влияние и на экономический коэффициент роста (рис. 7.7), хотя в ходе ферментации величина  $Y$  не зависит от  $[S]$ .

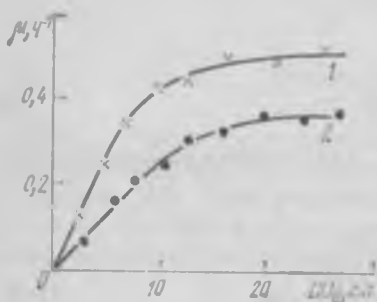


Рис. 7.6. Зависимость удельной скорости роста  $\mu$  от начальной концентрации субстрата при периодическом культивировании

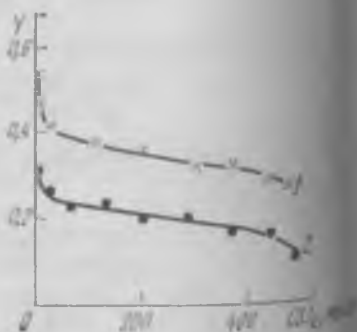


Рис. 7.7. Зависимость экономического коэффициента роста от начальной концентрации субстрата при периодическом культивировании

Отличия периодического и непрерывного процессов культивирования ряд авторов связывают с тем, что в первом случае в системе накапливается большое количество продуктов метаболизма, влияющих на рост. Как известно, роль продуктов никак не отражена в постулатах экспоненциальной и большинства других моделей, поэтому их влияние должно быть рассмотрено отдельно.

### § 7.3. Влияние продуктов метаболизма на рост микробных популяций

Выше уже рассматривалась простая гипотеза Хиншельвуда о тормозящем действии продуктов на рост популяции клеток — уравнения (7.14) и (7.15). Эти идеи не получили широкого распространения в практике количественного описания микробиологических процессов, поскольку рассматривали только одну сторону проблемы. Известны случаи, когда, например, процесс роста биомассы в технологии антибиотиков описывали комбинированными зависимостями, включающими и уравнение Моно, и скорость гибели клеток, пропорциональную концентрации продукта, например в процессах биосинтеза антибиотиков:

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1[X] \frac{[S]}{K_s + [S]} - k_2[X][P]. \quad (7.39)$$

Все уравнения подобного вида в конце концов приводятся к представлениям о квадратичной гибели клеток, поскольку уже отмечено, что продукты, связанные с ростом, образуются в определенном соотношении к потребленному субстрату:

$$[P_i] - [P_i]_0 = \alpha_{ij}([S]_0 - [S]), \quad (7.40)$$

где  $\alpha_{ij}$  — коэффициент выхода  $i$ -го продукта по  $j$ -му субстрату, г/л·л·г (моль·л/л·моль);  $[P_i]_0$  — чаще всего равно нулю, т. к. в исходной питательной смеси продукты, как правило, не содержатся.

Связь расходования лимитирующего субстрата с накоплением биомассы, выражаемая экономическим коэффициентом, приводит к выводу

$$[P_i] = \alpha_i([S]_0 - [S]) = \frac{\alpha_i}{Y}([X] - [X]_0). \quad (7.41)$$

В результате все зависимости, содержащие произведение концентраций клеток и продуктов, оказываются квадратичными по  $[X]$ , т. е. совпадают по форме с выражением (7.11).

Используя обсуждавшийся выше принцип «узкого места», И. Д. Перусалимский с сотрудниками в ряде работ обосновал

целесообразность описания экспериментальных данных торможению роста микроорганизмов выделяющимися продуктами (метаболитами) зависимостью, по форме напоминающей уравнение Михаэлиса — Ментен:

$$\mu = \mu_0 \frac{K_p}{K_p + [P]} \quad (7.42)$$

причем  $\mu_0$  и  $K_p$  — константы, не имеющие определенного физического смысла.

Поскольку ограничиться учетом только действия продуктов, игнорируя роль субстрата, практически невозможно, обычно используют так называемое уравнение Моно—Иерусалимского в виде

$$\frac{d[X]}{dt} \frac{1}{[X]} = \mu = \mu_0 \frac{K_p [S]}{(K_s + [S]) (K_p + [P])} \quad (7.43)$$

или с учетом  $[P] = \alpha ([S]_0 - [S])$  при  $K_{ps} = \text{const}$

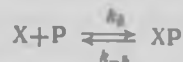
$$\mu = \mu_0 \frac{K_{ps} [S]}{(K_s + [S]) (K_{ps} + \alpha ([S]_0 - [S]))} \quad (7.44)$$

Последнее выражение приводится к форме

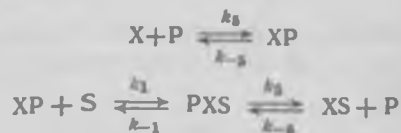
$$\mu = \mu_0 \frac{K_{ps} [S]}{(K_s K_{ps} + \alpha K_s [S]_0) + (K_{ps} + \alpha [S]_0 - \alpha K_s) [S] - \alpha [S]^2} \quad (7.45)$$

которая отличается от рассмотренного ранее случая торможения субстратом (7.24) только знаком при  $[S]^2$  в знаменателе.

Уравнения, аналогичные (7.43)—(7.45), могут быть получены и в рамках рассмотренной выше кинетической трехступенчатой модели (см. § 7.2). При этом допущение о торможении продуктом по типу полного конкурентного ингибирования,



или полного неконкурентного ингибирования



приводит соответственно к уравнениям

$$\frac{d[X]}{dt} \frac{1}{[X]} = \mu = \frac{k_2 [S]}{K_s + [S] + K_s K_1 [P]} \quad (7.46)$$

$$\text{и } \frac{d[X]}{dt} \frac{1}{[X]} = \mu = \frac{k_2 [S]}{K_s + [S] + K_s K_1 [P] + K_1 [P][S]} \quad (7.47)$$

Уравнение Моно—Иерусалимского в виде (7.44) гораздо удобнее для применения, чем (7.43), поскольку последнее требует знания того конкретного продукта, который ответствен за торможение роста. Вариант (7.44) не только не предъявляет таких требований к эксперименту, но и подходит для торможения одновременно несколькими неизвестными метаболитами, хотя в этом случае коэффициент выхода  $\alpha$  становится эффективной величиной.

Поскольку рассмотренная зависимость по Моно—Иерусалимскому отличается от уравнения Моно лишь более сложным знаменателем, где вместо линейной функции  $[S]$  стоит квадратичная форма, включающая  $[S]^2$ , на практике экспериментальные данные по скоростям роста и накоплению биомассы во времени обрабатывают вначале по более простой зависимости, переходя в случае необходимости к более сложной.

В интегральном виде уравнение Моно—Иерусалимского является линейной функцией от сложных аргументов, включающих концентрацию субстрата  $[S]$ :

$$\tau = A \ln \frac{[S]_0}{[S]} + B ([S]_0 - [S]) + C \ln \frac{[X]_0}{[X]_{\max} - Y [S]} \quad (7.48)$$

$$\text{где } A = \frac{Y K_s (K_{ps} + [P]_0 + \alpha [S]_0)}{\mu_0 K_{ps} [X]_{\max}};$$

$$B = \frac{\alpha}{\mu_0 K_{ps}};$$

$$C = \frac{K_{ps} + [P]_0 + \alpha [S]_0 + \alpha K_s - \frac{\alpha}{Y} [X]_{\max} + \frac{Y K_s}{[X]_{\max}} (K_{ps} + [P]_0 + \alpha [S]_0)}{\mu_0 K_{ps}};$$

$$[X]_{\max} = [X]_0 + Y [S]_0.$$

Сложные интегральные формы уравнений Моно и Моно—Иерусалимского редко используют на практике из-за трудностей обработки экспериментальных данных. Чаще применяют дифференциальные зависимости (7.18) и (7.45), находя с помощью эксперимента непосредственно удельную скорость роста культуры и обрабатывая результаты в обратных координатах. Обращение выражения (7.18) приводит к уравнению

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (7.49)$$

которое описывается прямой в координатах  $1/\mu = \varphi(1/[S])$  на рис. 7.8.

Равенство (7.45) также можно привести к линейному виду путем обращения

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_{ps} - \alpha K_s + \alpha [S]_0}{\mu_0 K_{ps}} + \frac{K_s K_{ps} + \alpha K_s [S]_0}{\mu_0 K_{ps}} \frac{1}{[S]} - \frac{\alpha}{\mu_0 K_{ps}} [S], \quad (7.50)$$

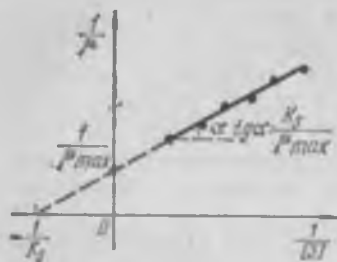


Рис. 7.8. Обработка экспериментальных данных по росту биомассы в обратных динатах (уравнение Моно)

однако такую зависимость представить графически не удастся. Коэффициенты уравнения и далее константы  $\mu_0$ ,  $K_s$ ,  $K_{ps}$  можно найти лишь расчетным путем по методу наименьших квадратов. Большую трудность при этом представля-

обычно определение коэффициента  $\alpha$ , который должен быть известен заранее из независимых экспериментов.

Это существенно ограничивает практическое использование уравнения Моно — Иерусалимского, тогда как более простая форма — уравнение Моно — является в настоящее время основой для оценки влияния субстрата на рост культур микроорганизмов. В частности, влияние условий культивирования — температуры, pH, давления и т. п. — обычно оценивают по изменению констант уравнения Моно.

#### § 7.4. Сложные модели роста популяций

Рассмотренные выше кинетические схемы микробиологических процессов не охватывают всей совокупности подходов, предлагавшихся различными авторами. Мы обсуждали лишь ту часть моделей роста, которые называют детерминированными, поскольку стохастические варианты обычно не имеют каких-либо преимуществ и лишь усложняют математический аппарат.

В последние годы большое развитие получили структурированные модели, значительный вклад в разработку которых внесли Г. А. Угодчиков, Л. А. Музыченко и др. Основным отличием этого класса моделей является системный подход к популяции микроорганизмов, позволяющий рассматривать свойства подсистем, т. е. учитывать изменения концентраций различных физиологически активных веществ внутри клеток в ходе их роста и развития. Очевидно, все подробно рассмотренные выше модели являются деструктурированными, поскольку рассматривают клетку как нечто целое и не учитывают изменения содержания отдельных компонентов.

Принципы конструирования структурированных моделей роста микробных популяций, их достоинства и недостатки изложены в работах И. Н. Блохиной, Г. А. Угодчикова

В. И. Иванова. Даны общая классификация моделей, конкретные примеры и подробное обсуждение структурированных моделей. Это позволяет нам не касаться такого типа зависимостей и отметить лишь, что их применение оказалось эффективным в ряде случаев. К сожалению, структурированные модели, содержащие большое число параметров, учитывают изменение во времени и таких компонентов клетки, которые не удается достаточно быстро анализировать, а в некоторых случаях включают концентрации веществ, которые вообще с трудом поддаются измерению.

Эти соображения иногда оказываются решающими с практической точки зрения, поэтому наряду с примерами весьма удачного применения структурированных моделей многие исследователи продолжают использовать детерминированные модели. Они построены по деструктурированному типу, сравнительно просты и вполне удовлетворительно помогают решать поставленные задачи.

К настоящему времени четко наметились две тенденции в кинетическом описании роста микробных популяций с помощью деструктурированных моделей. Одна из них заключается в получении системы дифференциальных и (или) алгебраических уравнений, минимально сложной, однако достаточной для адекватного описания всего объема имеющихся у экспериментатора данных. При этом за основу, осознанно или неосознанно, берется одна из приведенных выше моделей. Параметры получающейся системы уравнений находят из эксперимента, они, как правило, не имеют четкого физического смысла и пригодны только для описания конкретного массива экспериментальных данных. Обычно такие модели используют для управления процессом в том же реакторе, где проводился эксперимент, и в тех же пределах изменения начальных условий.

Вторая тенденция заключается в попытках использования строго детерминированных моделей, каждая из констант которых имеет четкий физический смысл, поскольку при составлении уравнений (как правило, дифференциальных) описывались кинетические закономерности вполне определенной физической модели процесса. Хотя этот подход крайне привлекателен прежде всего своей потенциальной возможностью использовать модель за пределами изученной области изменения начальных условий, он встречает значительные трудности из-за недостаточного глубокого понимания основных качественных и количественных закономерностей роста микробных популяций. Ярким подтверждением этого может служить уже упоминавшееся несоответствие математических описаний роста культур в периодическом биореакторе и проточном аппарате смешения.

В различных случаях разными авторами предлагались сложные деструктурированные модели, в той или иной степени учитывающие торможение субстратом, продуктами, влиянием гибели части клеток по линейному или квадратичному законам и т. п., например:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_S + [S] + K_P [P] + K_{PS} [P] [S]}, \quad (7.51)$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_S + [S] + K [S]^2 K_P + [P]} \quad (7.52)$$

$$\text{или } \frac{d[X]}{dt} = k_1 [X] \frac{[S]}{K_S + [S]} - k_2 [X] [P]. \quad (7.53)$$

П. И. Николаев с сотрудниками рассматривал глубокую аналогию между ростом культуры, тормозящимся одним из метаболитов — ингибиторов [I], и ферментативным процессом, в котором комплексы фермента с субстратом и ингибитором EI и SEI образуются с константами нестойкости  $K_i$  и  $K_{is}$ . Вводя обозначения

$$K_R = K_S / K_i \frac{[I]}{[S]_0 - [S]} \quad \text{и} \quad K_{PR} = \frac{[I]}{K_{is} ([S]_0 - [S])},$$

т. е. допуская линейную связь концентрации ингибитора с расходом субстрата, авторы получили такое выражение:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_S + [S] + K_R ([S]_0 - [S]) + K_{PR} ([S]_0 - [S])^2}. \quad (7.54)$$

По существу, оно не отличается от обычного уравнения Моно, в котором константа  $K_S$  является функцией  $[S]_0$ .

Практика промышленной биотехнологии показывает, что только разработка достаточно надежной кинетической модели процесса, имеющей хорошую экспериментальную основу и глубокий физический (и биологический) смысл, может гарантировать уверенное масштабирование процесса и сравнимость результатов. Ясно также, что в лабораторных условиях гораздо удобнее и эффективнее проводить исследования в периодическом режиме, тогда как ряд промышленных процессов целесообразно оформлять как непрерывные.

Одна из возможностей решений этой проблемы заключается в том, чтобы взять за основу достаточно простую феноменологическую модель и дополнить ее положениями, которые позволили бы описывать всю совокупность экспериментов. В первую очередь, требуют учета экспериментальные данные по зависимости удельной скорости роста от начальной концентрации субстрата, текущей концентрации продуктов и концентрации клеток. На рис. 7.6 и 7.7 были показаны зависимости удельной скорости роста  $\mu$  и экономического коэффициента

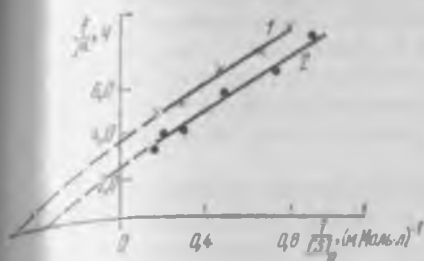


Рис. 7.9. Зависимость удельной скорости роста  $\mu$  от начальной концентрации субстрата при периодическом культивировании (обратные координаты)

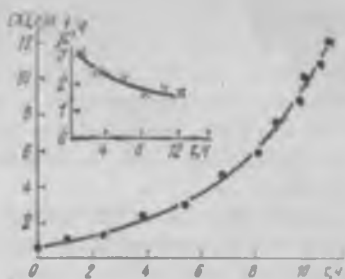


Рис. 7.10. Закономерности роста дрожжей на этаноле в мембранном биореакторе

та  $\mu$  от начальной концентрации субстрата. Напомним, что в тех же экспериментах зависимость между  $\mu$  или  $\bar{Y}$  и текущей концентрацией субстрата отсутствовала до почти полного его расходования.

Зависимости 7.6 и 7.7 спрямляются в обратных координатах (рис. 7.9). Следовательно, можно утверждать, что при периодическом процессе роста, по крайней мере, у некоторых микроорганизмов начальная концентрация субстрата определяет характер последующего роста в экспоненциальной фазе. При росте дрожжей рода *Candida* на этаноле было установлено, что завершение лаг-фазы совпадает с моментом, когда культура, еще не начавшая размножаться, уже поглотила субстрат в количестве, равном удвоенному расходному коэффициенту по источнику углерода, т. е.  $2/\bar{Y}$  г/г. Именно эта величина  $\bar{Y}$ , определяемая  $[S]_0$ , и поддерживается далее постоянной в ходе роста.

Проведенные нами эксперименты по культивированию тех же дрожжей на этаноле в мембранном биореакторе в условиях протока среды через мембрану, полностью задерживавшую клетки, показали, что удельная скорость роста в этих условиях постоянно возрастала (рис. 7.10). Отвод продуктов, которые выходили через мембрану вместе с потоком жидкости, должен был, согласно рассмотренной выше концентрации Н. Д. Иерусалимского, стабилизировать значение  $\mu$ , но никак не мог привести к росту этой величины.

Можно допустить, что постоянное возрастание удельной скорости роста при отводе тормозящих продуктов в ходе периодического роста популяции вызвано взаимным влиянием клеток, которые выделяют некоторый фактор, поддерживающий их рост. Подобные явления отмечены ранее для водорослей в работах С. В. Горюновой. Обработка полученной для

дрожжей на этаноле зависимости удельной скорости роста  $\mu$  от  $[X]$  (рис. 7.10) не противоречит предположению, что в условиях, когда ликвидировано торможение продуктами, является активирующее влияние на культуру некоторого фактора F. Его количество, по-видимому, связано с количеством биомассы, хотя нет оснований предполагать, что эта связь линейна.

В рамках кинетической интерпретации уравнений Моно—Иерусалимского (7.34) и (7.46) указание выше на наблюдения могут быть хотя бы частично объяснены, если предположить, что клетки способны ускорять рост и размножение под действием выделяемого ими же активного фактора F. В простейшем случае можно допустить, что фаза роста, т. е. превращения ассоциации XS в биомассу



протекает тем быстрее, чем выше концентрация F:

$$k_2 = k_{2,0} + k[F]. \quad (7.55)$$

При этом общее кинетическое уравнение (7.33) имеет вид

$$\frac{d[X]}{dt} = \frac{(k_{2,0} + k[F])[X][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (7.56)$$

Возможно также допущение об обратимом взаимодействии клеток с фактором F, в результате которого часть из них оказывается активированной  $[X^*]$ . Если это взаимодействие описывается равновесием



то все имеющиеся клетки будут представлять собой сумму обычных клеток  $[X]$  и активированных  $[X^*]$

$$[X]_{\text{общ}} = [X] + K[X][F],$$

откуда

$$[X] = \frac{[X]_{\text{общ}}}{1 + K[F]}.$$

Независимо от фактора F клетки способны присоединять субстрат, давая ассоциаты XS и  $X^*S$ , константы нестойкости которых одинаковы. Однако дальнейшие превращения — рост клеток и их подготовка к делению — протекают с константа-

ми скорости  $k_2$  и  $\beta k_2$ , где  $\beta > 1$ . Уравнение (7.34) принимает в этом случае вид

$$\frac{d[X]_{\text{общ}}}{dt} = \frac{k_2[X]_{\text{общ}} \left( \frac{1/K + \beta[F]}{1/K + [F]} \right) [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}. \quad (7.57)$$

Согласно уравнению (7.56) удельная скорость роста  $\mu$  линейно растет с увеличением концентрации фактора F:

$$\mu = (k_{2,0} + k[F]) \frac{[S]}{K_S + [S]}, \quad (7.58)$$

тогда как в соответствии с выражением (7.57) при малых F этот рост линеен ( $F \ll 1/K$ ):

$$\mu = (k_2 + \beta k_2 K[F]) \frac{[S]}{K_S + [S]}. \quad (7.59)$$

Затем при ( $F \gg 1/K$ ) должен замедляться прирост удельной скорости, которая стремится к пределу, равному  $\beta$ :

$$\mu = \frac{k_2 + \beta K[F]}{1 + K[F]} \frac{[S]}{K_S + [S]}. \quad (7.60)$$

Если в течение некоторого времени накопление фактора F пропорционально приросту биомассы, уравнения (7.58)—(7.59) должны превратиться в соответствующие зависимости от  $[X]$ , т. е.  $[F] = \alpha_F [X]$ . Рис. 7.10 показывает, что по мере накопления биомассы дрожжей, растущих на этаноле в мембранном биореакторе, увеличение удельной скорости роста соответствует зависимости (7.60).

Хорошими подтверждениями изложенной модели, допускающей наличие в популяции активирующего фактора F, выделяемого растущими клетками, служат известные из литературы факты: 1) существование минимальной концентрации инокулята, ниже которой рост клеток даже в сбалансированной среде не начинается; 2) наличие критической скорости подачи питательной среды в мембранный биореактор, выше которой рост прекращается, очевидно, из-за вымывания активирующего фактора и снижения его концентрации ниже некоторого минимума.

Можно предполагать, что уравнения (7.58)—(7.60) являются следствием изменения продолжительности одной из фаз роста и развития клетки. В. Н. Иванов и Г. А. Угодчиков отмечают, что лишь наиболее продолжительная из фаз, например для дрожжей фаза  $G_1$ , зависит от внешних условий, а остальные — S,  $G_2$  и M — имеют мало меняющуюся продолжительность. Именно фаза  $G_1$  представляет собой период подготовки клетки к репликации генетического материала. В ее ходе про-

исходит быстрый синтез белка, нуклеиновых кислот и т. п. Отмечено, что эта фаза — основной период роста клеток; ее длительность определяет продолжительность всего клеточного цикла.

Наименее изученным остается начальный период роста популяций (лаг-фаза), однако выше уже отмечалось, что при периодическом культивировании наблюдается четкая зависимость удельной скорости роста культуры в экспоненциальной фазе от начальной концентрации субстрата (см. рис. 7.6 и 7.7). По-видимому, именно в лаг-фазе клетки, привыкая к окружающей среде, вырабатывают определенные ферментные системы, в частности пермеазы, т. е. как бы настраиваются на рост в определенных условиях, определяемых начальными концентрациями компонентов питательной среды. Далее в ходе потребления питательных веществ заданные в лаг-фазе скорость роста и экономический коэффициент сохраняются до тех пор, пока лимитирующий субстрат не исчерпывается почти полностью (см. рис. 7.2).

Рассмотренная выше обобщенная кинетическая модель роста микробных популяций приводит в конце концов к зависимости скорости роста от концентраций клеток  $[X]$ , субстрата  $[S]$ , продуктов  $[P]$  и активирующего фактора  $[F]$ , выражаемой функцией

$$\frac{d[X]}{dt} = \frac{\varphi_1([F][S]_0)[X][S]}{K_S + \varphi_2([S], [P])}. \quad (7.61)$$

Конкретный вид функциональных зависимостей  $\varphi_1([F][S]_0)$  и  $\varphi_2([S], [P])$  определяется природой микроорганизмов, средой и условиями культивирования. При периодическом росте уравнение (7.61) часто аппроксимируется уравнением Мона, т. е.  $\varphi_1([F], [S]_0) = \mu_{\max} [S]_0$ ,  $\varphi_2([S], [P]) = [S]$ . Это объясняется, по-видимому, компенсацией роста числителя и знаменателя в выражении (7.60) вследствие одновременного накопления активирующего фактора  $F$  и тормозящих продуктов  $P$  в культуральной среде. В проточном аппарате смешения сама стационарная по составу среда задает характеристики роста культуры (см. ниже).

## § 7.5. Влияние условий культивирования на скорость роста микроорганизмов

Независимо от конкретного вида математического описания процесса культивирования микроорганизмов необходимо учитывать, что скорость роста и экономический коэффициент в значительной степени зависят от условий внешней среды.

Влияние температуры на скорость роста микробных популяций с трудом поддается количественному описанию. Известно, что все микроорганизмы условно делят на три группы — психрофилы, мезофилы и термофилы. Условной границей температуры для такой классификации можно считать 25°C: психрофилы, как правило, вообще не растут выше этой температуры, а термофилы — ниже нее. Конкретные виды температурной зависимости могут сильно варьировать для различных культур. Так, относимая к психрофилам морская бактерия способна расти в интервале от минус 10 до плюс 45°C, мезофильный вид *Xanthomonas citricola* размножается при 0—40°C, а термофил *Bacillus coagulans* имеет область культивирования 25—65°C. В то же время, особенно среди мезофилов, встречаются штаммы, крайне чувствительные к температуре, вся область размножения которых не превышает 10—15°C. *Acholeplasma blastoclosticum* растет лишь в интервале 34—42°C.

Внутри допустимого для любой культуры температурного интервала наблюдается экстремальная зависимость удельной скорости роста и экономического коэффициента от температуры, причем температурный оптимум часто оказывается достаточно узким и не превышает 2—4°C. В этих условиях наблюдаются максимумы удельной скорости роста и экономического коэффициента. Снижение величин  $\mu$  и  $Y$  за пределами оптимума связано обычно с изменением метаболических процессов и ростом затрат на поддержание. Поскольку такие изменения могут быть различными для разных типов микроорганизмов, как правило, не удается количественно связать величину экономического коэффициента с температурой, приходится ограничиваться конкретными значениями  $Y$ , полученными в конкретных опытах.

Влияние температуры на удельную скорость роста культуры графически изображается несимметричной кривой с максимумом (рис. 7.11). На участке возрастания скорости с температурой часто используют аррениусовскую зависимость

$$\mu = \mu_0 \exp(-E/RT), \quad (7.62)$$

где  $E$  — постоянная, аналог энергии активации химических реакций, имеет обычно величину порядка 35—50 кДж/моль;  $R$  — универсальная газовая постоянная.



Рис. 7.11. Температурная зависимость удельной скорости роста микроорганизмов

Этот подход к описанию  $\mu$  как функции абсолютной температуры  $T$  мог бы быть оправдан по принципу узкого места, т. е. на основании предположения об одной лимитирующей ферментативных процессов в клетке. Следует заметить, что само уравнение (7.62) описывает лишь отдельные небольшие участки кривой на рис. 7.11.

Влияние кислотности среды на рост и размножение микроорганизмов является общим законом, хотя отдельные культуры в большей или в меньшей степени чувствительны к изменению pH. Для всех микроорганизмов характерно наличие оптимальной области pH, в пределах которой культура растет наиболее интенсивно, изменение активной кислотности тормозит рост. Многие типы микроорганизмов имеют оптимум pH в области  $6,5 \pm 1,0$ , т. е. вблизи нейтральной точки pH 7,0. Для дрожжей характерна большая кислотоустойчивость — оптимум pH при 4—6.

Многие культуры способны расти в более кислой среде, чем оптимальная. Так, дрожжи удовлетворительно размножаются при pH около 3, что используется в промышленности для борьбы с посторонней микрофлорой в промышленных ферментаторах. Сдвиг pH в щелочную область угнетает практически все микробные культуры и используется поэтому в целях стерилизации жидких потоков. В отличие от удельной скорости роста величина экономического коэффициента мало меняется с изменением pH, хотя и для этого показателя характерна экстремальная связь с кислотностью культуральной среды.

Объяснение роли pH в культивировании микроорганизмов основывается на изложенных выше представлениях о pH-зависимости активности ферментов (см. главу 6). Некоторые авторы пытаются даже использовать модель, аналогичную выражению (6.69), т. е. допускают протонирование и депротонирование отдельных клеток, т. е. по существу, изменение их поверхностного заряда. Хотя такой подход позволяет в ряде случаев объяснить экспериментальные данные и даже найти эффективные значения  $pK_a$  и  $pK_b$ , в подавляющем большинстве работ не дается количественной связи  $\mu$  и  $Y$  с pH, а просто констатируется оптимальный интервал кислотности среды и графически изображается снижение удельной скорости роста и экономического коэффициента за пределами оптимальной области pH.

К важнейшим факторам внешней среды следует отнести концентрации растворенных газов — кислорода и диоксида углерода. Известно, что по отношению к первому из них микроорганизмы делятся на две большие группы — анаэробы и аэробы. При работе с культурами строгих анаэробов попадание кислорода в среду вызывает гибель клеток. Факультатив-

ные анаэробы способны переносить невысокие концентрации растворенного кислорода, однако процесс их роста и размножения угнетается кислородом и протекает тем лучше, чем сильнее соблюдается анаэробный режим.

Аэробные микроорганизмы требуют для роста определенной концентрации растворенного кислорода, что достигается или принудительной аэрацией среды. При достаточной степени аэрации лимитирующим субстратом становится, как правило, источник углерода. Однако малые концентрации растворенного кислорода приводят к тому, что именно он становится лимитирующим рост компонентом питательной среды. Это может произойти как вследствие неудовлетворительных условий массопереноса, так и в результате флокуляции клеток, или образования агрегатов, или их капсулирования, например при выделении внеклеточных полисахаридов. В последнем случае рост может тормозиться не только диффузией кислорода к клетке, но и диффузионным переносом остальных компонентов культуральной среды.

Некоторые авторы предлагают использовать уравнение типа Моно для описания роста мицелиальных культур или агрегированных клеток, а дополнительные диффузионные ограничения учитывать путем подбора константы  $K_s$  в знаменателе правой части уравнения (7.18). Предлагалось, в частности, считать, что экспериментальная величина  $K_s$  как в таких случаях представляет собой сумму некоторой «истинной» величины  $K_a$ , получаемой в отсутствие диффузионных осложнений, и дополнительной константы  $K_b$ , которая является функцией размера и типа флоккул, природы капсулирующих агентов, размеров капсул и т. п.

Аэробные микроорганизмы способны расти лишь при достаточно высоких концентрациях кислорода, тем не менее и для аэробных культур слишком интенсивная аэрация, как правило, нежелательна. Экспериментами неоднократно подтверждено, что высокие концентрации растворенного кислорода тормозят рост практически всех культур, их размножение и выделение продуктов метаболизма.

Менее изучено влияние  $CO_2$  на процесс культивирования клеток и культур тканей. Имеются сообщения о том, что слишком низкие концентрации растворенного  $CO_2$  не способствуют росту аэробных микроорганизмов, т. е. диоксид углерода как продукт дыхания должен в определенных количествах присутствовать в среде. В то же время высокие концентрации  $CO_2$  в среде тормозят развитие клеток и приводят к снижению удельной скорости роста и экономического коэффициента. Характерны небольшие добавки диоксида углерода к воздуху при культивировании кормовых дрожжей на жидких углеводо-

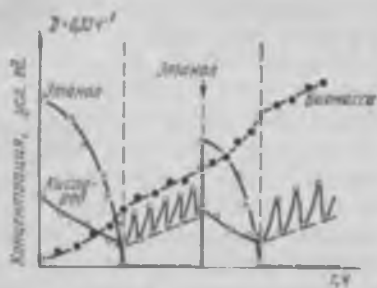


Рис. 7.12. Смена лимитирующего субстрата (этанол —  $O_2$ ) при периодическом культивировании дрожжей

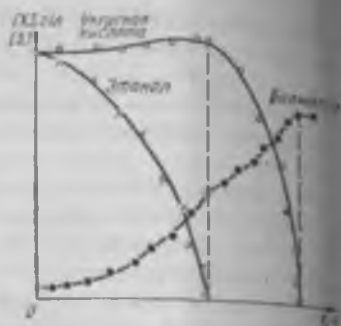


Рис. 7.13. Последовательное потребление субстратов — диауксия — при росте дрожжей на смесях этанола с винной кислотой

родах. Это может быть связано с излишним выносом  $CO_2$  из среды как продукта дыхания.

Следует отметить также существование определенной связи между влиянием растворенных газов — кислорода и диоксида углерода. Показано, что ингибирующее действие избытка кислорода в экспоненциальной фазе роста может быть отчасти компенсировано повышением концентрации растворенного  $CO_2$ . Имеются данные о стимулирующем действии кислорода в лаг-фазе, которое проявляется при его разбавлении диоксидом углерода.

Коснемся, наконец, вопроса о возможности лимитирования роста не одним, а сразу несколькими компонентами питательной среды, т. е. о так называемом множественном или, в простейшем случае, двойном лимитировании. Большинство авторов отвергает двойное лимитирование, если лимитирующие компоненты различны по своей природе, например являются источником углерода и кислородом. С использованием мембранного биореактора было показано, что переход к лимитированию кислородом при росте дрожжей на этаноле приводит к снижению удельной скорости роста и возрастанию концентрации субстрата в протоке (рис. 7.12). А резкое увеличение концентрации растворенного кислорода, приводящее к глубокому лимитированию этанолом (голодание), снижает концентрацию последнего почти до нуля и вызывает закономерные с примерно постоянным интервалом — колебания концентрации растворенного кислорода. Эти колебания прекращаются, если ввести в биореактор некоторое дополнительное количество спирта, снимающее эффект голодания, но не изменяющее лимитирующего фактора.

Несколько иначе выглядит явление лимитирования при использовании сложных субстратов состоящих из нескольких источников углерода одинаковой или различной природы. Одновременное присутствие в среде нескольких разных источников углерода, особенно если одним из них является глюкоза, приводит, как правило, к диауксии — поэтапному поглощению разных субстратов, первым из которых всегда оказывается глюкоза (глюкозный эффект). В отсутствие моносахаридов явление диауксии также может наблюдаться, например при росте дрожжей на смеси этанола с ацетатом поглощение уксусной кислоты происходило лишь после полного использования спирта (рис. 7.13).

При росте культур на смесях моносахаридов также отмечен глюкозный эффект: поглощение лактозы или галактозы из их равных смесей с глюкозой происходило только после использования последней.

Обычно принимают, что при росте на многокомпонентных источниках углерода потребление индивидуальных соединений происходит в последовательности, определяемой скоростью роста культуры: чем выше скорость размножения на данном субстрате, тем раньше происходит его потребление из смеси. Хотя ряд работ качественно подтверждает это правило, его нельзя считать абсолютно верным, поскольку количественных исследований в этой области еще явно недостаточно. Возможно, последовательность потребления индивидуальных субстратов из смеси коррелирует с их термодинамическими свойствами. Неясной пока остается и количественная связь между концентрациями компонентов в момент «переключения» роста с одного источника углерода на другой.

К сожалению, в настоящее время количественное описание роста микроорганизмов на сложных средах возможно лишь путем обработки серии экспериментов по культивированию определенного штамма на заданной смеси во вполне конкретных условиях, которые предполагается использовать в дальнейшем при укрупнении масштаба работ.

#### 7.6. Кинетика накопления продуктов метаболизма

Накопление продуктов метаболизма, образующихся в той или иной фазе роста культуры, является целью многих микробиологических производств, таких как промышленное получение аминокислот, ферментов, антибиотиков, спиртов, органических кислот и т. д. С точки зрения взаимосвязи между ростом популяции и накоплением метаболита в культуральной среде все продукты принято делить на две большие группы —

продукты, связанные с ростом, и вторичные метаболиты. Первая группа продуктов образуется как результат усвоения субстрата клетками в ходе их активного роста и размножения. Сюда относятся прежде всего продукты катаболических реакций — диоксид углерода при дыхании, молочная кислота, этанол и другие кислородсодержащие соединения при брожении. К этой же группе относятся и побочные продукты биосинтеза, в небольших количествах выделяемые клетками при росте, например уксусная кислота и этилацетат при выращивании дрожжей на этаноле, низшие карбоновые кислоты, выделяемые в среду при потреблении клетками *n*-алканов, и т. д.

Ко вторичным метаболитам принято относить вещества, биосинтез которых начинается только в определенной, как правило, поздней фазе роста, когда культура реагирует на изменение среды или преднамеренно производимое изменение ее состава. К этому типу относятся антибиотики, ряд ферментов и аминокислоты, синтезируемые ауксотрофными мутантами *Brevibacterium* или *Micrococcus*. Биосинтез всех этих соединений особенно интенсивно происходит в фазе замедления роста, а начинается обычно во второй половине логарифмической фазы.

Кинетические зависимости накопления продуктов, синтез которых связан с ростом, естественно коррелировать с концентрацией микроорганизмов в среде. Если каждая клетка продуцирует метаболит с некоторой усредненной скоростью  $\lambda$ , то

$$\frac{d[P]}{d\tau} = \lambda [X] \quad (7.63)$$

$$\text{или } \frac{d[P]}{d\tau} \frac{1}{[X]} = \lambda. \quad (7.64)$$

В этих моделях принимают постоянной удельную скорость накопления продукта  $\lambda$  и допускают, что популяция выделяет метаболиты с постоянной удельной скоростью. Неодинаковость фаз клеточного цикла у разных особей компенсируется большим количеством клеток в популяции. Зависимость (7.64) однозначно связывает процессы накопления биомассы и продуктов, поскольку

$$\frac{1}{\lambda} \frac{d[P]}{d\tau} = [X] \text{ и } \frac{1}{\mu} \frac{d[X]}{d\tau} = [X], \text{ т. е.}$$

$$\frac{1}{\lambda} \frac{d[P]}{d\tau} = \frac{1}{\mu} \frac{d[X]}{d\tau} \quad (7.65)$$

$$\text{или } \mu d[P] = \lambda d[X]. \quad (7.66)$$

Интегрируя выражение (7.66) и считая удельные скорости роста  $\mu$  и накопления продукта  $\lambda$  постоянными, получаем

$$\lambda \int_{[X]_0}^{[X]} d[X] = \mu \int_{[P]_0}^{[P]} d[P];$$

$$\lambda ([X] - [X]_0) = \mu ([P] - [P]_0),$$

откуда

$$[P] = [P]_0 + \frac{\lambda}{\mu} ([X] - [X]_0). \quad (7.67)$$

Зависимость (7.64) позволяет найти взаимосвязь между коэффициентом выхода продукта  $\alpha$  и другими кинетическими параметрами ферментации. Определим  $\alpha$  как дифференциальную селективность по данному продукту:

$$\alpha = -d[P]/d[S], \quad (7.68)$$

причем знак «минус» учитывает, что  $d[P] > 0$ , а  $d[S] < 0$ . Тогда с учетом выражения (7.66)

$$-ad[S] = d[P] = \frac{\lambda}{\mu} d[X]. \quad (7.69)$$

Связь текущих концентраций биомассы и субстрата определяется экономическим коэффициентом  $Y = -d[X]/d[S]$ , т. е.

$$-d[S] = \frac{1}{Y} d[X],$$

поэтому уравнение (7.69) можно преобразовать так:

$$\frac{\alpha}{Y} d[X] = \frac{\lambda}{\mu} d[X],$$

откуда

$$\alpha/Y = \lambda/\mu \quad \text{или} \quad \alpha\mu = \lambda Y. \quad (7.70)$$

Из (7.70) следует, что коэффициент выхода продукта  $\alpha$  и удельная скорость его накопления  $\lambda$  изменяются в ходе ферментации одинаково, поскольку экономический коэффициент и удельная скорость  $\mu$  остаются постоянными на протяжении экспоненциальной фазы роста. Известно, однако, что на величины  $\mu$  и  $Y$  влияет начальная концентрация субстрата  $[S]_0$  при периодическом культивировании. В общем случае  $\mu$  рассматривают как функцию концентрации субстрата  $[S]$ , описываемой уравнением Моно. Выражение для  $\lambda$ , которое получается с использованием уравнения Моно и функции (7.70), имеет вид

$$\lambda \frac{\alpha}{Y} \mu = \frac{\alpha \mu_{\max}}{Y} \frac{[S]}{K_s + [S]}. \quad (7.71)$$

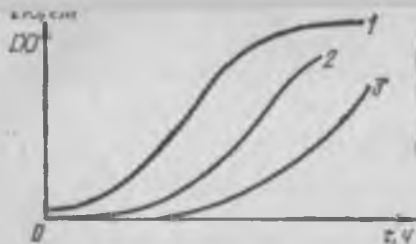


Рис. 7.14. Кинетика накопления продуктов метаболизма при периодическом культивировании:

1 — биомасса; 2 — продукты, связанные с ростом; 3 — вторичные метаболиты

теоретических предположений ставляет обычно аппроксимировать функцию  $\lambda_p$  от  $\tau$  полиномом, часто оказывается достаточно квадратичной формы

$$\lambda_p = b_0 + b_1\tau + b_2\tau^2 + \dots \quad (7.80)$$

Влияние режима культивирования на  $\lambda_p$  отражается в этом случае в зависимости постоянных  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  и др. в уравнении (7.80) от внешних условий, которую также приходится описывать подходящими эмпи-

рическими формулами. Таким путем удастся представить зависимость выхода многих антибиотиков от времени.

В заключение раздела следует отметить, что в ряде процессов, особенно при брожении, накопление продуктов может быть двояко связано с ростом культуры дрожжей и других микроорганизмов. С одной стороны, продукты, например этанол, появляются в результате внутриклеточных метаболических превращений субстрата (глюкозы), а с другой — как следствие ферментативных процессов, протекающих во внеклеточной среде под действием секретированных клетками экзоферментов. Как известно, такое явление было отмечено еще Л. Пастером, оно может оказаться существенным не только для спиртового брожения, но и в ряде других производств. Возможность более чем одного пути биосинтеза продукта следует учитывать при количественном изучении микробиологических процессов.

## § 7.7. Кинетика гибели микроорганизмов

Гибель части клеток в процессе роста популяции учитывается большинством моделей как процесс, протекающий параллельно и независимо от размножения жизнеспособных особей той же культуры. В ряде случаев, однако, именно гибель части или, в идеале, всех клеток данного типа становится целью процесса, как это бывает при стерилизации жидких и твердых сред, оборудования, вспомогательных материалов и т. д. Такая постановка задачи требует особых методов ее решения, способных гарантировать заданную степень асептики и воспроизводить результаты в промышленных условиях при длительной эксплуатации установок. В этом разделе дано краткое изложение основных кинетических закономерностей процесса стерилизации, поскольку именно они лежат в основе расчетов при разработке промышленных регламентов.

Основным методом стерилизации жидкостей и аппаратуры в лабораторных условиях является термический, связанный с достаточно длительным прогревом до заданной температуры. Гибель микроорганизмов при повышенной температуре происходит, как правило, со скоростью, пропорциональной концентрации клеток или спор, еще сохранивших жизнеспособность к данному моменту времени:

$$-\frac{d[X]}{dt} = k[X]. \quad (7.81)$$

Если в начальный момент времени при  $\tau=0$  концентрация жизнеспособных особей составляла  $[X]_0$ , то ко времени  $\tau$  она достигает величины

$$\ln \frac{[X]_0}{[X]} = k\tau \quad (7.82)$$

$$\text{или } [X] = [X]_0 \exp(-k\tau). \quad (7.83)$$

В приведенных выше уравнениях константу  $k$  называют обычно удельной скоростью гибели, а  $\ln[X]_0/[X]$  принято называть критерием стерилизации. Практически важной характеристикой оказывается время, за которое концентрация выживших клеток снижается в 10 раз. Из выражения (7.82) следует, что эта величина

$$\tau_{10} = 2,303/k. \quad (7.84)$$

При стерилизации жидких сред обычно задается величина критерия стерилизации. Затем по известному значению удельной скорости гибели при определенной температуре по уравнению (7.82) вычисляют необходимую продолжительность обработки  $\tau$ . Температуру стерилизации устанавливают, как правило, с учетом того, что ингредиенты питательной смеси подвергаются нежелательным превращениям при длительном прогреве. Гибель клеток и спор резко ускоряется с ростом температуры. Так, в интервале  $100-140^\circ\text{C}$   $k$  возрастает в  $10^4-10^5$  раз, при повышении температуры на  $10^\circ\text{C}$  удельная скорость гибели клеток и спор возрастает обычно в 10 раз и более. Температурную зависимость константы можно описать уравнением Аррениуса:

$$k = k_0 \exp(-E/RT). \quad (7.85)$$

Постоянную  $E$  в этом уравнении по аналогии с химической кинетикой называют энергией активации процесса гибели микроорганизмов. Она имеет большую положительную величину, так это видно из приведенного выше температурного коэффициента, который больше 10 (для жидкофазных химических реакций температурный коэффициент равен 2—3).

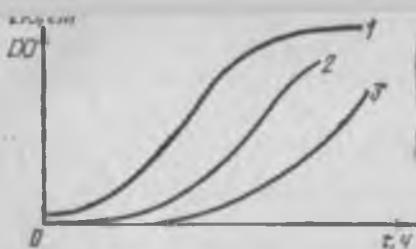


Рис. 7.14. Кинетика накопления продуктов метаболизма при периодическом культивировании:

1 — биомасса; 2 — продукты, связанные с ростом; 3 — вторичные метаболиты

теоретических предпосылок ставляет обычно аппроксимировать функцию  $\lambda_p$  от  $\tau$  полиномом, часто оказывается достаточно квадратичной формы

$$\lambda_p = b_0 + b_1\tau + b_2\tau^2 + \dots \quad (7.80)$$

Влияние режима культивирования на  $\lambda_p$  отражается в этом случае в зависимости постоянных  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  и др. в уравнении (7.80) от внешних условий, которую также приходится описывать подходящими эмпи-

рическими формулами. Таким путем удастся представить зависимость выхода многих антибиотиков от времени.

В заключение раздела следует отметить, что в ряде процессов, особенно при брожении, накопление продуктов может быть двояко связано с ростом культуры дрожжей и других микроорганизмов. С одной стороны, продукты, например этанол, появляются в результате внутриклеточных метаболических превращений субстрата (глюкозы), а с другой — как следствие ферментативных процессов, протекающих во внеклеточной среде под действием секретированных клетками экзоферментов. Как известно, такое явление было отмечено еще Л. Пастером, оно может оказаться существенным не только для спиртового брожения, но и в ряде других производств. Возможность более одного пути биосинтеза продукта следует учитывать при количественном изучении микробиологических процессов.

## § 7.7. Кинетика гибели микроорганизмов

Гибель части клеток в процессе роста популяции учитывается большинством моделей как процесс, протекающий параллельно и независимо от размножения жизнеспособных особей той же культуры. В ряде случаев, однако, именно гибель части или, в идеале, всех клеток данного типа становится целью процесса, как это бывает при стерилизации жидких и твердых сред, оборудования, вспомогательных материалов и т. д. Такая постановка задачи требует особых методов ее решения, способных гарантировать заданную степень асептики и воспроизводить результаты в промышленных условиях при длительной эксплуатации установок. В этом разделе дано краткое изложение основных кинетических закономерностей процесса стерилизации, поскольку именно они лежат в основе расчетов при разработке промышленных регламентов.

Основным методом стерилизации жидкостей и аппаратуры в лабораторных условиях является термический, связанный с достаточно длительным прогревом до заданной температуры. Гибель микроорганизмов при повышенной температуре происходит, как правило, со скоростью, пропорциональной концентрации клеток или спор, еще сохранивших жизнеспособность к данному моменту времени:

$$-\frac{d[X]}{dt} = k[X]. \quad (7.81)$$

Если в начальный момент времени при  $\tau=0$  концентрация жизнеспособных особей составляла  $[X]_0$ , то ко времени  $\tau$  она достигает величины

$$\ln \frac{[X]_0}{[X]} = k\tau \quad (7.82)$$

$$\text{или } [X] = [X]_0 \exp(-k\tau). \quad (7.83)$$

В приведенных выше уравнениях константу  $k$  называют обычно удельной скоростью гибели, а  $\ln[X]_0/[X]$  принято называть критерием стерилизации. Практически важной характеристикой оказывается время, за которое концентрация выживших клеток снижается в 10 раз. Из выражения (7.82) следует, что эта величина

$$\tau_{10} = 2,303/k. \quad (7.84)$$

При стерилизации жидких сред обычно задается величина критерия стерилизации. Затем по известному значению удельной скорости гибели при определенной температуре по уравнению (7.82) вычисляют необходимую продолжительность обработки  $\tau$ . Температуру стерилизации устанавливают, как правило, с учетом того, что ингредиенты питательной смеси подвергаются нежелательным превращениям при длительном прогреве. Гибель клеток и спор резко ускоряется с ростом температуры. Так, в интервале  $100-140^\circ\text{C}$   $k$  возрастает в  $10^4-10^5$  раз, при повышении температуры на  $10^\circ\text{C}$  удельная скорость гибели клеток и спор возрастает обычно в 10 раз и более. Температурную зависимость константы можно описать уравнением Аррениуса:

$$k = k_0 \exp(-E/RT). \quad (7.85)$$

Постоянную  $E$  в этом уравнении по аналогии с химической кинетикой называют энергией активации процесса гибели микроорганизмов. Она имеет большую положительную величину, как это видно из приведенного выше температурного коэффициента, который больше 10 (для жидкофазных химических реакций температурный коэффициент равен 2—3).

4. В условиях предыдущей задачи как вы оцените, при какой концентрации глюкозы ( $[S]_0 = 1,5\%$  мас.) скорость роста популяции уменьшится вдвое, если рост тормозится продуктом с константой  $K_p = 10^{-3}$  моль/л?

5. Как рассчитать удельную скорость роста метилотрофных бактерий *M. methylphilus* на метаноле и экономический коэффициент роста по полученным ниже экспериментальным данным:

|                            |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| т, ч                       | 0    | 0,5  | 1,0  | 1,5  | 2,0  | 2,5  | 3,0  | 3,5  |
| Оптическая плотность среды | 0,12 | 0,13 | 0,17 | 0,20 | 0,25 | 0,31 | 0,37 | 0,45 |

Максимальная оптическая плотность, достигнутая при исчерпании субстрата, равна 0,67, коэффициент пересчета на концентрацию биомассы равен 1,25 г/л, начальная концентрация метанола в среде 1,25 г/л.

6. В ряде случаев удобно использовать понятие удельной скорости метаболизма  $q$ , определяемой как скорость потребления субстрата, отнесенная к концентрации биомассы. Как вы объясните связь этой величины с удельной скоростью роста и удельной скоростью образования продуктов, связанных с ростом?

7. Как вы оцените затраты на поддержание по экспериментальным результатам культивирования бактерий *A. methylicus* на метаноле, если при полном исчерпании субстрата ( $[S]_0 = 3,2$  г/л) накапливалось указанное ниже количество биомассы, а в ходе роста достигались следующие удельные скорости:

|                                          |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Биомасса, г/л                            | 7,7   | 8,1   | 8,6   | 10,1  | 10,4  | 10,6  | 10,8  | 13,5  |
| Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup> | 0,017 | 0,018 | 0,022 | 0,046 | 0,048 | 0,085 | 0,100 | 0,150 |

8. Культура дрожжей растет на *n*-гексадекане с удельной скоростью  $0,5 \text{ ч}^{-1}$  и экономическим коэффициентом 0,95. Какова удельная скорость метаболизма *n*-гексадекана и удельная скорость образования углекислоты? Коэффициент выхода продукта, связанного с ростом, можно определить из стехиометрического уравнения, приведенного в главе 5.

9. Сахаромикеты растут на глюкозе с константой Моно, равной 25 мг/л. Во сколько раз изменится удельная скорость роста при изменении концентрации субстрата с 0,5 до 20 мг/л? За какое время будет потреблена половина субстрата, если экономический коэффициент можно принять равным 0,5 ( $\mu_{\max} = 0,4 \text{ ч}^{-1}$ )?

10. При какой константе скорости гибели клеток критерий стерилизации, равный 10, может быть достигнут за 1 ч? При какой температуре тот же результат может быть достигнут за 30 мин, если в предыдущем случае использовалась температура 120 °C?

## Глава 8. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПИСАНИЕ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ИДЕАЛЬНЫХ АППАРАТАХ

Глубинное культивирование микроорганизмов может проводиться в периодическом либо в непрерывном режиме. В первом случае используют аппараты с механическим или иным типом перемешивания. Это позволяет устранить градиенты температуры и концентраций субстратов и клеток по объему аппарата, т. е. создать условия, приближающиеся к таковым в идеальном периодическом биореакторе. При непрерывном глубинном культивировании возможно использование аппара-

тов, осуществляющих режим вытеснения (для тубулярных культур), приближающихся к биореактору идеального вытеснения. В нем концентрации субстратов и клеток изменяются только по длине, но не по радиусу аппарата, а обратное перемешивание в потоке полностью исключено.

Наибольший практический интерес представляет непрерывное культивирование в биореакторе полного смешения. Жидкая фаза в нем интенсивно перемешивается, постоянно подаются и выводятся жидкостные потоки, что позволяет поддерживать рабочий объем жидкой фазы в аппарате постоянным во времени. Ближе всего к аппаратам полного смешения биореакторы с непрерывным вводом питательной среды и отводом культуральной среды с клетками. Такой режим принято называть хемотростатным, причем постоянный ввод клеток не обязателен, поскольку в начальном периоде в аппарате производят периодическое культивирование и лишь затем включают подачу жидкой фазы с клетками или без них.

В практике микробиологических производств нашли применение установки, работающие по так называемому отъемно-доливному способу. При достижении концентрации биомассы (или по истечении заданного времени) определенную долю содержимого биореактора сливают и подают такой же объем свежей питательной среды. Лабораторным вариантом этого метода является турбидостатное культивирование, когда при достижении некоторой концентрации клеток автоматически включается подача свежей среды и слив содержимого биореактора. При достижении заданного минимального значения концентрации клеток подача среды автоматически выключается и наращивание биомассы протекает некоторое время в периодических условиях. При достаточно малых пределах изменения концентрации клеток от максимума к минимуму турбидостат приближается к аппарату полного смешения. Однако ввиду сложности автоматического управления этот метод нашел лишь лабораторное применение.

Целью количественного описания процессов культивирования в биореакторах являются расчет и оптимизация производительности аппарата в заданных условиях, а также определение необходимого объема аппаратуры. Общепринятым методом решения таких задач является предварительный расчет в предположении, что ферментатор моделируется одним из идеальных биореакторов. Затем учитывается неидеальность конкретного биореактора на основании исследования гидродинамики, тепло- и массопереноса в реальном аппарате. Ниже рассмотрена лишь первая часть решения задачи, поскольку расчеты реальных биореакторов детально рассмотрены в монографиях по теории химических и биохимических реакторов.

## § 8.1. Глубинное культивирование в идеальном периодическом биореакторе

Идеальный периодический реактор объема  $V$  обеспечивает полное смешение всех веществ, в том числе и клеток, по объему и отсутствие градиента температур, т. е.  $d[X]/dV=0$ ,  $d[S_i]/dV=0$ ,  $dT/dV=0$ . Для подсчета количества биомассы, получающейся в таком аппарате за определенное время, а также расхода всех элементов питательной среды используют дифференциальное уравнение материального баланса:

$$dM_X = r_X V d\tau, \quad (8.1)$$

$$dM_{S_i} = r_{S_i} V d\tau, \quad (8.2)$$

где  $r_X$  и  $r_{S_i}$  — скорости образования биомассы и расходования субстратов — определяют как количество биомассы клеток  $M_X$ , образующейся в единице объема аппарата в единицу времени, или количество молей (или граммов) субстрата данного вида  $M_{S_i}$ , расходующееся в единице объема культуральной среды в единицу времени.

Количество биомассы можно выражать числом клеток данного вида либо через массу абсолютно сухого вещества (г АСБ).

Скорости расходования всех компонентов питания  $S_i$  связаны стехиометрическим уравнением (см. главу 5), причем если за лимитирующий субстрат принять источник углерода  $S_C$ , расход всех компонентов будет определяться соотношением

$$\frac{1}{v_C} r_{S_C} = \frac{1}{v_i} r_{S_i} = \dots \quad (8.3)$$

Соотношение скоростей расходования лимитирующего субстрата и накопления биомассы определяется экономическим коэффициентом  $Y = -\frac{dM_X}{dM_{S_C}}$ , поскольку из выражения (4.3)

$$\begin{aligned} \frac{dM_X}{V d\tau} &= r_X; & \frac{dM_{S_C}}{V d\tau} &= r_{S_C}; \\ r_X &= -\frac{1}{Y} r_{S_C}. \end{aligned} \quad (8.4)$$

Знак «минус» показывает, что скорость накопления биомассы положительна ( $r_X > 0$ ), а скорости расходования всех субстратов отрицательны ( $r_{S_i} < 0$ ).

При постоянном объеме среды  $V$  уравнение (8.1) позволяет провести интегрирование

$$\int_0^{\tau} d\tau = \int_{M_{X,0}}^{M_X} \frac{dM_X}{r_X V} = \int_{[X]_0}^{[X]} \frac{d[X]}{r_X}, \quad (8.5)$$

используя очевидное равенство  $[X] = M_X/V$ . Аналогичное интегрирование уравнения (8.2) дает

$$\int_0^{\tau} d\tau = \int_{M_{S_I,0}}^{M_{S_I}} \frac{dM_{S_I}}{r_{S_I} V} = \int_{[S_I]_0}^{[S_I]} \frac{d[S_I]}{r_{S_I}}, \quad (8.6)$$

Уравнения (8.5) и (8.6) связывают продолжительность культивирования с накоплением биомассы и расходом лимитирующего субстрата:

$$\tau = \int_{[X]_0}^{[X]} \frac{d[X]}{r_X} = \int_{[S_I]_0}^{[S_I]} \frac{d[S_I]}{r_{S_I}}. \quad (8.7)$$

Это уравнение аналогично уравнениям для периодического процесса в химическом реакторе, только величина  $\tau$  для микробиологического синтеза представляет собой промежуток времени от начала развития культуры, т. е. с момента окончания лаг-фазы, когда появляется возможность определить выражение для скорости  $r_X$  или  $r_{S_C}$ . Интегрирование правой части уравнения (8.7) возможно, если соответствующие скорости будут представлены как функции  $r_X = \varphi_1([X])$  и  $r_{S_C} = \varphi_2([S_C])$ . Так, для простейшего случая  $r_X = \mu[X]$ , тогда

$$\tau = \int_{[X]_0}^{[X]} \frac{d[X]}{\mu[X]} = \frac{1}{\mu} \int_{[X]_0}^{[X]} d \ln [X] = \frac{1}{\mu} \ln \frac{[X]}{[X]_0}, \quad (8.8)$$

$$\text{т. е. } [X] = [X]_0 \exp(\mu\tau), \quad (8.9)$$

что соответствует экспоненциальной модели роста.

Использование уравнения Моно дает более сложную форму правой части уравнения (8.7) и приводит к следующему выражению:

$$\tau = \int_{[X]_0}^{[X]} \frac{d[X]}{\mu_{\max} [X] \frac{[S]}{K_S + [S]}},$$

откуда с учетом равенства  $[X] - [X]_0 = Y([S]_0 - [S])$ , позво-

ляющего выразить  $[S]$  через  $[X]$  и  $[X]_{\max} = [X]_0 + Y[S]_0$ ,

$$\mu_{\max} \tau = \frac{YK_S}{[X]_{\max}} \ln \frac{Y[S]_0}{[X]_{\max} - [X]} + \left(1 + \frac{YK_S}{[X]_{\max}}\right) \ln \frac{[X]}{[X]_0}. \quad (8.10)$$

Уравнения (8.8) и (8.10) дают возможность подсчитать время, которое необходимо для накопления в ферментаторе определенной концентрации биомассы в том случае, если не произойдет смены лимитирующего субстрата. Это может привести к изменению  $\mu$ ,  $\mu_{\max}$  и  $K_S$  в ходе ферментации. Указанные зависимости удобно использовать для расчета производительности идеального периодического биореактора по биомассе и нахождения оптимальных значений этой величины.

Производительность ферментатора по биомассе определяют как прирост массы клеток в единице объема за единицу времени в среднем по всей операции, т. е.

$$G_X = \frac{M_X - M_{X,0}}{V\tau} = \frac{[X] - [X]_0}{\tau}. \quad (8.11)$$

Для периодического процесса производительность равна средней скорости прироста биомассы. Мгновенная скорость роста культуры  $r_X$  как функция от  $[X]$  и  $[S]$  определяет возможность оптимизации периодического биореактора по времени. Однако для этого нельзя использовать выражение (8.9), согласно которому скорость накопления неограниченно растет с ростом  $[X]$ , т. е. производительность аппарата не имеет оптимума по времени, а должна была бы непрерывно возрастать в ходе процесса.

Ранее отмечалось, что при малых концентрациях субстрата зависимость скорости прироста биомассы от времени определяется уравнением Моно и интегральным выражением (8.10), которое и можно использовать для оптимизации (рис. 8.1). Поиск оптимума  $G_X$  по  $\tau$  требует приравнивания нулю производной  $dG_X/d\tau$ . Согласно уравнению (8.11)

$$\frac{dG_X}{d\tau} = \frac{1}{\tau} \frac{d[X]}{d\tau} - \frac{[X] - [X]_0}{\tau^2} = 0, \quad (8.12)$$

тогда в точке экстремума

$$\frac{d[X]}{d\tau} = 0 = \frac{d[X]}{d\tau} - G_X, \quad (8.13)$$

т. е.

$$\begin{aligned} & \frac{YK_S}{[X]_{\max}} \frac{[X]^{\text{опт}} - [X]_0}{[X]_{\max} - [X]^{\text{опт}}} + \left(1 + \frac{YK_S}{[X]_{\max}}\right) \frac{[X]^{\text{опт}} - [X]_0}{[X]^{\text{опт}}} = \\ & = \frac{YK_S}{[X]_{\max}} \ln \frac{Y[S]_0}{[X]_{\max} - [X]^{\text{опт}}} + \left(1 + \frac{YK_S}{[X]_{\max}}\right) \ln \frac{[X]^{\text{опт}}}{[X]_0}. \end{aligned} \quad (8.14)$$

На практике время операции значительно превышает оптимальное время активного роста культуры, которое можно найти, подставляя  $X_{\text{опт}}$  из (8.14) в кинетическое уравнение (8.10). Действительно, при перерасчете продолжительность операции складывается из времени стерилизации  $\tau_c$ , загрузки  $\tau_z$ , продолжительности лаг-фазы  $\tau_l$ , активного роста  $\tau$  и выгрузки  $\tau_v$ , т. е.

$$\tau_{\text{общ}} = \tau_c + \tau_z + \tau_l + \tau + \tau_v.$$

Очевидно, истинная производительность аппарата

$$G_X = \frac{[X] - [X]_0}{\tau_{\text{общ}}},$$

однако эта величина также окажется наибольшей при достижении  $[X]_{\text{опт}}$ . Тем не менее такой подход к оптимизации процесса биосинтеза — далеко не единственный и не во всех случаях оправдан. Оптимизируя производительность биореактора по биомассе, нельзя забывать и о расходе субстрата, который при достижении  $[X]_{\text{опт}}$  будет израсходован не полностью. Это может отразиться на экономичности процесса, если субстрат дорог, дефицитен и трудно регенерируется; решение вообще неприемлемо, если биомасса не должна содержать остаточного субстрата, как это обуславливается, например, требованиями к качеству белка одноклеточных, растущих на *n*-алканах. В последнем случае приходится вводить стадию «дозревания», т. е. выдерживать клетки некоторое время по завершении активного роста для более полной утилизации ими запасенного субстрата.

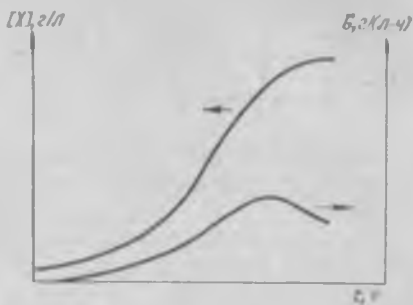


Рис. 8.1. Графическая интерпретация оптимального накопления биомассы в периодической культуре

## § 8.2. Культивирование микроорганизмов в проточном аппарате идеального вытеснения

Использование непрерывно действующих (проточных) аппаратов для культивирования микроорганизмов имеет целый ряд преимуществ перед периодическими процессами. Как было показано ранее, открытые системы, к которым относятся проточные биореакторы, в силу особых свойств приходят в стационарное состояние, когда все параметры системы, в том числе и концентрации всех компонентов среды, включая клетки, остаются неизменными во времени. Это резко упрощает управ-

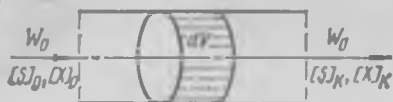


Рис. 8.2. Схема аппарата идеального вытеснения, используемого для культивирования микроорганизмов

ление работой ферментационного оборудования, автоматизацию процесса и обеспечивает стабильную работу всех последующих стадий.

На вход непрерывно действующих ферментаторов подается постоянный поток жидкости со скоростью  $W_0$  [в л/с или м<sup>3</sup>/ч], содержащий субстраты и клетки в концентрациях  $[S]_0$  и  $[X]_0$ . Таким образом, в единицу времени в аппарат поступают потоки субстрата (в г/с, моль/с, кг/ч):

$$F_{S,0} = [S]_0 W_0 \quad (8.15)$$

и клеток (в г/с, кг/ч):

$$F_{X,0} = [X]_0 W_0. \quad (8.16)$$

При рабочем объеме аппарата по жидкой фазе  $V$  (в л, м<sup>3</sup>) время пребывания в биореакторе (по терминологии, принятой в микробиологии, синонимы: время замещения или удержания) определяется как  $\tau = V/W_0$  (в л·с/л), а обратная величина  $W_0/V = D$  [в с<sup>-1</sup>, ч<sup>-1</sup>] называется скоростью разбавления и является синонимом приведенной объемной скорости, принятой в теории химических реакторов.

Расчет процесса накопления биомассы в аппаратах идеального вытеснения (рост тубулярной культуры) основан на дифференциальном материальном балансе для элемента  $dV$  объема биореактора (рис. 8.2):

$$dF_X = r_X dV, \quad (8.17)$$

откуда

$$dV = dF_X / r_X. \quad (8.18)$$

После интегрирования

$$\int_0^V dV = V = \int_{F_{X,0}}^{F_X} \frac{dF_X}{r_X}. \quad (8.19)$$

Для микробиологических процессов изменение объема жидкой фазы в аппарате нехарактерно, т. е.  $W_0 = \text{const}$ , тогда

$$V = \int_{F_{X,0}}^{F_X} \frac{dF_X}{r_X} = W_0 \int_{[X]_0}^{[X]_K} \frac{d[X]}{r_X}, \quad (8.20)$$

иначе

$$-\frac{V}{W_0} = \tau = \int_{[X]_0}^{[X]_k} \frac{d[X]}{r_X}, \quad (8.21)$$

где  $[X]_k$  — концентрация клеток на выходе из аппарата.

В экспоненциальной фазе роста  $r_X = \mu[X]$ , в этом случае уравнение (8.21) можно проинтегрировать

$$\tau = \frac{1}{\mu} \ln \frac{[X]_k}{[X]_0} = \frac{1}{D}, \quad (8.22)$$

т.е.  $[X]_k = [X]_0 \exp(\mu\tau) = [X]_0 \exp(\mu/D). \quad (8.23)$

Уравнения (8.22) и (8.23) не отличаются по форме от выражений (8.8) и (8.9), полученных ранее для периодического культивирования. Однако  $\tau = 1/D$  в этом случае имеет смысл длительности пребывания в аппарате или обратной величины скорости разбавления, а не абсолютной продолжительности протекания процесса, как это характерно для периодического режима. Использование более точного уравнения Моно при интегрировании уравнения (8.21) приводит к выражению, также аналогичному (8.10), которое было получено ранее:

$$\frac{\mu_{\max}}{D} = \left(1 + \frac{YK_S}{[X]_{\max}}\right) \ln \frac{[X]_k}{[X]_0} + \frac{YK_S}{[X]_{\max}} \ln \frac{Y[S]_0}{[X]_{\max} - [X]_k}. \quad (8.24)$$

Для тубулярных культур нахождение  $\tau$  или  $D$ , которые следует использовать в уравнениях (8.22) и (8.24), еще более сложно, чем в периодических процессах роста. Крайне трудно зафиксировать окончание лаг-фазы и начало роста, поскольку все фазы роста происходят в потоке. Расстояние от начала трубки, которая представляет собой реализацию аппарата идеального вытеснения, однозначно связано с длительностью пребывания в биореакторе, а экспериментальное определение сечения, в котором начинается размножение клеток, представляет собой трудную задачу.

Если объем биореактора, в котором происходит рост, известен, т. е. известны  $\tau$  и  $D$ , производительность аппарата может быть найдена по формуле

$$G_X = \frac{[X]_k - [X]_0}{\tau} = D([X]_k - [X]_0),$$

с учетом выражения (8.24)

$$G_X = \frac{\mu_{\max}([X]_k - [X]_0)}{\left(1 + \frac{YK_S}{[X]_{\max}}\right) \ln \frac{[X]_k}{[X]_0} + \frac{YK_S}{[X]_{\max}} \ln \frac{Y[S]_0}{[X]_{\max} - [X]_k}}. \quad (8.25)$$

Оптимизация  $G_x$  может быть проведена приравняв к нулю производной  $dG_x/d[X]_k$ , поскольку уравнение (8.25) представляет собой явную функцию  $G_x$  от  $[X]_k$ . Такой вариант оптимизации приводит к равенству [после дифференцирования выражения (8.25)]:

$$\begin{aligned} \left(1 + \frac{YK_s}{[X]_{\max}}\right) \ln \frac{[X]_k^{\text{опт}}}{[X]_0} + \frac{YK_s}{[X]_{\max}} \ln \frac{Y[S]_0}{[X]_{\max} - [X]_k^{\text{опт}}} = \\ = \frac{[X]_k^{\text{опт}} - [X]_0}{[X]_{\max}} \left\{ \frac{[X]_{\max} + YK_s}{[X]_k^{\text{опт}}} + \frac{YK_s}{[X]_{\max} - [X]_k^{\text{опт}}} \right\}. \quad (8.26) \end{aligned}$$

Из уравнения (8.26), аналогичного (8.14), можно найти оптимальное значение концентрации клеток на выходе  $[X]_k^{\text{опт}}$ , а после подстановки в (8.25) и (8.24) рассчитать оптимальные величины производительности  $G_x^{\text{опт}}$  и скорости разбавления  $D_{\text{опт}}$ .

К приведенному выше варианту оптимизации относится все, что было сказано ранее по поводу оптимизации периодической ферментации.

### § 8.3. Культивирование микроорганизмов в проточном аппарате полного смешения. Хемостатные культуры

Аппараты полного смешения непрерывного действия для получения биомассы широко используют не только в лабораториях, но и в промышленности. Основные причины популярности этого типа ферментаторов — простота конструкций, легкость поддержания заданного режима и возможность длительного непрерывного культивирования. Рост микроорганизмов в таких биореакторах имеет ряд особенностей. В частности, закономерности хемостатного процесса, как принято называть этот тип ферментации, частично не совпадают с законами протекания химических реакций в реакторах полного смешения.

Как и в любой открытой системе, стационарные концентрации клеток и всех веществ в культуральной среде устанавливаются после некоторого начального периода и теоретически могут существовать на стационарном уровне неопределенно долго, пока внешние условия сохраняются постоянными. Это означает, что стационарные концентрации клеток  $[X]$  и субстратов  $[S]$  связаны с соответствующими концентрациями во входном потоке  $[X]_0$  и  $[S]_0$  уравнениями материального баланса

$$Vr_x + W_0[X]_0 - W[X] = 0; \quad (8.27)$$

$$W_0[S]_0 - W[S] - V \frac{1}{Y} r_x = 0. \quad (8.28)$$

Если выразить скорость прироста биомассы  $r_x$  по уравнению Моно, то

$$r_x = \mu [\bar{X}] = \mu_{\max} [\bar{X}] \frac{[\bar{S}]}{K_s + [\bar{S}]} ;$$

$$V \mu_{\max} \frac{[\bar{S}]}{K_s + [\bar{S}]} [\bar{X}] + W_0 [X]_0 - W_0 [\bar{X}] = 0. \quad (8.29)$$

Деля уравнение (8.29) на объем ферментатора  $V$  и учитывая, что  $W_0/V = D$ , получим

$$\mu_{\max} \frac{[\bar{S}]}{K_s + [\bar{S}]} [\bar{X}] = \mu [\bar{X}] = D ([\bar{X}] - [X]_0). \quad (8.30)$$

Это выражение является основным кинетическим уравнением процесса ферментации в режиме хемостата, причем в общем случае  $[X]_0 \neq 0$ , т. е. входящий поток может содержать некоторое количество клеток. В соответствии с уравнением (8.30) экспериментально было найдено, что подача клеток на вход в аппарат не обязательна, т. е. хемостат может работать и без подпитки свежей культурой, когда  $[X]_0 = 0$ . Эксплуатация такого биореактора, который принято называть отдельно работающим хемостатом, начинается с периодического культивирования некоторой засевной дозы (инокулята). После перехода культуры в экспоненциальную фазу включают непрерывную подачу питательной среды со скоростью [в л/с или м<sup>3</sup>/ч]. Для такого режима в стационарном состоянии уравнение (8.30) приобретает вид:

$$\begin{aligned} \mu [\bar{X}] &= D [\bar{X}] \\ \text{или} \quad \mu &= D, \end{aligned} \quad (8.31)$$

который часто называют законом хемостата. Смысл выражения (8.31) заключается в том, что при стационарной эксплуатации хемостата удельная скорость роста культуры устанавливается равной скорости разбавления  $D$ , которая задана подбором параметров  $V$  и  $W_0$ . Существование равенства (8.31) возможно потому, что  $\mu$  есть функция стационарной концентрации субстрата. Она принимает значение, определяемое свойствами культуры, т. е. константами  $\mu_{\max}$  и  $K_s$  уравнения Моно

$$\mu_{\max} \frac{[\bar{S}]}{K_s + [\bar{S}]} = D,$$

откуда

$$[\bar{S}] = K_s \frac{D}{\mu_{\max} - D}. \quad (8.32)$$

Уравнение (8.32) не включает стационарной концентрации клеток, последняя может быть рассчитана только на основании известного экономического коэффициента (при  $[X]_0=0$ )

$$Y = \frac{[\bar{X}]}{[S]_0 - [\bar{S}]},$$

$$\text{т.е. } [\bar{X}] = Y ([S]_0 - [\bar{S}]) = Y \left( [S]_0 - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \right). \quad (8.33)$$

Из уравнения (8.32) следует одна важная особенность хемостата, принципиально отличающая его от химического реактора полного смешения. Действительно, концентрация субстрата  $[\bar{S}]$  не может быть отрицательной, поэтому знаменатель правой части уравнения должен быть положительным, т.е.  $D < \mu_{\max}$ . Можно показать, однако, что существует еще более жесткое ограничение для задаваемой экспериментатором величины скорости разбавления  $D$ . При заданной начальной концентрации лимитирующего субстрата  $[S]_0$  удельная скорость роста  $\mu$ , а значит, и  $D$ , согласно (8.31), не может превзойти величины, определяемой уравнением Моно:

$$0 \leq D \leq \mu_{\max} \frac{[S]_0}{K_S + [S]_0}. \quad (8.34)$$

Правая часть двойного неравенства (8.34) определяет так называемую критическую скорость разбавления  $D_{кр}$ , которая соответствует случаю, когда концентрации субстрата на входе в аппарат и выходе из него совпадают. Это происходит потому, что в условиях, когда задана слишком большая скорость разбавления, время пребывания клеток в аппарате  $\tau = 1/D$  становится меньше времени удвоения, т.е. клетки не успевают делиться и вымываются из биореактора. Отметим, что такое же явление будет наблюдаться для случая  $[X]_0 \neq 0$ , поскольку в этих условиях при  $D > D_{кр}$  клетки также не успеют разделиться за время пребывания в аппарате и стационарное  $[X]$  будет равно  $[X]_0$ , т.к. в уравнении (8.27)  $r_X$  окажется равной нулю. Как известно, химические реакции в аппаратах смешения протекают на некоторую глубину при любом, самом малом времени пребывания, т.е. любой конечной скорости подачи  $W_0$ .

Зависимость стационарных концентраций клеток и субстрата в хемостате от скорости разбавления при  $D < D_{кр}$  приведена на рис. 8.3. Из рисунка видно, что вблизи  $D_{кр}$  режим работы хемостата делается неустойчивым (велики абсолютные значения производных  $d[\bar{X}]/dD$  и  $d[\bar{S}]/dD$ ), т.е. сам метод исследования становится неэффективным. Обычно в этих случаях переходят к использованию турбидостата, где никаких ограничений по  $[X]$  и  $[S]$  не существует.

Важным экспериментальным результатом, неоднократно подтвержденным в хемостатном режиме, является взаимосвязь стационарных концентраций клеток и субстрата по уравнению Моно. Собственно, и само это уравнение впервые получило подтверждение и стало популярным после проверки его при хемостатном культивировании. Напомним, что применение этой зависимости при пернотическом культивировании затруднено в силу ряда рассмотренных выше причин. Чрезвычайно удобным оказался хемостатный метод и для выявления влияния стимуляторов и ингибиторов роста. Введение любой добавки во входящий поток вызывает повышение или понижение  $[X]$ , что может быть только следствием роста или падения удельной скорости  $\mu$ . Крайне просто выявить в хемостате лимитирующий субстрат, т. к. увеличение концентрации именно этого вещества в питании отразится положительно на росте клеток, т. е. на величине  $[X]$ . Остальные компоненты не окажут влияния на  $\mu$  и  $[X]$ , если они не лимитируют рост и не являются стимуляторами или ингибиторами.

Производительность отдельно работающего хемостата по биомассе определяется как число клеток, образующихся в единицу времени в единице объема биореактора:

$$G_X = \frac{[\bar{X}]}{\tau} = D [\bar{X}] = DY \left( [S]_0 - \frac{DK_S}{\mu_{\max} - D} \right). \quad (8.35)$$

Производительность  $G_X$  меняется в зависимости от скорости разбавления  $D$ . Можно найти скорость протока (т. е. время пребывания), при которой производительность по биомассе будет максимальной. В точке оптимума  $dG_X/dD = 0$ , следовательно, необходимо дифференцировать правую часть (8.35) по  $D$  и решить полученное уравнение относительно  $D_{\text{опт}}$ . Эта величина оказывается равной

$$D_{\text{опт}} = \mu_{\max} \left( 1 - \sqrt{\frac{K_S}{[S]_0 + K_S}} \right). \quad (8.36)$$

Подстановкой  $D_{\text{опт}}$  в соответствующие уравнения получаем

$$[\bar{S}]_{\text{опт}} = K_S \frac{D_{\text{опт}}}{\mu_{\max} - D_{\text{опт}}} = Y K_S ([S]_0 + K_S) - K_S; \quad (8.37)$$

$$[\bar{X}]_{\text{опт}} = Y ([S]_0 - [\bar{S}]_{\text{опт}}) = Y ([S]_0 + K_S) - Y \sqrt{K_S ([S]_0 + K_S)} \quad (8.38)$$

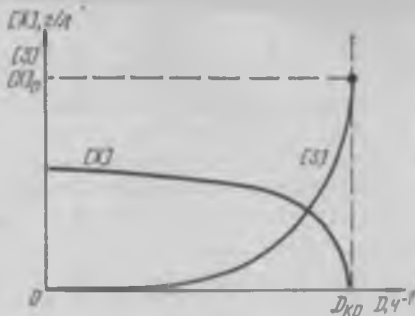


Рис. 8.3. Влияние скорости разбавления  $D$  на стационарные концентрации биомассы и субстрата в отдельно работающем хемостате

и, наконец,

$$G_X^{\text{опт}} = D_{\text{опт}} [\bar{X}]_{\text{опт}} = Y \mu_{\text{max}} (V[\bar{S}]_0 + K_S - V\bar{K}_S)^2. \quad (8.39)$$

Если ферментатор полного смешения работает в каскаде аппаратов, то во входном потоке могут содержаться клетки в концентрации  $[X]_0$ , появившиеся на предыдущих стадиях. В этом случае уравнение материального баланса по биомассе (8.27) после подстановки  $r_X = \mu[X] = (\mu_{\text{max}}[S])/(K_S + [S])$  приобретает вид

$$r_X + \frac{W_0}{V} [X]_0 - \frac{W_0}{V} [\bar{X}] = 0; \quad (8.40)$$

$$\mu[\bar{X}] + D([X]_0 - [\bar{X}]) = 0,$$

$$\text{или } \mu_{\text{max}} \frac{[\bar{S}]}{K_S + [\bar{S}]} + D([X]_0 - [\bar{X}]) = 0. \quad (8.41)$$

Выражая величину  $D$  из этих уравнений, получим

$$D = \mu \frac{[\bar{X}]}{[\bar{X}] - [X]_0} = \mu_{\text{max}} \frac{[\bar{S}]}{K_S + [\bar{S}]} \frac{[\bar{X}]}{[\bar{X}] - [X]_0}. \quad (8.42)$$

Правая часть уравнения (8.42) содержит две взаимосвязанные переменные  $[\bar{S}]$  и  $[\bar{X}]$ , причем  $([\bar{X}] = [X]_0 + Y([S]_0 - [\bar{S}]))$ . Подстановка этой формулы и преобразования приводят к квадратному уравнению

$$[\bar{S}]^2 (\mu_{\text{max}} Y - DY) + [\bar{S}] (DY[S]_0 - DYK_S - D[X]_0 - \mu_{\text{max}} Y[S]_0) + DK_S(Y[S]_0 - [X]_0) = 0, \quad (8.43)$$

которое является расчетным для нахождения стационарной концентрации субстрата при заданных значениях  $D$  и  $[X]_0$ .

По найденной величине  $[S]$  находят  $[X]$  с использованием известного значения экономического коэффициента.

Производительность хемостата с подачей биомассы на вход определяется приростом клеток  $([X] - [X]_0)$  за время пребывания  $\tau = 1/D$ , т. е.

$$G_X = \frac{[\bar{X}] - [X]_0}{\tau} = D([\bar{X}] - [X]_0). \quad (8.44)$$

С учетом выражения (8.42) равенство (8.44) приводит к следующему уравнению, где  $[X]_{\text{max}} = [X]_0 + Y[S]_0$ ,

$$G_X = \mu[\bar{X}] = \mu_{\text{max}} \frac{[\bar{S}][\bar{X}]}{K_S + [\bar{S}]} = \mu_{\text{max}} \frac{[\bar{S}]( [X]_{\text{max}} - Y[\bar{S}] )}{K_S + [\bar{S}]} \quad (8.45)$$

Оптимизация функции (8.45) может быть легко проведена дифференцированием ее правой части по  $[S]$  и приравниванием

производной нулю. Известно, что при максимуме производительности все параметры процесса, в том числе и стационарные концентрации биомассы, субстрата, продуктов и пр., будут оптимальными. Указанные преобразования приводят к квадратному уравнению

$$[\bar{S}]_{\text{опт}}^2 + 2K_S [\bar{S}]_{\text{опт}} - \frac{[X]_{\text{max}} K_S}{Y} = 0,$$

Отбрасывая отрицательный корень этого уравнения, получаем формулу для расчета оптимальной концентрации субстрата в аппарате

$$[\bar{S}]_{\text{опт}} = \sqrt{K_S \left( K_S + \frac{[X]_{\text{max}}}{Y} \right)} - K_S, \quad (8.46)$$

откуда

$$\begin{aligned} [\bar{X}]_{\text{опт}} &= [X]_0 + Y ([S]_0 - [S]_{\text{опт}}) = \\ &= [X]_0 + Y \left( [S]_0 + K_S - \sqrt{K_S \left( K_S + \frac{[X]_{\text{max}}}{Y} \right)} \right). \end{aligned} \quad (8.47)$$

Дальнейший расчет по известным формулам позволяет найти остальные параметры, отвечающие максимальной производительности по биомассе:

$$\mu_{\text{опт}} = \mu_{\text{max}} \frac{[\bar{S}]_{\text{опт}}}{K_S + [\bar{S}]_{\text{опт}}} = \mu_{\text{max}} \left( 1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + \frac{[X]_{\text{max}}}{Y}}} \right); \quad (8.48)$$

$$D_{\text{опт}} = \frac{\mu_{\text{опт}} [\bar{X}]_{\text{опт}}}{[\bar{X}]_{\text{опт}} - [\bar{X}]_0} = \frac{\mu_{\text{опт}} ([X]_0 + Y ([S]_0 - [\bar{S}]_{\text{опт}}))}{Y \left\{ [S]_0 + K_S - \sqrt{K_S \left( K_S + \frac{[X]_{\text{max}}}{Y} \right)} \right\}}. \quad (8.49)$$

С учетом выражения (8.42) максимальная производительность хемостата, работающего с подачей биомассы на вход аппарата, определяется простым выражением

$$G_X^{\text{опт}} = D_{\text{опт}} ([\bar{X}]_{\text{опт}} - [X]_0) = \mu_{\text{опт}} [\bar{X}]_{\text{опт}}. \quad (8.50)$$

Входящие сюда величины находят по уравнениям (8.48) и (8.49).

Хемостат может оказаться последним из аппаратов каскада и использоваться как «дозреватель». Его задачей оказывается не максимальный прирост биомассы, а наиболее полная утилизация субстрата, в том числе субстрата, занесенного клетками в ходе роста на предыдущих стадиях. Понятно, что в этом случае требуется выполнить условие  $[S] \rightarrow 0$  и учесть соответствующие параметры процесса, прежде всего время пребывания т.

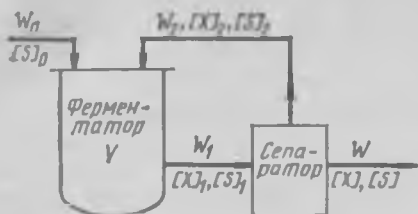


Рис. 8.4. Схема отдельно работающего хемостата с рециклом сгущенной биомассы или осветленной жидкости

культуры столь невелики, что могут не учитываться при расчетах, где условно принимается  $[X]_0 = 0$ .

Интересным вариантом хемостатного культивирования микроорганизмов является использование блоков «биореактор—сепаратор», позволяющих осуществлять рецикл потоков осветленной жидкости, где  $[X_2] < [X_1]$ , или сгущенной биомассы, для которой  $[X_2] > [X_1]$ . Рассмотрим простейшую установку такого рода (рис. 8.4), в которой отдельно работающий хемостат ( $[X]_0 = 0$ ) сочетается с сепарирующим устройством, частично возвращающим поток жидкости в ферментатор. При объемной скорости подачи питания в хемостат  $W_0$  и скорости выхода жидкой фазы из системы  $W$  объемные скорости внутренних потоков (выходящего из хемостата  $W_1$  и возвращаемого в него  $W_2$ ) связаны очевидными соотношениями:

$$W_0 = W \quad \text{и} \quad W_1 = W_0 + W_2 = W + W_2.$$

Работу сепарирующего устройства характеризуют кратность деления потока жидкости — кратность рециркуляции  $a = W_2/W = W_2/W_0$  и степень сепарации  $b = [X_2]/[X_1]$ . Последняя определяет, какой поток — осветленная жидкость или сгущенная биомасса — возвращается в аппарат в качестве внутреннего рецикла. В зависимости от настройки сепаратора кратность рециркуляции  $a$  может быть практически любой положительной величиной, т. е. существует единственное ограничение  $a \geq 0$ . Степень сепарации  $b$  также всегда положительна, причем при рецикле осветленной жидкости  $b < 1$ , а при возврате сгущенной биомассы  $b > 1$ .

Материальный баланс ферментатора, находящегося в составе установки с рециклом, с учетом обозначений, принятых на рис. 8.4, имеет вид

$$W_2 [\bar{X}_2] + V r_x - W_1 [\bar{X}_1] = 0.$$

Поскольку  $r_x = \mu [X_1]$ , то

$$W_2 [\bar{X}_2] + V \mu [\bar{X}_1] - W_1 [\bar{X}_1] = 0 \quad (8.51)$$

В промышленных процессах непрерывного производства белка одноклеточных свежую культуру часто подают небольшими дозами непрерывно или периодически. Это мероприятие призвано поддержать активность основной культуры и снизить концентрацию посторонней микрофлоры в ходе неасептической ферментации. Как правило, вводимые при этом дозы

$$[\bar{X}_1] = \frac{W_2 [\bar{X}_2]}{W_1 - V\mu} \quad (8.52)$$

Выражая через кратность рециркуляции  $W_2 = aW$  и  $W_1 = W + aW = (1+a)W$ , а через степень сепарации  $[\bar{X}_2] = b[\bar{X}_1]$ , преобразуем выражение (8.52):

$$[\bar{X}_1] = \frac{aWb[\bar{X}_1]}{(1+a)W - V\mu},$$

откуда после сокращения

$$(1+a)W - V\mu = abW$$

или  $(1+a-ab)W = V\mu$

и, деля на  $V$ , окончательно получим

$$(1+a-ab)D = \mu. \quad (8.53)$$

Выражение в скобках принято называть фактором рециркуляции  $u = 1+a-ab$ , скорость разбавления  $D = W/V = W_0/V$  имеет в этом случае условный характер. Она не связана с фактическим временем пребывания в ферментаторе  $\tau$ , а соответствует той величине  $\tau_{усл}$ , которая была бы в отсутствие рецикла в отдельно работающем хемостате объема  $V$  с подачей  $W_0$ . Таким образом, введение рецикла изменяет основное уравнение отдельно работающего хемостата (8.31) на величину коэффициента  $u$

$$\mu = uD. \quad (8.54)$$

Это означает, что и в остальных зависимостях, описывающих хемостатное культивирование с рециклом, соответствующие выражения, полученные ранее для хемостата без подачи биомассы, будут видоизменяться введением фактора рециркуляции, например из уравнения (8.32):

$$[\bar{S}_1] = K_s \frac{Du}{\mu_{max} - Du}. \quad (8.55)$$

Концентрация субстрата  $[S_1]$  (см. рис. 8.4) в потоке, выходящем из ферментатора с рециклом, не изменяется при последующей сепарации, т. е.  $[S] = [S_1] = [\bar{S}_2]$ . Концентрация клеток на выходе из установки  $[X]$  определяется разностью начальной и конечной концентраций субстрата  $[X] = Y([S]_0 - [\bar{S}_1])$ . Производительность комплекса биореактор — сепаратор по биомассе может быть рассчитана по формуле

$$G_X = D[X] = DY \left( [S]_0 - K_s \frac{Du}{\mu_{max} - Du} \right). \quad (8.56)$$

Дифференцируя уравнение (8.56) по  $D$  и приравнявая  $dG_X/dD=0$  находим

$$D_{\text{опт}} = \frac{\mu_{\text{max}}}{u} \left( 1 - \sqrt{\frac{K_s}{[S]_0 + K_s}} \right). \quad (8.57)$$

Эта величина отличается от полученной ранее по уравнению (8.36) для хемостата без рецикла только фактором рециркуляции  $u$  в знаменателе. Расчет оптимальных значений  $[S_1]$  и  $[X_1]$  показывает, что

$$[\bar{S}_1]_{\text{опт}} = K_s \frac{D_{\text{опт}} u}{\mu_{\text{max}} - D_{\text{опт}} u} = \sqrt{K_s (K_s + [S]_0)} - K_s. \quad (8.58)$$

$$[\bar{X}]_{\text{опт}} = Y([S]_0 - [\bar{S}_1]_{\text{опт}}) = Y([S]_0 + K_s) - Y \sqrt{K_s (K_s + [S]_0)}. \quad (8.59)$$

Производительность по биомассе для хемостата с рециклом в оптимальном режиме

$$G_X^{\text{опт}} = D_{\text{опт}} [\bar{X}]_{\text{опт}} = Y \frac{\mu_{\text{max}}}{u} (\sqrt{K_s + [S]_0} - \sqrt{K_s})^2 \quad (8.60)$$

отличается от аналогичной величины в отсутствие рецикла. Это различие определяется значением фактора рециркуляции  $u = 1 + a - ab$ , стоящим в знаменателе выражения (8.60). Таким образом, введение рецикла жидкости в отдельно работающем хемостате путем сочетания его с сепаратором изменяет производительность хемостата в  $1/u$  раз. В зависимости от конкретной величины параметра  $u$  результаты могут быть прямо противоположными.

Значение  $u > 1$  достигается, если  $ab < a$ , т. е.  $b < 1$ . Это соответствует соотношению  $[X_2] < [X_1]$ , когда на рецикл возвращается осветленная жидкость. Таким образом, этот тип рециркуляции снижает производительность ферментатора полного смешения. Обратный результат получается при  $u < 1$ , что может быть при  $ab > a$  или  $b > 1$ ,  $u < 1$  достигается при  $[X_2] > [X_1]$ , т. е. в том случае, когда рецикл содержит сгущенную биомассу.

Эти результаты показывают, что от способа подключения сепаратора зависит производительность установки в целом. С точки зрения производства биомассы эффективным является возвращение части клеток в небольшом объеме жидкости (после сгущения потока, выходящего из ферментатора) в биореактор, т. е. обеспечение условия  $u < 1$ . Недостатком такого способа интенсификации процесса культивирования оказывается, однако, то, что возврат сгущенной биомассы приводит к многократной циркуляции одних и тех же клеток внутри системы ферментатор—сепаратор. Это вызывает увеличение среднего возраста культуры в биореакторе и, как следствие, снижение ее активности, в частности падение константы  $\mu_{\text{max}}$ . Особенно нежелательным может оказаться при  $u < 1$  не столько снижение

максимальной удельной скорости роста, которая компенсируется отмиранием и лизисом части клеток, приходящими обычно к стимулированию роста популяции, сколько возможность заражения культуры в ферментаторе посторонней микрофлорой. При многократном рецикле она получает благоприятные условия для размножения, поскольку производство неасептическое.

Рецикл осветленной жидкости, приводящий к  $\mu > 1$  и снижению производительности аппаратуры, тем не менее находит применение в биотехнологии. Теоретически он может оказаться полезным для более полной утилизации дорогих и дефицитных субстратов, а на практике часть жидкости после сепарации клеток возвращают в ферментатор, чтобы уменьшить поток воды, идущий на очистные сооружения. К сожалению, дополнительным фактором, ограничивающим рецикл, оказывается в этом случае торможение продуктами, которые повторно попадают в ферментатор с потоком осветленной жидкости. Ввиду изложенного выше хеостаты с рециклом не нашли широкого применения, несмотря на то, что теоретически они могут обеспечить рост производительности аппаратов без увеличения их объема.

#### § 8.4. Культивирование отъемно-доливным способом

Одним из распространенных вариантов осуществления процесса ферментации является отъемно-доливной способ, который можно назвать полунепрерывным. По этому методу после проведения периодического культивирования до достижения некоторой концентрации биомассы  $[X]_k$  часть объема жидкости сливают из аппарата и направляют на переработку, а такой же объем свежей питательной среды вносят в аппарат и продолжают процесс ферментации до накопления вновь той же конечной концентрации клеток. Циклы ферментация — слив — долив повторяют непрерывно, в результате через определенные промежутки времени каждый из серий биореакторов дает определенную порцию продукта, а вся батарея практически непрерывно поставляет биомассу последующим технологическим стадиям.

При расчете биореактора, работающего по отъемно-доливному способу, задаются объемом жидкости в аппарате  $V$  [в л или м<sup>3</sup>], и чаще всего конечной концентрацией биомассы  $[X]_k$ . Если объем сливаемой жидкости обозначить через  $V_c$ , а ее долю через  $p = V_c/V$ , то после долива свежей среды в аппарате установится концентрация культуры

$$[X]_n = [X]_k \frac{V - V_c}{V} = [X]_k (1 - p).$$

Обозначая концентрацию лимитирующего субстрата в свежей питательной среде  $[S]_0$ , можно найти концентрацию субстрата в начале каждого из циклов ферментации

$$[S]_n = \{[S]_k (V - V_c) + [S]_0 V_c\} \frac{1}{V} = [S]_k + p ([S]_0 - [S]_k), \quad (8.61)$$

где  $[S]_k$  — концентрация субстрата в конце цикла ферментации.

Поскольку экономический коэффициент  $Y$  можно считать постоянным для всех циклов, то для первого цикла справедливо равенство  $[X]_k - [X]_0 = Y ([S]_0 - [S]_k)$ . Здесь  $[X]_0$  — концентрация инокулята, внесенного для инициирования всего процесса. В ходе каждого цикла текущие концентрации клеток  $[X]$  и субстрата  $[S]$  связаны аналогичным соотношением  $[X] - [X]_n = Y ([S]_n - [S])$ , а для цикла в целом

$$[X]_k - [X]_n = Y ([S]_n - [S]_k).$$

Подставляя в это равенство выражения для  $[X]_n$  и (8.61), получим

$$[X]_k - (1 - p) [X]_k = Y ([S]_k + p [S]_0 - p [S]_k - [S]_k)$$

или после упрощения

$$[X]_k = Y ([S]_0 - [S]_k). \quad (8.62)$$

Используя приведенную выше связь  $[X]$  и  $[S]$ , получаем

$$[S] = \frac{[X]_n + Y [S]_n - [X]}{Y} = \frac{(1 - p) Y ([S]_0 - [S]_k) - [X]}{Y} + [S]_k + p ([S]_0 - [S]_k)$$

или окончательно

$$[S] = \frac{Y [S]_0 - [X]}{Y}. \quad (8.63)$$

В каждом из циклов роста накопление биомассы выражается дифференциальным уравнением, использованным ранее для описания периодического процесса, которое с учетом выражения (8.63) приводится к виду

$$\frac{d[X]}{d\tau} = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_S + [S]} [X] = \mu_{\max} \frac{[X] (Y [S]_0 - [X])}{Y (K_S + [S]_0) - [X]}. \quad (8.64)$$

Его интегрирование в пределах от  $[X]_n$  до  $[X]_k$ , т. е. в течение цикла роста продолжительностью  $\tau$ , дает

$$\frac{K_S}{[S]_0} \ln \frac{Y [S]_0 - (1 - p) [X]_k}{Y [S]_0 - [X]_n} - \left( \frac{K_S}{[S]_0} + 1 \right) \ln (1 - p) = \mu_{\max} \tau. \quad (8.65)$$

Выражение (8.65) описывает связь между продолжительностью роста  $\tau$  в одном цикле и долей сливаемого объема  $p =$

$= V_c/V$  при заданной конечной концентрации биомассы и известных параметрах процесса, в том числе константах уравнения Моно для данной культуры.

Реальная продолжительность  $\tau_d$  складывается из времени слива продукта, добавления свежей питательной среды и роста. Последняя величина, как правило, намного превосходит остальные, так что можно считать, что продолжительность отдельной операции приближается к времени роста биомассы от  $[X]_n$  до  $[X]_k$  т. е.  $\tau_d \approx \tau$ . Производительность отдельного отъемно-доливного ферментатора в этом случае может быть найдена по формуле

$$G_X = \frac{[X]_k V_c}{\tau_n V} \cong \frac{[X]_k}{\tau} \quad (8.66)$$

или с учетом выражения (8.65)

$$G_X = \frac{\mu_{\max} p [S]_0 [X]_k}{K_S \ln \frac{Y [S]_0 - (1-p) [X]_k}{Y [S]_0 - [X]_k} - (K_S + [S]_0) \ln (1-p)} \quad (8.67)$$

При заданном значении  $[X]_k$  производительность аппарата оказывается функцией  $p$ , т. е. доли сливаемого в каждом цикле объема жидкости, поскольку начальная концентрация субстрата обычно определяется технологическими соображениями (растворимость, ингибирующее действие и т. п.). Это позволяет поставить вопрос о подборе оптимального значения  $p$ , обеспечивающего максимум производительности, что может быть сделано дифференцированием и приравниванием нулю производной  $dG_X/dp$ . Если обозначить знаменатель уравнения (8.67) через  $B$ , то

$$\frac{dG_X}{dp} = \frac{\mu_{\max} [S]_0 [X]_k B - \mu_{\max} [S]_0 [X]_k \times \left\{ \frac{K_S [X]_k}{Y [S]_0 - (1-p) [X]_k} + \frac{K_S + [S]_0}{(1-p)} \right\}}{B^2} \quad (8.68)$$

Из условия  $dG_X/dp$  для точки оптимума необходимо приравнять нулю числитель производной (8.68), что дает

$$K_S \ln \frac{Y [S]_0 - (1-p) [X]_k}{Y [S]_0 - [X]_k} + (K_S + [S]_0) \ln (1-p) + \frac{K_S p [X]_k}{Y [S]_0 - (1-p) [X]_k} - (K_S + [S]_0) \frac{p}{1-p} = 0. \quad (8.69)$$

Из уравнения (8.69) можно найти  $p = p^{\text{opt}}$ , обеспечивающее наибольшую производительность ферментатора по биомассе. Отметим, что  $p^{\text{opt}}$  зависит только от параметров роста культуры и  $K_S$  и определяется заданными значениями концентрации субстрата в свежей загрузке  $[S]_0$  и концентрации биомассы  $[X]_k$  в сливе.

Как и для других способов культивирования, производительность по биомассе может оказаться неосновным фактором, определяющим эффективность отъемно-доливного процесса, однако в каждом конкретном случае может быть сформулирована соответствующая задача оптимизации и найдено ее решение с помощью приведенных в этом разделе основных зависимостей процесса отъемно-доливного (циклического) культивирования.

### § 8.5. Культивирование микроорганизмов в системе из нескольких идеальных биореакторов

Параллельное и последовательное соединение непрерывно действующих ферментаторов оказывается во многих случаях целесообразным в производственных условиях, поэтому количественное описание процессов культивирования в сложных аппаратных системах представляет практический интерес. Данный вопрос достаточно подробно рассмотрен в ряде монографий, перечисленных в списке литературы, поэтому подробное обсуждение вопроса в рамках учебника не проводится. Ограничимся лишь изложением основных принципов расчета и оптимизации параллельно и последовательно соединенных проточных ферментаторов на примере процессов получения биомассы.

Батарея параллельно соединенных хемостатов (рис. 8.5) имеет общую линию подачи сырья, по которой с объемной скоростью  $W_0$  подается питательная смесь с содержанием лимитирующего субстрата  $[S]_0$ . Поток питания разделяется на входе в разные аппараты на отдельные составляющие  $W_i$ , так что  $W_0 = \sum_{i=1}^n W_i$ . Объемы отдельных ферментаторов  $V_i$  обеспечивают скорости разбавления в каждом из них  $D_i = V_i / W_i$ , тогда как суммарная величина

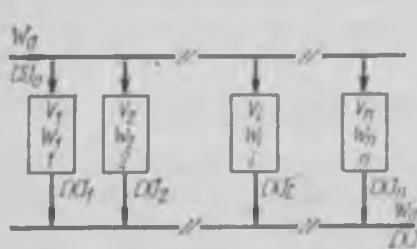


Рис. 8.5. Схема параллельного соединения хемостатов

$$D = \sum_i V_i / \sum_i W_i = \frac{V}{W_0}.$$

Выходящие из отдельных биореакторов потоки соединяются в общем коллекторе, в результате на выходе установившейся концентрации биомассы  $[X]$  и субстрата  $[S]$  связаны с соответствующими концентрациями в отдельных аппаратах

$$[\bar{X}] = \frac{\sum_{i=1}^n [\bar{X}]_i W_i}{W_0}; \quad [\bar{S}] = \frac{\sum_{i=1}^n [\bar{S}]_i W_i}{W_0}.$$

Как обычно,  $[X] = Y([S]_0 - [S])$  и  $[X]_i = Y([S]_0 - [S]_i)$ .

Поскольку подача биомассы в батарею отсутствует, материальные балансы каждого ферментатора имеют вид

$$V_i \mu_{\max} \frac{[\bar{S}]_i}{K_S + [\bar{S}]_i} [\bar{X}]_i - W_i [\bar{X}]_i = 0. \quad (8.70)$$

По аналогии с ранее полученными зависимостями (8.32) и (8.35)

$$[\bar{S}]_i = \frac{K_S W_i}{\mu_{\max} V_i - W_i} = \frac{K_S D_i}{\mu_{\max} - D_i} \quad (8.71)$$

и производительность отдельного хемостата из батареи

$$G_{X, i} = \frac{W_i}{V_i} [\bar{X}]_i = D_i Y ([S]_0 - [\bar{S}]_i). \quad (8.72)$$

Общая производительность батареи

$$G_X = \frac{Y \sum_{i=1}^n W_i ([S]_0 - [\bar{S}]_i)}{V}. \quad (8.73)$$

Если параметры роста культуры  $\mu_{\max}$  и  $K_S$  в разных аппаратах одинаковы, можно показать, что максимальная производительность  $G_X$  батареи в целом достигается при равномерном распределении потоков по аппаратам так, чтобы скорости разбавления в каждом ферментаторе совпадали с общей скоростью разбавления

$$\frac{W_i^{\text{опт}}}{V_i} = D_i^{\text{опт}} = D = \frac{\sum_{i=1}^n W_i}{\sum_{i=1}^n V_i} = \frac{W_0}{V}, \quad (8.74)$$

т. е. объемные подачи в каждый аппарат пропорциональны его объему:

$$\frac{W_1}{V_1} = \frac{W_2}{V_2} = \dots = \frac{W_i}{V_i} = \dots = \frac{W_n}{V_n} \quad \text{или} \quad \frac{W_i}{W_j} = \frac{V_i}{V_j}.$$

Другой вариант соединения хемостатов — каскад последовательно соединенных биореакторов, в котором поток, выходящий из предыдущего аппарата, вводится в последующий без подпитки субстратом (рис. 8.6). Как известно, при достаточно боль-

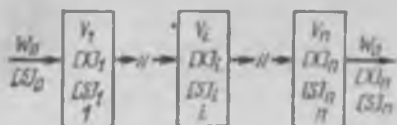


Рис. 8.6. Схема последовательного соединения хемостатов

шом числе ячеек полного смешения их каскад по своим гидродинамическим характеристикам приближается к реактору идеального вытеснения. Именно поэтому вместо неудобных во многих отношениях тубулярных культур на практике предпочитают вести биосинтез в каскаде хемостатов, что, в частности, резко упрощает аэробные процессы глубинного культивирования.

Согласно рис. 8.6 объемная скорость потока через всю систему биореакторов остается постоянной и равной  $W_0$ . На вход системы подается питательная смесь с концентрацией лимитирующего субстрата  $[S]_0$ . В любом  $i$ -м ферментаторе устанавливается стационарный режим с концентрациями биомассы  $[X]_i$  и субстрата  $[S]_i$ . Общий объем каскада  $V$  складывается из объемов каждой ячейки, так что

$$V = \sum_{i=1}^n V_i.$$

Скорость разбавления в отдельном аппарате  $D_i = W_0/V_i$ , общая скорость разбавления  $D = W_0/V$ , материальный баланс  $i$ -го звена

$$V_i \mu_{\max} \frac{[\bar{S}]_i}{K_S + [\bar{S}]_i} [\bar{X}]_i + W_0 [\bar{X}]_{i-1} - W_i [\bar{X}]_i = 0, \quad (8.75)$$

откуда

$$D([\bar{X}]_i - [\bar{X}]_{i-1}) = \mu_{\max} \frac{[\bar{S}]_i}{K_S + [\bar{S}]_i} [\bar{X}]_i. \quad (8.76)$$

Прирост биомассы на каждой ступени связан с убылью субстрата через экономический коэффициент:

$$[\bar{X}]_i - [\bar{X}]_{i-1} = Y([\bar{S}]_{i-1} - [\bar{S}]_i). \quad (8.77)$$

Из выражения (8.75) следует, что с учетом уравнения (8.77)

$$V_i = \frac{YW_0([\bar{S}]_{i-1} - [\bar{S}]_i)}{\mu_{\max} \frac{[\bar{S}]_i}{K_S + [\bar{S}]_i} [\bar{X}]_i}.$$

Так как экономический коэффициент постоянен по всему каска-

ду и  $[\bar{X}]_i = Y([S]_0 - [\bar{S}]_i)$ , то

$$V_i = \frac{W_0 ([\bar{S}]_{i-1} - [\bar{S}]_i)}{\mu_{\max} \frac{[\bar{S}]_i}{K_S + [\bar{S}]_i} ([S]_0 - [\bar{S}]_i)}. \quad (8.78)$$

Если обозначить степень превращения субстрата в  $i$ -м ферментаторе через

$$\xi_i = \frac{[\bar{S}]_{i-1} - [\bar{S}]_i}{[\bar{S}]_{i-1}} = 1 - \frac{[\bar{S}]_i}{[\bar{S}]_{i-1}},$$

можно показать, что минимальный суммарный объем каскада  $V = \sum_{i=1}^n V_i$  достигается при постоянной величине  $\xi_i$ , т. е. степени превращения субстрата на каждой ступени каскада должны быть одинаковы:

$$\frac{[\bar{S}]_1}{[\bar{S}]_0} = \frac{[\bar{S}]_2}{[\bar{S}]_1} = \dots = \frac{[\bar{S}]_i}{[\bar{S}]_{i-1}} = \dots = \frac{[\bar{S}]_n}{[\bar{S}]_{n-1}}.$$

Очевидно, производительность каскада по биомассе достигает максимального значения при заданной концентрации биомассы на выходе  $[X]_n$ :

$$G_X = \frac{W_0 [X]_n}{\sum_{i=1}^n V_i} = D [X]_n = \max. \quad (8.79)$$

Расчет оптимальных степеней конверсии субстрата  $\xi_i^{\text{опт}}$ , объемов аппаратов каждой ступени  $V_i^{\text{опт}}$  и производительности каскада в целом может быть проведен аналитически, однако расчетные формулы очень сложны. Наиболее эффективна оптимизация с помощью ЭВМ. Напомним лишь, что в производственных условиях минимизация общего объема каскада часто не представляет столь большого интереса, как обеспечение полной утилизации субстрата, для чего в ряде случаев прибегают к превращению нескольких последних ступеней в дозреватель, обеспечивающий минимальное содержание непревращенного субстрата в среде и клетках.

Аналогично может быть проведена оптимизация производительности каскада, составленного из последовательно соединенных аппарата полного смешения объемом  $V_1$  и аппарата идеального вытеснения объемом  $V_2$ . Питательная среда имеет концентрацию субстрата  $[S]_0$  и поступает со скоростью  $W_0$  (рис. 8.7). Производительность каскада по биомассе равна в этом случае  $G_X = D[X]_2$ , причем общая скорость разбавления  $D = W_0 / (V_1 + V_2)$  связана со скоростями разбавления на первой

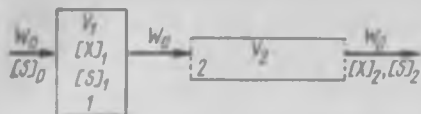


Рис. 8.7. Схема последовательного соединения хемостата и аппарата идеального вытеснения

$D_1 = W_0/V_1$  и второй  $D_2 = W_0/V_2$  ступенях очевидным соотношением

$$\frac{1}{D} = \frac{V_1 + V_2}{W_0} = \frac{1}{D_1} + \frac{1}{D_2}, \text{ т. е. } D = \frac{D_1 D_2}{D_1 + D_2}.$$

Максимум производительности по биомассе обеспечивается в этом случае при общей скорости разбавления

$$D_{\text{опт}} = \mu_{\text{max}} \left( 1 - \sqrt{\frac{YK_S/[X]_{\text{max}}}{1 + YK_S/[X]_{\text{max}}}} \right). \quad (8.80)$$

## § 8.6. Смешанные культуры и автоселекция при непрерывной ферментации

Одним из новых явлений, с которыми столкнулись исследователи в опытах по длительной непрерывной ферментации, было своеобразное проявление искусственного отбора, основанного на спонтанных мутациях используемых штаммов. Особенно ярко этот феномен проявляется при культивировании в условиях хемостата или каскада аппаратов, включающих хотя бы один биореактор полного смешения. Теоретическое обоснование и количественное описание различных случаев такого вида автоселекции дано в работах Н. С. Печуркина, основные выводы из которых необходимо учитывать при исследовании и эксплуатации промышленных ферментаторов полного смешения.

Рассмотрим хемостатное культивирование смешанной культуры, состоящей в простейшем случае из двух штаммов, условно обозначаемых индексами 1 и 2. В стационарном режиме при заданной скорости разбавления  $D$ , установленной экспериментатором, для каждого вида микроорганизмов должно установиться равенство типа (8.31), если полагать, что подача клеток в аппарат отсутствует, т. е.  $[X_1]_0 = 0$  и  $[X_2]_0 = 0$ :

$$\left. \begin{aligned} \mu_1 &= D; \\ \mu_2 &= D. \end{aligned} \right\} \quad (8.81)$$

Условие (8.81) достигается благодаря тому, что стационарная концентрация субстрата  $[S]$  в биореакторе меньше, чем входная концентрация  $[S]_0$ , причем  $[S]$  устанавливается на таком уровне, который обеспечивает совпадение левой части

уравнения (8.81) с заданной правой частью

$$\left. \begin{aligned} \mu_{\max,1} \frac{[\bar{S}]}{K_{s,1} + [\bar{S}]} &= D; \\ \mu_{\max,2} \frac{[\bar{S}]}{K_{s,2} + [\bar{S}]} &= D. \end{aligned} \right\} \quad (8.82)$$

На рис. 8.8 показана зависимость удельной скорости роста штаммов 1 и 2 от стационарной концентрации субстрата  $[\bar{S}]$ . В первом варианте (рис. 8.8, а) кривые  $\mu_i = \varphi_i([\bar{S}])$  не пересекаются. При этом несущественно, одинаковые или разные значения  $\mu_{\max,1}$  и  $\mu_{\max,2}$ , поскольку форма кривых определяется константами в знаменателе  $K_{s,1}$  и  $K_{s,2}$ . При некоторой величине  $D$ , заданной для данного режима и указанной на рисунке, культура 2 может обеспечить выполнение равенств (8.82) при стационарной концентрации  $[\bar{S}]_2$ , тогда как для штамма 1 достаточно меньшего значения стационарной величины  $[\bar{S}]_1$ , а  $\mu_1 > D$  при концентрации  $[\bar{S}]_2$ . Последнее неизбежно приведет к тому, что стационарная концентрация  $[\bar{S}]$  установится на уровне  $[\bar{S}]_1$ , однако в этом случае штамм 2 не в состоянии будет обеспечить условие (8.81), т. к. для него  $\mu_2 < D$ .

Ситуация, изображенная на рис. 8.8, а, в силу приведенных выше рассуждений приводит к тому, что штамм 1 растет и развивается нормально при заданном  $D$ , а штамм 2 вымывается из аппарата из-за неспособности размножаться с необходимой скоростью за слишком короткое для него время пребывания  $\tau = 1/D$ . Как видно из рис.

8.8, б, картина может быть более сложной, если  $\mu_{\max,1} \neq \mu_{\max,2}$  и  $K_{s,1} \neq K_{s,2}$ , причем кривые  $\mu_i = \varphi_i([\bar{S}])$  пересекаются в некоторой точке с абсциссой  $[\bar{S}]_n$ . Действительно, при  $[\bar{S}] > [\bar{S}]_n$  предпочтение будет иметь штамм 2, тогда как штамм 1 при той же концентрации субстрата, которая соответствует условию  $\mu_2 = D$ , подвергнется вымыванию в силу неравенства  $\mu_1 < D$ . При  $[\bar{S}] < [\bar{S}]_n$  должна наблюдаться обратная закономерность, поскольку в области  $[\bar{S}]_n$  штамм 1 может существовать в аппарате, обеспечивая  $\mu_1 = D$ , а штамм

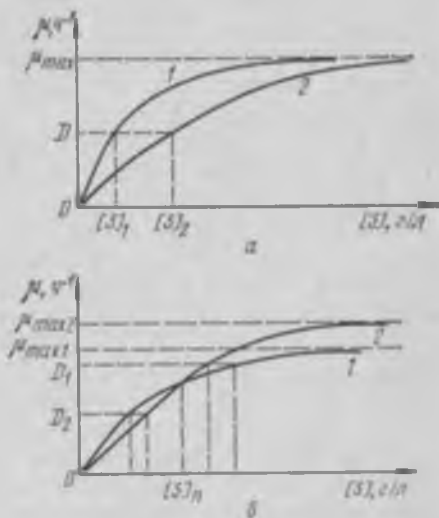


Рис. 8.8. Совместное культивирование двух культур в хемостате

2 вымывается, т. к.  $\mu_2 < D$ . Оба штамма могут расти совместно лишь при  $[S] = [S]_n$ .

Рассмотренное явление характерно только для хемостатного культивирования и совершенно не имеет аналогии в химической кинетике, где две независимые реакции протекают одновременно и неопределенно долго в аппарате любого типа. Конечно, и в микробиологических процессах возможно сосуществование в хемостате двух и более различных культур с разными параметрами уравнения Моно, однако это может происходить только тогда, когда различные штаммы влияют на рост друг друга путем выделения соответствующих метаболитов. Так, для случая, изображенного на рис. 8.8, а, оба штамма могут расти совместно, если метаболиты второй культуры тормозят рост первой или же продукты роста первой культуры стимулируют рост второй, так что удельные скорости их роста выравниваются и достигается общее условие  $\mu_1 = \mu_2 = D$ .

Специфика хемостатного культивирования микроорганизмов делает аппарат полного смешения своеобразным инструментом искусственного отбора, причем такой отбор часто не подчиняется желаниям экспериментатора. Известно, что в любой растущей культуре часть клеток постоянно подвергается мутациям под действием неконтролируемых факторов внешней среды. Будем считать положительными те мутации, которые обеспечивают более высокую скорость размножения  $\mu_+$  при той же концентрации субстрата, например за счет более эффективной утилизации. Отрицательными следует тогда считать мутации, в результате которых скорость роста культуры  $\mu_-$  при заданной концентрации субстрата снижается по сравнению с исходным штаммом. Очевидно, в ходе непрерывного культивирования любого штамма даже в абсолютно асептическом режиме протекающие мутации будут приводить к известной гетерогенности популяции вследствие появления более жизнеспособных и менее жизнеспособных клеток.

В условиях хемостата клетки, образовавшиеся в результате отрицательных мутаций, не смогут обеспечить равенство удельной скорости роста и скорости разбавления, т. к. при установившемся значении  $[S]$  они растут медленнее, чем основная культура. Это означает, что все особи, несущие отрицательную мутацию, будут вымываться из аппарата полностью. Напротив, клетки, образовавшиеся вследствие положительной мутации, не только способны расти при заданном значении  $[S]$ , но и существовать при еще более низких стационарных концентрациях субстрата, чем та, которая установилась в ходе культивирования исходного штамма. Это должно привести к постепенному накоплению клеток в биореакторе, т. к. для них  $\mu_+ > D$ , и, как следствие, снижению стационарной величины  $[S]$ .

Накопление положительных мутантов и вызванное этим снижение  $[\bar{S}]$  поставит основной (исходный) штамм в положение, когда он уже не способен обеспечить равенство  $\mu = D$ , т. е. приведет к вымыванию основной культуры и замене ее положительным мутантом. В последующем это явление должно повторяться, как показано на рис. 8.9, и приводить к отбору все более

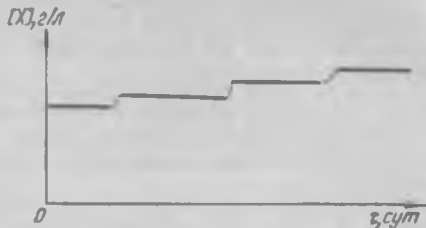


Рис. 8.9. Автоселекция при длительном хеостатном культивировании микроорганизмов

и более жизнеспособных — быстро растущих и эффективнее потребляющих субстрат штаммов, т. е. к автоселекции. В принципе появление более приспособленных к условиям роста мутантов и их размножение вплоть до вытеснения исходного штамма возможны при любом длительном процессе культивирования, особенно в непрерывных процессах ферментации.

На первый взгляд может показаться, что автоселекция в целом положительна, т. е. приводит к увеличению выхода биомассы и лучшему потреблению субстрата. На самом деле это не всегда так, потому что положительная мутация, приводящая к образованию быстрее растущих клеток, неоднозначно связана с другими потребительскими характеристиками штамма. Может, например, оказаться, что положительный мутант содержит меньше белка по сравнению с исходной культурой либо аминокислотный состав белка изменяется при мутации в нежелательную сторону и т. п. Наиболее существенно это обстоятельство при осуществлении непрерывных ферментаций, направленных на биосинтез метаболитов, т. к. нет никаких гарантий, что положительный, с точки зрения роста, мутант способен продуцировать больше ферментов, антибиотиков и т. п., которые рассматриваются технологом как целевые продукты.

Особо следует отметить важность учета явления автоселекции и вымывания менее приспособленных штаммов при культивировании смешанных популяций, когда положительные мутации в культуре-примеси могут отразиться на составе популяции в целом и привести к нежелательным и даже опасным изменениям в составе целевого продукта.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как рассчитать объем аппарата, который при степени заполнения 0,8 обеспечивает производительность 1 т биомассы в час при периодическом культивировании дрожжей на глюкозе, если константы уравнения Моно равны  $0,45 \text{ ч}^{-1}$  и  $14 \cdot 10^{-5}$  моль/л, экономический коэффициент 0,51, начальная кон-

центрация глюкозы 16 г/л, а непродуктивные затраты времени, включая лаг-фазу, составляют 4,5 ч на операцию? Остаточная концентрация сахара в среде не превышает 0,1 г/л.

2. При какой продолжительности культивирования в предыдущей задаче будет достигнута наивысшая продуктивность ферментатора? Какой конечной концентрации биомассы будет соответствовать оптимум производительности и какая остаточная концентрация глюкозы будет получаться в оптимальном режиме?

3. Тубулярная культура с параметрами, приведенными в первой задаче, растет в трубчатом аппарате диаметром 0,2 м при скорости подачи среды 1 м<sup>3</sup>/ч. Какой длины должен быть аппарат, чтобы конечная концентрация клеток составляла 7,5 г/л, если лаг-фаза завершается в среднем за 1,5 ч?

4. Для случая, описанного в первой задаче, какова будет критическая скорость разбавления при культивировании в отдельно работающем хемостате?

5. Применимо ли понятие критической скорости разбавления к каскаду из двух хемостатов и ко второму аппарату такого каскада, если первый работает при скорости разбавления меньше критической? Какую производительность будут в этом случае иметь каждый из хемостатов и каскад в целом?

6. Псевдомонады растут на метаноле с параметрами  $\mu_{\max}=0,55 \text{ ч}^{-1}$  и  $K_s=0,7 \text{ мг/л}$ , экономический коэффициент равен 0,42 при начальной концентрации метанола 1% масс. Какова будет максимальная производительность хемостата объемом 1 м<sup>3</sup> с коэффициентом заполнения 0,8? Насколько изменится производительность, если последовательно к первому присоединить второй хемостат того же размера? Концентрации метанола на входе в каждый из хемостатов принять равным 1% мас. Какое количество метанола придется добавлять в первый и во второй аппараты каскада?

7. Какие стационарные концентрации биомассы *Pseudomonas* и метанола будут устанавливаться на выходе из системы ферментации, если отдельный хемостат, работающий в условиях задачи 6, дополнить узлом сепарации, обеспечивающим кратность рециркуляции  $a$  и степень сепарации  $b$  в следующих пределах: 1)  $a=0,5$ ,  $b=0,5$ ; 2)  $a=0,5$ ,  $b=5$ ; 3)  $a=5$ ,  $b=0,5$ ; 4)  $a=5$ ,  $b=5$ ? Какова будет максимальная производительность установки в каждом из четырех случаев? Сравните ее с производительностью хемостата без рецикла (см. условия задачи 6).

8. Какова будет производительность аппарата по условиям задачи 1, если он работает в отъемно-доливном режиме? 60% жидкой фазы сливается при достижении концентрации биомассы 7,0 г/л и заменяется свежей питательной средой до установления исходной концентрации субстрата.

9. Кишечные палочки культивируются на глюкозе ( $[S]_0=10 \text{ г/л}$ ,  $\mu_{\max}=2,0 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K_s=2,2 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ ,  $Y=0,5$ ) в хемостате объемом 1 л с коэффициентом заполнения 0,75. Имеется возможность использовать второй такой же аппарат. Как лучше его присоединить — параллельно или последовательно к первому, если ставится цель получения максимального количества биомассы? Второй аппарат каскада можно подпитывать глюкозой до исходной ее концентрации 10 г/л.

10. Две культуры одновременно растут в хемостате при начальной концентрации субстрата 12 г/л. Параметры роста первой из них  $\mu'_{\max}=0,5 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K'_s=30 \text{ мг/л}$ , второй —  $\mu'_{\max}=0,4 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K'_s=50 \text{ мг/л}$ , экономический коэффициент в обоих случаях равен 0,6. Каков будет качественный и количественный состав культуральной жидкости с клетками, если образованием растворимых продуктов можно пренебречь ( $D$  принять равным 0,2, 0,35 и 0,45 ч<sup>-1</sup>)?

Протекание биотехнологических процессов во многих случаях определяется не только скоростью превращения субстрата в продукты или утилизацией субстрата клетками микроорганизмов, но и скоростью транспорта одного или нескольких компонентов субстрата к клетке или к молекуле фермента. Диффузионные факторы могут стать решающими при осуществлении процессов инженерной энзимологии, использующих иммобилизованные ферменты. Велика, хотя и менее изучена, их роль в процессах микробиологического синтеза и особенно при трансформации органических веществ, осуществляемой иммобилизованными клетками.

Исследование, описание и технологическое проектирование процессов, скорость которых зависит одновременно и от биохимических факторов — активности фермента, скорости метаболизма, и от скорости массопереноса, являются обычно крайне трудными задачами и их решение редко приводит к надежным количественным результатам. Именно этим обстоятельством объясняется особая трудность масштабирования биотехнологических процессов, что приводит к необходимости дополнительных исследований.

Основой современной стратегии кинетического исследования и описания процессов биотехнологии, осложненных массопереносом, является раздельное количественное изучение влияния кинетических и диффузионных факторов и поиск такого режима проведения процесса, когда влияние массопереноса невелико или даже пренебрежимо мало. Если это оказывается невозможным, требуется выполнить дополнительные исследования по созданию математической модели биореактора как единого целого, которая учитывала бы одновременно влияние и взаимодействие всех факторов.

Современная вычислительная техника позволяет в принципе получить адекватные модели биохимических процессов большой сложности. Однако рассмотрение данного вопроса выходит за рамки учебного пособия. Ниже обсуждаются особенности кинетического описания биотехнологических процессов, протекающих в условиях одновременного массопереноса одного или нескольких компонентов.

## § 9.1. Иммобилизация ферментов на твердых непористых носителях

Использование твердых непористых, например стеклянных, частиц для иммобилизации ферментов имеет ряд преимуществ перед другими способами, прежде всего в силу большой хими-

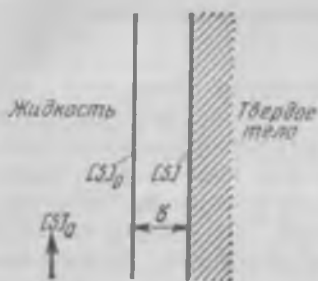


Рис. 9.1. Схема распределения концентраций субстрата в потоке жидкости на границе контакта с твердым телом

ческой и механической прочности носителя. Гетерогенизация фермента прикреплением его к частице твердой фазы приводит к гетерофазности системы в целом, поскольку в растворе содержится субстрат и продукты, появляется твердая фаза, на поверхности которой находится фермент. Формально можно считать, что при достаточно большой поверхностной концентрации фермента катализатором процесса является твердая фаза, а активной частью катализатора — его наружная поверхность.

Химическое превращение на наружной поверхности твердых частиц неизбежно создает необходимость транспорта исходных веществ из раствора к поверхности катализатора и отвода продуктов от места их образования в раствор.

Все процессы аналогичного типа проводятся, как правило, либо в проточных, либо в хорошо перемешиваемых периодических биореакторах. Принято считать, что в ядре потока (на достаточном удалении от частиц твердого тела) концентрации исходных веществ и продуктов постоянны по объему, т. е. градиенты концентрации равны нулю:  $d[S]/dV = d[P]/dV = 0$  (здесь  $V$  — объем жидкости в ядре потока).

Наиболее удачная модель обтекания твердых частиц жидкостью или газом предполагает существование вблизи твердой поверхности пленки подвижной фазы, которая не движется вместе с жидкостью, а как бы тормозится твердой поверхностью. В таких неподвижных пленках толщиной  $\delta$  (рис. 9.1) массоперенос возможен только в виде молекулярной диффузии, а сама пленка представляет собой единственное сопротивление массопередаче. Толщина пленки  $\delta$  определяется физическими свойствами подвижной и неподвижной фаз и гидродинамической обстановкой в аппарате. Эксперименты показывают, что эффективная толщина пленки жидкости у поверхности твердого тела тем меньше, чем выше скорость движения жидкой фазы относительно твердой. В известных пределах можно считать, что между толщиной пленки и приведенной (в см/с) скоростью жидкости существует обратная пропорциональная зависимость.

Концентрация исходного вещества  $S$  на границе пленки с ядром потока будет такой же, как и в потоке, т. е.  $[S]_0$ . Вследствие диффузионного сопротивления пленки концентрация субстрата на поверхности твердой фазы, где прикреплены молекулы фермента, должна быть меньше  $[S]_0$  и может быть обозна-

ча через  $[S]$ . В соответствии с моделью (на рис. 9.1) движущая сила массопереноса через пленку составляет  $([S]_0 - [S])$ , а скорость этого переноса

$$r_d = \beta_s ([S]_0 - [S]), \quad (9.1)$$

где  $r_d$  — скорость переноса субстрата через единичную поверхность пленки;  $\beta_s$  — коэффициент массопередачи, отнесенный к той же поверхности.

Вообще говоря, перенос субстрата к реакционной поверхности происходит в условиях встречной диффузии продуктов к наружной границе пленки и далее — в объем жидкой фазы, что следует учитывать при определении  $\beta_s$ . Практически в большинстве случаев встречным переносом продуктов можно пренебречь, поскольку он не лимитирует общей скорости превращения.

Для тонких пленок толщиной  $\delta$  первый закон Фика, описывающий установившуюся молекулярную диффузию, может быть записан в виде конечной разности

$$r_d = \frac{D_s}{\delta} ([S]_0 - [S]), \quad (9.2)$$

причем  $\beta_s = D_s/\delta$ , где  $D_s$  — коэффициент диффузии субстрата  $S$  в пленке. Из зависимости (9.2) видно, почему факторы, влияющие на  $\delta$ , будут изменять коэффициент массопередачи и, как следствие, скорость транспорта субстрата через пленку.

В соответствии с уравнением Михаэлиса — Ментен скорость химического превращения субстрата на поверхности твердых частиц, несущих иммобилизованный фермент, зависит от  $[S]$ . При этом скорость превращения на единичной поверхности (см. гл. 6)

$$r_x = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_M + [S]}. \quad (9.3)$$

При малых  $[S]_0$ , а следовательно, еще меньших значениях  $[S]$  уравнение (9.3) приводится к линейному виду

$$r_x = \frac{k_2 [E]_0}{K_M} [S] = k [S]. \quad (9.4)$$

Этот частный случай общего уравнения (9.3) позволяет получить качественные зависимости, сохраняющие смысл для кинетических уравнений любого вида, поэтому далее мы ограничимся рассмотрением линейного кинетического уравнения (9.4).

Пренебрегая влиянием массопереноса продуктов через пленку, можно утверждать, что при одновременном протекании двух последовательных стадий процесса — переноса субстрата

через пленку и его химического превращения на поверхности катализатора — должно установиться устойчивое во времени стационарное состояние, при котором скорости обеих стадий равны между собой:

$$r_d = r_x. \quad (9.5)$$

Устойчивость такого стационарного состояния объясняется тем, что случайное возрастание или уменьшение одной из частей равенства (9.5) приводит к изменению  $[S]$ , что вызывает противоположное действие, направленное на восстановление исходного соотношения. Это будет наблюдаться до тех пор, пока останутся постоянными концентрация субстрата в потоке  $[S]_0$  и константы  $\beta_s$  и  $k$ :

$$\beta_s([S]_0 - [S]) = k[S]. \quad (9.6)$$

Из уравнения (9.6) можно выразить неизвестную величину концентрации  $[S]$ :

$$[S] = \frac{\beta_s}{k + \beta_s} [S]_0$$

и, подставив ее в (9.6), найти стационарную скорость общего процесса

$$r = r_x = r_d = \frac{k\beta_s}{k + \beta_s} [S]_0 = k_{эф} [S]_0. \quad (9.7)$$

Эффективная константа скорости в уравнении (8.7) однозначно связана с коэффициентом массопередачи субстрата и каталитическими свойствами фермента  $k = r_{max}/K_m$ , причем

$$1/k_{эф} = 1/k + 1/\beta_s. \quad (9.8)$$

Обратные величины константы скорости  $k$  и коэффициента массопередачи  $\beta_s$  принято называть сопротивлениями. Таким образом, уравнение (9.8) указывает на то, что общее сопротивление массопереносу и химическому превращению как единому процессу складывается из сопротивлений отдельных его стадий. Особый интерес представляют частные случаи уравнения (9.8), которые могут быть получены при очень большой разнице в величинах  $k$  и  $\beta_s$ .

Один из возможных случаев, когда  $k \gg \beta_s$ , приводит уравнение (9.8) к более простому виду, поскольку  $1/k \ll 1/\beta_s$ , и сумма упрощается

$$\begin{aligned} 1/k_{эф} &\approx 1/\beta_s; \\ k_{эф} &\approx \beta_s. \end{aligned} \quad (9.9)$$

Равенство (9.9) с учетом выражения (9.7) показывает, что для очень активных ферментов возможно положение, когда об-

шая скорость процесса определяется скоростью массопереноса

$$r = k_{\text{эф}} [S]_0 \cong \beta_S [S]_0 \quad (9.10)$$

Это означает, в частности, что концентрация субстрата на поверхности носителя, где находится фермент, близка к нулю:  $[S] \cong 0$ . Превращение субстрата в продукт лимитируется поступлением субстрата к реакционной поверхности, где он реагирует практически мгновенно. Заметим, что большая величина  $k$  может быть достигнута как использованием очень активного фермента, так и достижением его высокой поверхностной концентрации  $[E]_0$ .

Режим, приводящий к равенству (9.9) называют диффузионным, поскольку процесс контролируется массопереносом, т. е. диффузией через пленку. В этом режиме катализатор используется наименее эффективно, ибо концентрация субстрата у поверхности минимальна (рис. 9.2).

Второй крайний случай зависимости (9.8) наблюдается тогда, когда константа  $k$  оказывается гораздо меньше коэффициента массопередачи  $k \ll \beta_S$ . Очевидно, при этом  $1/k \gg 1/\beta_S$  и

$$1/k_{\text{эф}} \approx 1/k$$

или

$$k_{\text{эф}} \approx k. \quad (9.11)$$

Общая скорость процесса становится в данных условиях равной

$$r = k_{\text{эф}} [S]_0 \cong k [S]_0, \quad (9.12)$$

т. е. процесс полностью контролируется скоростью химического превращения субстрата (рис. 9.2). Такой режим называется «кинетическим» и реализуется при условии, что концентрация  $[S]$  у поверхности катализатора почти не отличается от концентрации в потоке  $[S]_0$ . Это связано с тем, что даже небольшая движущая сила ( $[S]_0 - [S]$ ) способна обеспечить необходимую скорость массопереноса из-за большой величины коэффициента массопередачи. Очевидно, именно кинетический режим протекания наиболее эффективен при проведении реакции с иммобилизованными ферментами, т. к. именно в этом случае полностью реализуются возможности фермента.

Между крайними случаями  $k \gg \beta_S$  и  $k \ll \beta_S$  находится достаточно широкая область значений  $k$  и  $\beta_S$ , в которой их величины сравнимы. Это значит, что в сумме выражения (9.8) нельзя пренебречь ни одним из членов (в правой части уравнения). Такой режим называется переходным, для него характерна одновременная зависимость скорости процесса и от диффузионных, и от кинетических факторов. Исследования в этом режиме и его количественное описание представляют наибольшую труд-

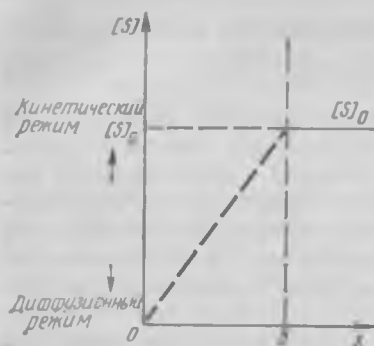


Рис. 9.2. Распределение концентраций в пленке и на твердой поверхности в кинетическом и диффузионном режимах

зионных ограничений на общую скорость ферментативного процесса и, если такие ограничения имеются, 2) добиться протекания реакции в кинетическом режиме, что обеспечит максимальную эффективность использования иммобилизационного фермента.

Для ответа на первый вопрос наиболее удобным фактором, влияющим только на диффузионный перенос и не влияющим на химическое превращение, оказывается скорость протекания жидкости (газа) относительно твердых частиц носителя с нанесенным ферментом. Использование некоторыми авторами температуры как параметра, относительно слабо влияющего на диффузию и значительно сильнее — на химическое превращение, неудобно и малоэффективно. Необходимую в этом случае усредненную величину энергии активации нужно сравнивать с истинной энергией активации, которая зачастую просто неизвестна. В то же время факт зависимости общей скорости процесса от скорости жидкой фазы в аппарате колонного типа (при сохранении длительности контакта неизменным) или влияния частоты вращения мешалки в аппаратах смешения однозначно указывает на протекание реакции в переходном или диффузионном режиме и, как следствие, на необходимость интенсификации массопереноса.

Перевод процесса в кинетический режим может быть достигнут, прежде всего, увеличением скорости обтекания частиц катализатора жидкостью. При этом уменьшается толщина диффузионного слоя  $\delta$  и пропорционально этому возрастает коэффициент массопередачи. Понятно, что этот фактор не может действовать беспредельно, и для каждого аппарата существует

ность. Именно в этих условиях приходится прибегать к созданию достаточно сложной математической модели, учитывающей все факторы. С качественных позиций характерно, что в переходном режиме потенциальные возможности катализатора используются не полностью, т.к. концентрация субстрата в зоне действия фермента всегда несколько ниже той величины  $[S]_0$ , которая создается в ядре потока.

Приведенные выше соображения ставят перед исследователями две взаимосвязанные задачи: 1) выявить влияние диффу-

некоторая предельная величина  $\beta_s$ , которая может быть достигнута при экономически оправданной интенсификации гидродинамической обстановки. Если оказывается, что и в интенсивном режиме массопереноса достичь кинетического режима не удается, следует подумать о снижении удельной активности иммобилизованного фермента, т. е. о снижении количества белка, наносимого на единицу поверхности. Это позволит использовать нанесенный фермент более эффективно.

Необходимо отметить также общую стратегию исследований по нахождению кинетического режима процессов, осложненных массопереносом. Поскольку основное условие  $k \ll \beta_s$  должно оставаться справедливым при всех возможных колебаниях параметров или во всей запланированной серии экспериментов, проверку выполнения условия следует, очевидно, проводить в опытах тогда, когда константа скорости  $k$  имеет наибольшую из возможных, а  $\beta_s$  — наименьшую величину. Во всех остальных опытах, где  $k$  будет меньше, чем в базовом, а  $\beta_s$  — больше или, во всяком случае, не меньше, режим останется заведомо кинетическим. Для всей серии экспериментов влияние диффузионных факторов будет незначительным, если это было проверено в базовом опыте в наиболее неблагоприятных условиях.

## **§ 9.2. Иммобилизация ферментов на пористых носителях.**

### **Иммобилизация клеток**

Как уже говорилось, активность иммобилизованных ферментов определяется количеством белка, нанесенного на единицу массы носителя. Если последний представляет собой непористый материал, то фермент прикрепляется к отдельным специально подготовленным участкам его внешней поверхности. Использование пористых носителей, диаметр пор которых достаточен для проникновения молекул фермента и субстрата, имеет серьезные преимущества перед применением непористых твердых тел. Это вызвано тем, что общая поверхность единицы массы пористого тела может в десятки раз превосходить поверхность такого же количества непористого вещества. С этих позиций иммобилизация ферментов не только на наружной поверхности, но и в порах носителя позволяет поднять удельную (по массе) активность катализатора, но создает ряд дополнительных трудностей. Близкие к этим проблемы создаются и при иммобилизации ферментов и клеток в различных гелях, которые также могут рассматриваться как своеобразные пористые структуры.

Как показывает опыт эксплуатации промышленных установок с твердыми катализаторами пористой структуры, основные трудности при создании и работе этих производств заключаются в появлении дополнительных диффузионных осложнений вслед-

стве массопереноса внутри пор, а также в затрудненном теплоотводе или теплоподводе вследствие малой теплопроводности носителя. Последнее обстоятельство редко бывает существенным при ферментативных реакциях, идущих, как правило, с малыми тепловыми эффектами в водных средах высокой теплоемкости. Однако диффузионный перенос внутри пор может, напротив, оказаться причиной, затрудняющей использование катализатора, особенно в вязких средах при невысоких температурах. Ниже приводятся основные положения по исследованию и подбору рабочих режимов для процессов в присутствии ферментов, закрепленных на носителях пористой структуры.

Для катализаторов с активной поверхностью, к которым относятся и иммобилизованные ферменты, обычно рассматривают четыре режима протекания процесса, впервые сформулированные Д. А. Франк-Каменецким: внешний диффузионный, внешний кинетический, внутренний диффузионный и внутренний кинетический. Переход от одного к другому связан с изменением соотношения сопротивлений массопереносу и химической реакции.

Первые два режима не отличаются от рассмотренных в предыдущем разделе. Появление двух последних связано с тем, что у пористых тел с развитой поверхностью доля внешней (наружной) поверхности не превышает обычно 5—10% общей удельной поверхности. Это означает, что иммобилизация фермента на пористом носителе приводит к сосредоточению активности главным образом в порах. Рост концентрации субстрата на наружной поверхности приведет к диффузии в поры и превращению на поверхности пор, т. е. к заметному увеличению производительности катализатора. Четкой границы между внешним кинетическим и внутренним диффузионным режимом быть не может. Однако лимитирование процесса на внутренней поверхности пор диффузией субстрата в поры вполне возможно и неоднократно наблюдалось в случаях с гетерогенными катализаторами.

Преодоление диффузионных сопротивлений в порах, т. е. переход во внутренний кинетический режим, осложняется тем, что практически отсутствуют какие-либо методы интенсификации этого процесса. Обычно различают три вида течения (массопереноса) в порах:

кнудсеновское, характерное для узких пор с диаметром, меньшим длины свободного пробега молекул;

объемное, не отличающееся от общеизвестной молекулярной диффузии, если длина свободного пробега молекул меньше диаметра пор;

вынужденное, происходящее, например, под действием теплового расширения жидкости (газа) вследствие тепловыделения

при протекании реакции на поверхности носителя, имеющего обычно малую теплопроизводительность, т. е. из-за местных перегревов внутри зерна катализатора.

Для жидких фаз наибольшую роль играет обычная молекулярная диффузия (объемное течение), однако вкладом других видов массопереноса не всегда можно пренебречь. Все три вида переноса внутри пор описываются уравнениями типа первого закона Фика:

$$\frac{1}{F} \frac{dn_S}{d\tau} = -D \frac{d[S]}{dx}, \quad (9.13)$$

где  $F$  — поверхность, нормально к которой происходит диффузия, идущая вдоль оси  $X$ ;  $n_S$  — число молей субстрата;  $D$  — коэффициент диффузии.

Последняя величина определяется физическими свойствами субстрата и среды, а также типом переноса: для кнудсеновского течения  $D$  пропорционален диаметру поры, для объемного — длине свободного пробега молекул, для вынужденного — перепаду давлений внутри поры. Все это вынуждает в расчетах использовать некоторую эффективную величину коэффициента диффузии, которая учитывает совместный вклад всех видов переноса и зависит не только от природы субстрата и среды (плотность, вязкость и т. п.), но и носителя (диаметр пор) и даже теплового эффекта реакции, а также встречной диффузии продуктов.

При устранении внешних диффузионных ограничений и выходе во внешний кинетический режим протекания процесса концентрация субстрата на наружной поверхности, а значит, и в устье пор становится равной концентрации в потоке  $[S]_0$ . В качестве простейшего примера рассмотрим цилиндрическую пору радиусом  $R$ , длиной  $2L$ , пронизывающую частицу катализатора насквозь, так что концентрация субстрата в обоих устьях одинакова (рис. 9.3). Диффузионный поток субстрата внутри одинаков по модулю на равных расстояниях от обоих устьев, поэтому можно рассматривать любую, например, левую половину поры. Характерно, что концентрация субстрата  $[S]$  будет падать внутри поры при движении от устья к середине и далее вновь возрастать до исходного значения  $[S]_0$  вследствие симметричности процесса в поре. В середине поры на расстоянии  $x=L$

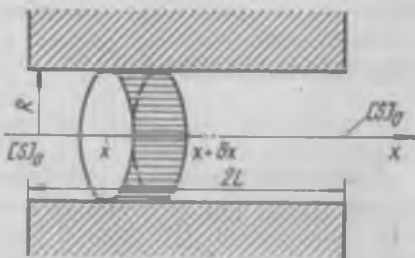


Рис. 9.3. Схема простой цилиндрической поры с ферментом, нанесенным на внутреннюю поверхность

от устья производная  $d[S]/dx=0$ , как это справедливо для точки минимума.

Рассмотрим баланс переноса вещества  $S$  внутри поры через два ее сечения, расположенные на расстояниях  $x$  и  $x+\delta x$  от устья. Диффузионный поток через левое сечение площадью  $\pi R^2$  равен

$$-D \left( \frac{d[S]}{dx} \right)_x \pi R^2,$$

через правое равен

$$-D \left( \frac{d[S]}{dx} \right)_{x+\delta x} \pi R^2.$$

Для двух близко расположенных сечений производную в точке  $x+\delta x$  можно выразить через производную в точке  $x$ :

$$\left( \frac{d[S]}{dx} \right)_{x+\delta x} \cong \left( \frac{d[S]}{dx} \right)_x + \frac{d^2[S]}{dx^2} \delta x.$$

Тогда разность между приходом и расходом субстрата через два основания выделенного на рис. 9.3 цилиндра высотой  $\delta x$  составит  $-D \frac{d^2[S]}{dx^2} \pi R^2 \delta x$ . Несовпадение потоков через левое и правое основания цилиндра объясняется химическим превращением субстрата на поверхности поры, где иммобилизован фермент.

Скорость такого превращения определяется боковой поверхностью цилиндра, количеством нанесенного фермента и концентрацией субстрата:

$$\frac{d[S]}{dt} = -2\pi R \delta x \frac{r_{\max}[S]}{K_M + S}.$$

В установившемся режиме работы катализатора разность диффузионных потоков через основания цилиндра равна скорости химической реакции

$$-D \frac{d^2[S]}{dx^2} \pi R^2 \delta x = -2\pi R \delta x \frac{r_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (9.14)$$

или после сокращений

$$\frac{d^2[S]}{dx^2} = \frac{2}{RD} \frac{r_{\max}[S]}{K_M + [S]}. \quad (9.15)$$

Дифференциальное уравнение второго порядка (9.15) должно решаться при указанных выше граничных условиях:  $[S] = [S]_0$  при  $x=0$  и  $d[S]/dx=0$  при  $x=L$ , причем в рассматриваемом случае константа  $r_{\max} = k_2[E]_0$  включает не только активность фермента  $k_2$ , но и его поверхностную концентрацию  $[E]_0$ , отнесенную к единице внутренней поверхности поры. Общее

решение уравнения (9.15) невозможно, однако оно разрешимо для частных случаев, когда правая часть линейна относительно  $[S]$ , в частности при малых концентрациях субстрата  $[S]_0 \ll K_M$ :

$$\frac{d^2[S]}{dx^2} = -\frac{2r_{\max}}{RDK_M} [S]. \quad (9.16)$$

Решение уравнения (9.16) при заданных условиях имеет вид

$$\frac{[S]}{[S]_0} = \frac{\operatorname{ch} \left[ L \sqrt{\frac{2r_{\max}}{RDK_M}} - x \sqrt{\frac{2r_{\max}}{RDK_M}} \right]}{\operatorname{ch} \left[ L \sqrt{\frac{2r_{\max}}{RDK_M}} \right]}, \quad (9.17)$$

причем правая часть решения включает гиперболический косинус, равный сумме двух экспонент<sup>1</sup>. Уравнение (9.17) описывает закономерность падения концентрации субстрата внутри поры. В центре ее при  $x=L$  концентрация будет тем ближе к наружной  $[S]_0$ , чем меньше выражение в квадратных скобках в знаменателе уравнения (9.17):

$$[S]_{x=L} = [S]_0 \frac{1}{\operatorname{ch} \left[ L \sqrt{\frac{2r_{\max}}{RDK_M}} \right]}. \quad (9.18)$$

Аргумент гиперболического косинуса в уравнении (9.18) обычно называют модулем Тиле (в гетерогенном катализе):

$$h = L \sqrt{\frac{2r_{\max}}{RDK_M}}. \quad (9.19)$$

Для ферментативной кинетики эта величина включает в себя комплекс, характеризующий свойства фермента ( $r_{\max} = k_2[E]_0$ ,  $K_M$ ), носителя (размер частиц  $2L$ , радиус пор  $R$ ) и среды (коэффициент диффузии  $D$ ).

Величина модуля Тиле определяет профиль падения концентрации субстрата в поре (рис. 9.4): при увеличении  $h$  концентрация все быстрее падает при перемещении внутрь поры, так что при достаточно больших модулях часть поры вблизи ее середины перестает использоваться, т. к. весь субстрат превращается вблизи устья.

Очевидно, что крутой профиль концентрации субстрата в поре соответствует внутреннему диффузионному режиму процес-

<sup>1</sup> Напомним, что гиперболические функции определяются равенствами: синус  $sh(ax) = \frac{1}{2}(e^{ax} - e^{-ax})$ , косинус  $ch(ax) = \frac{1}{2}(e^{ax} + e^{-ax})$ , тангенс  $th$  равен отношению синуса к косинусу, производная по  $x$  от синуса равна косинусу и наоборот. При  $ax \rightarrow 0$   $ch(ax) \rightarrow 1$ , тогда как при  $ax > 0$   $ch(ax) > 1$ .

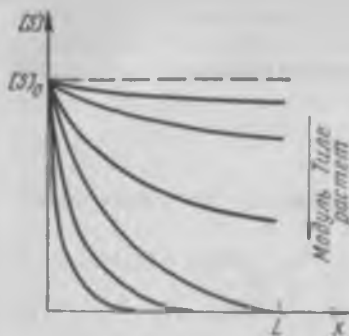


Рис. 9.4. Распределение субстрата в порах при различных значениях модуля Тиле

фундирующий в этом сечении субстрат превращается в половине поры, во второй половине поры картина симметрична.

$$r_{1/2} = -\pi R^2 D \left( \frac{d[S]}{dx} \right)_{x=0} = \frac{\pi R^2 D [S]_0}{L} h \operatorname{th}(h). \quad (9.20)$$

При выводе (9.20) использовано значение производной от  $[S]$  по  $x$  при  $x=0$ , полученное дифференцированием функции (9.17). Максимальная производительность полупоры достигается, если на всем ее протяжении от  $x=0$  до  $x=L$  концентрация субстрата равна  $[S]_0$  (кинетический режим):

$$r_k = 2\pi R L \frac{r_{\max}}{K_M} [S]_0. \quad (9.21)$$

Отношение (9.20) к (9.21) показывает, насколько эффективно используется внутренняя поверхность катализатора, эта величина — фактор эффективности  $f$  — определяется только модулем Тиле:

$$f = \frac{r_{1/2}}{r_k} = \frac{\pi R^2 D [S]_0 K_M}{2\pi R L^2 r_{\max} [S]_0} h \operatorname{th}(h) = \frac{1}{h} \operatorname{th}(h). \quad (9.22)$$

Зависимость эффективности использования иммобилизованного внутри поры фермента от значения модуля  $h$  приведена на рис. 9.5, из которого наглядно видно, что возрастание величины  $h$  приводит к ухудшению фактора  $f$ , т. е. к возрастанию доли фермента, не используемого из-за отсутствия субстрата в глубине поры (ср. рис. 9.4). Фактор  $f$  может быть использован и для расчета скорости реакции на внутренней поверхности пор

$$r = f 2\pi R^2 L \frac{r_{\max}}{K_M} [S]_0 N, \quad (9.23)$$

где  $N$  — среднее количество пор в единице массы носителя.

Хотя уравнение (9.15) решено нами при условии  $[S]_0 \ll K_M$ , полученный результат позволяет сделать качественные выводы, справедливые, как это показано ниже, и для общего случая. Кинетический режим протекания реакции, а следовательно, и наибольшая производительность биореактора и наивысшая экономическая эффективность использования фермента достигаются при достаточно малых значениях модуля Тиле, обеспечение которых является задачей исследователя и проектировщика. Формула (9.19) указывает, что при установившейся диффузии и кинетических параметрах фермента  $k_2$  и  $K_M$  выбор носителя должен учитывать средний диаметр пор  $R$  и размер частиц  $2L$ , а также количество фермента, нанесенного на единицу поверхности носителя  $[E]_0$ .

Уменьшению модуля  $h$  способствуют: подбор носителя с возможно более крупными порами и малым размером частиц, а также нанесение на его поверхность не слишком большого количества активного белка. Понятно, конечно, что крупнопористые носители имеют меньшую удельную поверхность, мелкие носители создают повышенное гидравлическое сопротивление в аппаратах, особенно колонного типа, а малая поверхностная концентрация фермента заставляет использовать большее количество катализатора (по массе носителя), что укрупняет аппаратуру и невыгодно технологически. Таким образом, в каждом конкретном случае речь идет о подборе оптимальной величины модуля  $h$ , причем для более активных ферментов с высокой поверхностной концентрацией надо подбирать мелкие крупнопористые носители и наоборот.

Определение модуля  $h$  в виде уравнения (9.19) указывает и наиболее удобный путь выявления влияния диффузии в порах, т. е. оценки режима протекания реакции; таким путем является проведение параллельных экспериментов с единственным изменяющимся параметром — размером частиц. Действительно, если при прочих равных условиях опыты с различной величиной  $2L$  дают одинаковые результаты по превращению субстрата, то можно утверждать, что процесс протекает в кинетическом режиме. Если измельчение катализатора — уменьшение  $L$  — приводит к росту его производительности, это может служить надежным доказательством влияния диффузионных факторов, т. к. при уменьшении модуля  $h$  (путем уменьшения  $L$ ) произ-

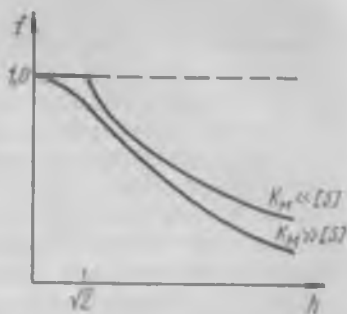


Рис. 9.5. Изменение фактора эффективности  $f$  в зависимости от модуля Тиле

водительность возрастает за счет увеличения эффективности использования внутренней поверхности поры  $f$ .

Следствием этих рассуждений служит рекомендация продолжать дробление носителя, если это возможно, до достижения его размера, обеспечивающего кинетический режим процесса. Если это невозможно из технологических соображений и подбор более крупнопористого носителя тоже не удастся провести, следует подумать о целесообразности замены пористого носителя непористым, который позволил бы полностью использовать каталитические свойства фермента.

Попутно заметим, что уравнение (9.18) и рис. 9.4 позволяют определить необходимую толщину пористой мембраны, которая способна полностью изолировать одну часть раствора от субстрата, находящегося в другой его части. В этом случае следует создать такой размер  $L$  и концентрацию иммобилизованного в порах фермента  $[E]_0$ , чтобы концентрация  $[S]$  достигала заданного малого значения в интервале  $0 \leq x \leq L$ .

В некоторых случаях интерес может представить проведение реакции в области нулевого порядка по субстрату, т. е. при скорости, близкой к  $r_{\max}$ . В таком варианте уравнения (9.15)

$$\frac{d^2[S]}{dx^2} = \frac{2r_{\max}}{RD} \quad (9.24)$$

решение имеет вид

$$\frac{[S]}{[S]_0} = 1 - h_0^2 \left[ \frac{x}{L} - \frac{1}{2} \left( \frac{x}{L} \right)^2 \right] \quad (9.25)$$

причем модуль  $h_0$  равен

$$h_0 = L \sqrt{\frac{2r_{\max}}{RD[S]_0}} \quad (9.26)$$

Для зависимости (9.25) физический смысл — неотрицательность левой части — сохраняется при условии  $h_0 \leq \sqrt{2}$ , в этом случае нулевой порядок по субстрату сохраняется по всей длине поры и процесс протекает в кинетическом режиме со скоростью, близкой к максимальной. При  $h_0 > \sqrt{2}$  скорость реакции в полупоре падает, т. к. субстрат достигает лишь некоторого сечения поры при  $x < L$ , а эффективность использования фермента на поверхности поры (рис. 9.5) снижается с ростом модуля  $h_0$  по гиперболической зависимости  $f = \sqrt{2}/h_0$ .

Несмотря на отсутствие решения у общего уравнения (9.15), его оказалось возможным решить численным интегрированием и получить таким образом графические зависимости в координатах

натах  $[S] = f(x)$ . Для этого удобно привести уравнение (9.15) к безразмерному виду

$$\frac{d^2 u}{d\xi^2} = \frac{K_1 u}{K_2 + u} \quad (9.27)$$

подстановкой переменных  $u = [S]/[S]_0$  и  $\xi = x/L$ , причем граничные условия приобретают форму  $u(0) = 1$ ,  $u'(1) = 0$ , а константы находятся по формулам  $K_1 = \frac{2L^2 r_{\max}}{K_0 [S]_0}$  и  $K_2 = K_M/[S]_0$ .

Преобразование уравнения второго порядка (9.27) к системе двух уравнений первого порядка подстановкой  $y_1 = u$ ,  $y_2 = u'$  дает два линейных дифференциальных уравнения

$$\frac{dy^{(n+1)}}{d\xi} = \Phi(y^{(n)}) = J(y^{(n)})(y^{(n+1)} - y^{(n)}), \quad (9.28)$$

где  $n=0, 1, 2, \dots$  — номер вектора приближения при расчете, т. е.  $y^{(n)} = (y_1^{(n)}; y_2^{(n)})$  —  $n$ -е приближение к решению задачи.

Компоненты вектора  $\Phi$  равны  $\Phi_1 = y_2$ ,  $\Phi_2 = K_1 y_1 / (K_2 + y_1)$ , а матрица Якоби

$$J(y^{(n+1)}) = \left( \frac{\partial \Phi_i}{\partial y_j} \right)_{y=y^{(n+1)}}$$

причем  $i, j = 1, 2$ .

Система уравнений (9.28) решалась численно методом Рунге — Кутты в диапазоне  $\xi$  от 0,0 до 1,0 до сходимости в каждой из 20 точек, выбранных в указанном интервале ( $\epsilon < 10^{-6}$ ). Результаты представлены графически на рис. 9.6—9.8, которые позволяют оценить влияние диффузионных и кинетических факторов на скорость процесса. Рис. 9.6 показывает, что принципиально вид зависимости  $u = [S]/[S]_0$  от  $\xi = x/L$  не отличается от представленной ранее для частного случая  $[S]_0 \ll K_M$  (рис. 8.4): при больших значениях константы  $k_1$  концентрация субстрата в поре падает резко и может достигнуть нулевого значения на участке  $0 \leq x \leq L$  (т. е.  $\xi \leq 1$ ). Увеличение константы  $k_2$  несколько сглаживает это негативное явление: на рис. 9.6 (а—г) видно, что при одинаковых  $k_1$  кривая  $u = f(\xi)$  идет более полого при больших значениях  $k_2$ . Наиболее наглядно это демонстрируется на рисунке 9.7, где дана зависимость  $u$  от  $\xi$  при различных  $k_2$  и одинаковом  $k_1$ .

Характерная зависимость текущей концентрации субстрата  $[S]$  от  $x$  получается при различных величинах соотношения  $k_1/k_2$ . Большая величина этого отношения приводит к значительному влиянию константы  $k_1$  (рис. 9.8, а), тогда как сравнимые величины  $k_1$  и  $k_2$  приводят к относительно слабому влиянию каждой из констант в отдельности; снижение концентрации определяется в этом случае отношением констант (рис. 9.8, б):

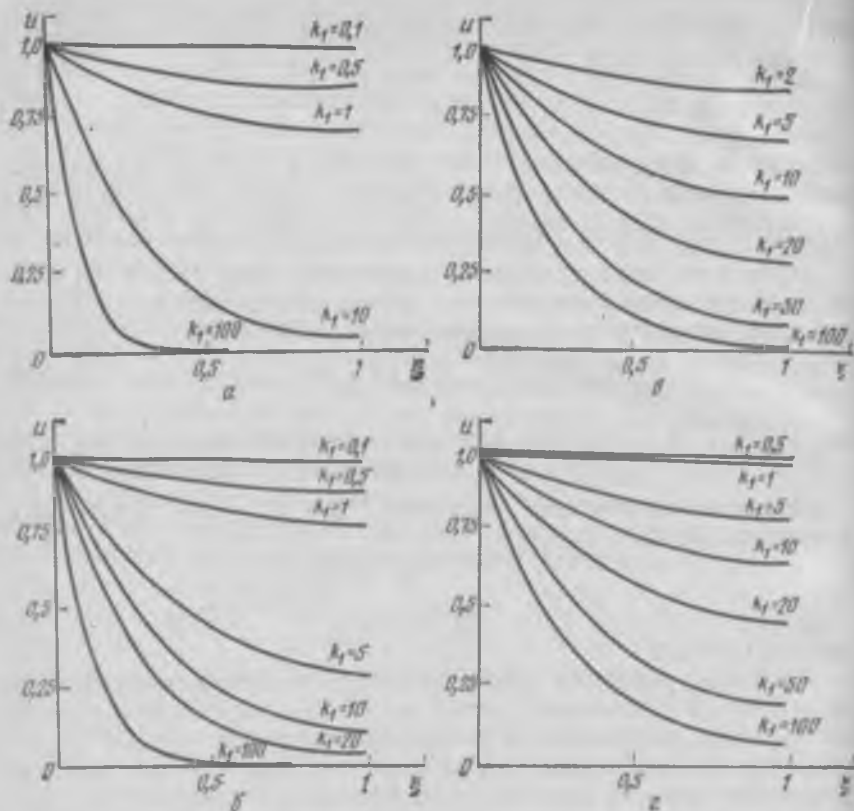


Рис. 9.6. Профиль концентрации субстрата внутри поры в зависимости от величины  $k_1$  при фиксированных значениях  $k_2$ :

а —  $k_2=0.5$ ; б —  $k_2=1.0$ ; в —  $k_2=5.0$ ; г —  $k_2=10.0$

чем оно меньше, тем слабее влияние диффузионных факторов.

Данное выше определение констант уравнения (9.27) показывает, что обе они обратно пропорциональны  $[S]_0$ , т. е. их отношение не зависит от концентрации субстрата в потоке. Как видно из рис. 9.6—9.8, кинетическому режиму протекания реакции в порах носителя с иммобилизованным ферментом способствует увеличение  $k_2$  и снижение  $k_1$ . Влияние константы  $k_1$  особенно велико: при соотношении  $k_1/k_2=100$  концентрация субстрата снижается до нуля при  $\xi=0.5\div 0.7$ , если соотношение  $k_1/k_2$  составляет  $10^7/10^5$  или  $10/0.1$ , а при соотношении  $1:0.01$   $[S]$  достигает половины  $[S]_0$  в середине поры при  $x=L$  (рис. 9.8, а). Это указывает на то, что пологий профиль концентрации субстрата внутри поры может быть достигнут, в частности,

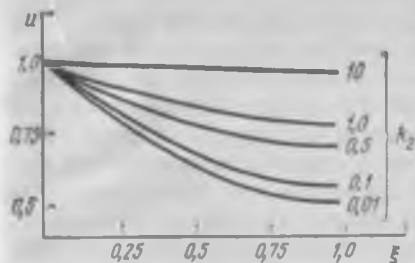


Рис. 9.7. Профиль концентраций субстрата внутри поры при фиксированном значении  $k_1=1,0$  и различных значениях  $k_2$

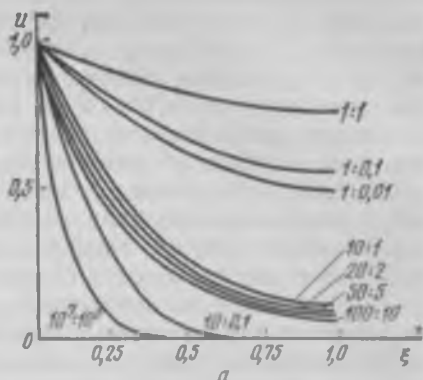
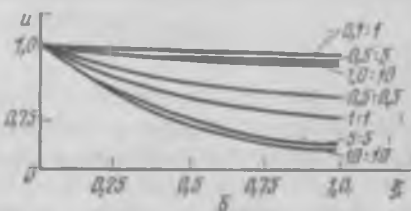


Рис. 9.8. Профиль концентраций субстрата внутри поры при различных значениях соотношения  $k_1/k_2$

$a - k_1 > k_2$ ;  $b - k_1 < k_2$



и увеличением концентрации  $[S]_0$  в потоке. Наиболее сильными факторами остаются, как и раньше, размер частиц  $2L$  и радиус пор  $R$ , которые входят только в константу

$$K_1 = \frac{2L^2 r_{\max}}{RD[S]_0}$$

Общий вывод из рассмотрения решения уравнения (9.27) заключается в том, что, несмотря на более сложный характер зависимости  $[S]$  от  $x$  внутри поры, основные качественные рекомендации не отличаются от сделанных ранее при рассмотрении частной задачи ( $[S]_0 \ll K_m$ ). Чем активнее фермент и чем выше его концентрация на носителе, т. е. чем выше  $r_{\max}$ , тем большее внимание следует уделять подбору носителя для иммобилизации, в первую очередь размеру его частиц и среднему диаметру пор. Критерием правильного выбора носителя, т. е. эффективного использования нанесенного фермента, является независимость производительности аппарата (с фиксированными параметрами работы) от размера частиц носителя, что возможно только при кинетическом режиме протекания процесса.

В заключение рассмотрим влияние диффузии на скорость реакции трансформации органических веществ под действием иммобилизованных клеток микроорганизмов. Хотя в этих случаях обычно используют включение клеток в полиакриламид-

ный или другой гель, как твердую основу, которую далее дробят на отдельные зерна, в первом приближении можно считать, что модель простой цилиндрической поры пригодна для грубого описания процесса (рис. 9.3). Единственным принципиальным отличием можно считать то, что клетки не прикреплены к стенкам пор, а свободно перемещаются в пределах некоторого малого объема внутри поры. Можно полагать, что заведомо нецилиндрическая форма каналов в кусочках геля учитывается некоторым эффективным коэффициентом диффузии  $D^*$ , который описывает массоперенос в сложной пористой структуре геля.

Рассмотрение стационарного состояния такой системы, когда разность диффузионных потоков субстрата на входе и выходе элементарного объема равна скорости химического превращения в этом объеме, приводит аналогично (9.14) к равенству

$$-\pi R^2 D^* \frac{d^2 [S]}{dx^2} \delta x = -\pi R^2 \delta x \frac{r_{\max} [S]}{K_M + [S]}, \quad (9.28)$$

При выводе уравнения (9.28) принимается, что зависимость скорости превращения субстрата от его концентрации под действием ферментных систем иммобилизованных клеток описывается уравнением Михаэлиса — Ментен, причем  $r_{\max} = k[N_K]$ , где  $k$  — эффективная константа скорости превращения субстрата в продукты,  $[N_K]$  — средняя концентрация клеток в объеме геля. В условиях, когда эффективное значение константы  $K_M$  много больше концентрации субстрата в среде, омывающей частицы геля-носителя ( $K_M \gg [S]_0$ ), уравнение (9.28) приводится к виду

$$\frac{d^2 [S]}{dx^2} = \frac{r_{\max}}{D^* K_M} [S], \quad (9.29)$$

причем граничные условия не изменяются:  $[S] = [S]_0$  при  $x=0$  и  $d[S]/dx=0$  при  $x=L$ , т. к. частицы геля с клетками доступны для диффузии по всей своей поверхности.

Очевидно, что решение дифференциального уравнения второго порядка (8.29) будет полностью аналогично решению, рассмотренному выше для уравнения (9.16):

$$\frac{[S]}{[S]_0} = \frac{\operatorname{ch} \left[ L \sqrt{\frac{r_{\max}}{D^* K_M}} - x \sqrt{\frac{r_{\max}}{D^* K_M}} \right]}{\operatorname{ch} \left[ L \sqrt{\frac{r_{\max}}{D^* K_M}} \right]}, \quad (9.30)$$

а концентрация субстрата в середине частицы определяется величиной

$$[S]_{x=L} = [S]_0 \frac{1}{\operatorname{ch} \left[ L \sqrt{\frac{r_{\max}}{D^* K_M}} \right]}. \quad (9.31)$$

Таким образом, все приведенные выше выводы о влиянии диффузионных факторов и параметров носителя на эффективность процесса остаются в принципе правильными и для случая иммобилизации клеток, однако в этом случае радиус пор должен определяться чисто физической возможностью удерживать клетки внутри частицы, а определяющим параметром носителя остается размер его гранул  $2L$ . Иммобилизованные клетки будут тем эффективнее использоваться в биореакторе, чем меньше глубина диффузии субстрата  $L$  и выше коэффициент диффузионного переноса  $D^*$ , определяемый свойствами геля-носителя и реакционной среды. Напомним, что эти выводы справедливы только тогда, когда высокая скорость обтекания частиц жидкостью обеспечивает отсутствие внешних диффузионных сопротивлений, т. е. совпадение концентраций субстрата в потоке и на внешней поверхности частицы-носителя.

\* \* \*

В заключение § 9.1 и 9.2 следует отметить, что все реакции, осуществляемые иммобилизованными ферментами или клетками, закрепленными в пористом носителе, протекают через ряд последовательных стадий, который в общем случае включает:

- 1) массоперенос субстрата из ядра потока к наружной поверхности твердых частиц;
- 2) массоперенос (диффузия) субстрата внутри пор к молекулам фермента или клеткам;
- 3) комплексообразование фермента с субстратом и превращение последнего в продукты или транспорт субстрата в клетку, превращение его под действием мультиферментных систем клетки и перенос продуктов через клеточную стенку;
- 4) диффузию продуктов внутри пор к их устьям;
- 5) массоперенос продуктов от наружной поверхности частиц в ядро потока и выход из биореактора (проточного);

Кинетика основной — третьей — стадии общего процесса описана в главе 6, лимитирование на стадиях первой и второй рассмотрены выше.

Вопросы влияния четвертой и пятой стадий, связанных с массопереносом продукта от места его образования в поток жидкости, омывающей частицы с нанесенным ферментом или включенными клетками, изучены очень слабо. В большинстве случаев все наблюдаемые явления удастся объяснить и описать, не прибегая к предположениям о лимитировании процесса стадией транспорта продуктов, хотя такое явление и нельзя в принципе вообще исключать из рассмотрения, особенно для реакций биосинтеза, когда получающиеся продукты по молекулярной массе значительно превосходят исходные вещества.

### § 9.3. Диффузионные ограничения в процессах культивирования микроорганизмов и клеток

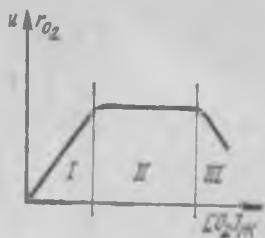
Глубинное культивирование аэробных микроорганизмов, а также выращивание культур клеток и тканей всегда представляет собой сложный гетерофазный процесс, в ходе которого протекают и массоперенос газов, прежде всего кислорода, в жидкую фазу и обратный переход газообразных продуктов, например углекислоты. Для таких процессов характерна одновременно зависимость скорости и от диффузионных, и от кинетических факторов, однако система «газ — жидкость — клетки» является, по существу, трехфазной, что неизбежно создает дополнительные трудности для описания даже по сравнению со сложными газожидкостными двухфазными системами.

Проникновение растворенных в жидкой фазе — обычно водной — субстратов, в том числе и газообразных, в клетку происходит путем диффузионного переноса к клеточной стенке с дальнейшим транспортом через мембрану внутрь клетки. Это явление может быть в принципе удовлетворительно описано моделью массопереноса к поверхности твердой частицы, рассмотренной в § 9.1, поскольку клетки принято считать «условно твердой» фазой. Сопrotивление этому процессу может оказаться достаточно большим и лимитировать общую скорость только в условиях неперемешиваемой жидкости и неподвижных клеток, например при анаэробном росте без перемешивания.

Для аэробного культивирования в аппаратах с мешалками или колонных биореакторах диффузионным сопротивлением на границе «клетка — жидкость» можно пренебречь в тех случаях, когда речь идет об отдельно растущих клетках, не связанных в агломераты и не образующих мицелия. Как показано в целом ряде исследований, система из отдельно развивающихся клеток микроорганизмов, находящихся в жидкой аэрируемой по объему среде, может испытывать влияние массопереноса на границе раздела «газ — жидкость», но практически никогда не лимитируется переносом веществ в клетку или обратным транспортом продуктов.

В предыдущей главе рассмотрен вопрос о лимитировании роста микроорганизмов каким-либо из питательных веществ. В частности, таким лимитирующим компонентом может быть и вещество, поступающее из газовой фазы, например кислород. Зависимость скорости роста культуры от концентрации кислорода в жидкой фазе представлена в самом общем виде на рис. 9.9, для этой кривой характерны три участка; на первом участке зависимость удельной скорости роста  $\mu$  от  $[O_2]_ж$  практически линейна, на втором — после закругления кривая переходит в прямую, параллельную оси абсцисс, на третьем — на-

Рис. 9.9. Изменение удельной скорости роста  $\mu$  и потребления кислорода  $r_{O_2}$  с ростом концентрации  $O_2$  в жидкой фазе (пояснения в тексте)



блюдается снижение  $\mu$  с ростом концентрации кислорода в жидкости. Первый участок зависимости соответствует лимитированию роста клеток кислородом, когда скорость потребления кислорода  $r_{O_2} = k[O_2]_{ж}$ , причем  $k = k_{O_2}[N_k]$ , где  $k_{O_2}$  — интенсивность дыхания в мл  $O_2$  на единицу концентрации клеток в единицу времени,  $[N_k]$  — концентрация клеток. Второй участок на рис. 9.9 описывает смену лимитирующего вещества, т. к. скорость роста перестает зависеть от концентрации растворенного кислорода, а третий указывает на ингибирование роста кислородом, которое наблюдается для некоторых типов микроорганизмов.

Влияние диффузионных факторов на рост популяции может наблюдаться только на первом участке при лимитировании роста веществом, поступающим из газовой фазы. В этом случае газообразный компонент переходит в жидкую фазу — абсорбируется в ней — со скоростью, определяемой физико-химическими свойствами газа и жидкости, а также гидродинамической обстановкой в аппарате. В отсутствие клеток или другого пути потребления газообразного компонента насыщение жидкости этим веществом возможно до некоторой равновесной концентрации, которая определяется растворимостью компонента А в жидкой фазе  $C_A$ . Присутствие клеток, которые потребляют этот компонент со скоростью  $r_A = k_A[N_k]C_A$ , способствует постоянному понижению концентрации А в жидкой фазе  $C_{A,ж}$ , которая поэтому всегда будет ниже равновесной  $C_{A,ж} < C_A$ . В свою очередь, равновесная концентрация связана с концентрацией в газовой фазе через константу фазового равновесия (коэффициент распределения)  $\gamma_A$ :  $C_A = \gamma_A C_{A,г}$ . При некоторой условно постоянной концентрации клеток  $[N_k]$  скорость потребления компонента А клетками и скорость его транспорта из газовой фазы должны быть одинаковыми, поскольку каждая из этих величин будет определяться концентрацией  $C_{A,ж}$ , которая достигнет некоторого стационарного значения, как это видно из модели процесса.

К настоящему времени опубликовано большое количество работ, рассматривающих закономерности массопереноса на границе двух подвижных фаз, прежде всего на поверхности раздела «газ — жидкость». Наибольшее приближение к существу физического явления дают теория обновления поверхности и пред-

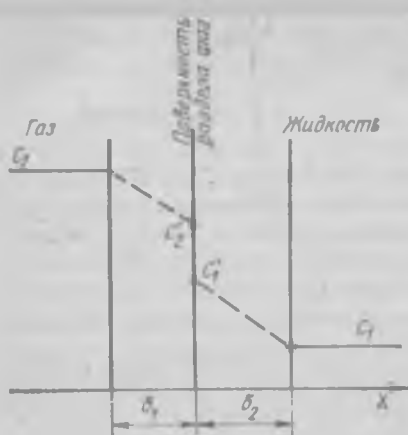


Рис. 9.10. Модель массопереноса в системе газ — жидкость по двухпленочной теории

ставления о межфазной турбулентности, однако для практических расчетов чаще всего пользуются двухпленочной теорией, которая хотя и содержит ряд заведомо спорных положений, тем не менее позволяет сделать выводы, качественно подтверждаемые экспериментом. Согласно этой теории с обеих сторон к поверхности контакта фаз прилегают тонкие пленки (рис. 9.10), в которых и сосредоточено сопротивление массопереносу. Предполагается, что внутри пленок отсутствует какое-либо перемешивание, поэтому перенос вещества из

ядра одной фазы к поверхности раздела и далее в ядро другой фазы происходит путем молекулярной диффузии, причем малая толщина пленок позволяет использовать закон Фика в виде конечных разностей, т. е. для единичной поверхности контакта фаз

$$r_2 = \frac{D_2}{\delta_1} (C_2 - C_1); \quad r_1 = \frac{D_1}{\delta_2} (C' - C_1).$$

Для количественных расчетов приходится также допустить, что на поверхности раздела фаз устанавливается термодинамическое равновесие, т. е.

$$C_2' = \gamma C_1'.$$

В этом случае оказывается, что общий коэффициент массопередачи  $\beta$  связан с коэффициентами массоотдачи в фазах  $\beta_1 = D_1/\delta_1$  и  $\beta_2 = D_2/\delta_2$  по правилу суммирования сопротивлений:

$$1/\beta = 1/\beta_1 + 1/\beta_2 \quad (9.32)$$

Как и ранее, здесь использованы обозначения:  $D_i$  — коэффициент молекулярной диффузии и  $\delta_i$  — толщина пленки в соответствующей фазе.

Первым следствием из пленочной теории массопередачи является возможность большого различия в сопротивлениях разных фаз, тогда одним из слагаемых в правой части (9.32) можно пренебречь и сделать вывод о так называемом сосредоточении сопротивления в одной из фаз, первой либо второй, по рис. 9.10. Этот вывод полностью подтверждается практикой, причем для систем «газ — жидкость» сопротивление сосредото-

чено в газовой фазе, если газ хорошо растворим в жидкости, как, например, аммиак или хлористый водород в воде, или в жидкой фазе, как это отмечено для всех трудно-растворимых газов, к которым относится кислород, водород, низшие *n*-алканы и т. д. при растворении в водной среде.

Для микробиологических процессов, в первую очередь для глубинного культивирования в аэробных условиях, можно считать, что сопротивление массопереносу сосредоточено в водной фазе, а коэффициент массопередачи равен коэффициенту массоотдачи в фазе жидкости (рис. 9.11). При достаточно хорошем перемешивании клетки равномерно распределены по объему жидкости, а вследствие малой величины  $\delta$  можно пренебречь тем количеством клеток, которое оказывается в пленке жидкой фазы вблизи поверхности раздела фаз. При таком допущении массоперенос компонента А из газовой фазы в жидкую будет протекать со скоростью

$$r_d = \beta_A (\bar{C}_A - C_A), \quad (9.33)$$

а поступившее в жидкую фазу вещество А потребляется растущей культурой со скоростью

$$r_A = k_A [N_K] C_A. \quad (9.34)$$

При неизменной или мало меняющейся концентрации А в газовой фазе и, следовательно, постоянной концентрации  $\bar{C}_A$  система из двух фаз с растущей в жидкой фазе культурой приходит в стационарное состояние, при котором потребление А клетками полностью компенсируется его поступлением из газовой фазы, т. е.  $r_d = r_A$ . Это позволяет приравнять выражения (9.33) и (9.34) при условии, что под  $\beta_A$  будет пониматься поверхностно-объемный коэффициент, отнесенный к поверхности, заключенной в единице объема жидкой фазы.

$$r_A = r_d = k_A [N_K] C_A = \beta_A (\bar{C}_A - C_A), \quad (9.35)$$

Выражая из этого равенства концентрацию в объеме жидкой фазы  $C_A$

$$C_A = \frac{\beta_A}{\beta_A + k_A [N_K]} \bar{C}_A \quad (9.36)$$

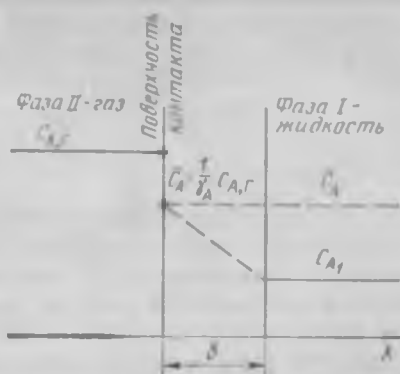


Рис. 9.11. Сосредоточение сопротивления в жидкой фазе при массопереносе компонента А и потреблении его клетками

и подставляя ее в (9.35), можно найти скорость потребления вещества А из газовой фазы

$$r_A = \frac{k_A [N_K] \beta_A}{\beta_A + k_A [N_K]} \bar{C}_A = k_{\text{эф}} \bar{C}_A = k_{\text{эф}} \frac{1}{\gamma_A} C_{A, \text{г}} \quad (9.37)$$

$$\text{где } \bar{C}_A = \frac{1}{\gamma_A} C_{A, \text{г}}.$$

Из полученного равенства видно, что процесс потребления А сохраняет первый порядок по этому веществу, т. е. что в общем уравнении (9.37) концентрация  $\bar{C}_A$  или  $C_{A, \text{г}}$  входит в первой степени, так же как это было в уравнении (9.34), отражающем характер потребления растворенного А клетками. Вместе с тем эффективная константа скорости в уравнении (9.37) представляет собой сложный комплекс из константы скорости потребления растворенного вещества А и коэффициента его массопереноса из фазы II в фазу I (см. рис. 9.11). Существенно, что в общей зависимости (9.37) сохраняется закон суммирования сопротивлений

$$\frac{1}{k_{\text{эф}}} = \frac{1}{\beta_A} + \frac{1}{k_A [N_K]}, \quad (9.38)$$

т. к. общее сопротивление процессу потребления вещества А —  $1/k_{\text{эф}}$  — оказывается суммой диффузионного сопротивления ( $1/\beta_A$ ) и так называемого кинетического, включающего параметры брутто-процесса метаболизма —  $1/k_A [N_K]$ .

Рассмотренная выше модель процесса, включающая последовательный перенос компонента из фазы в фазу и его потребление клетками в объеме жидкой фазы, приводит к выводу о существовании стационарной концентрации переносимого вещества в фазе, где происходит его потребление, т. е. о постоянстве во времени значения  $C_A$ , определяемого выражением (9.36). В течение времени, когда концентрация клеток  $[N_K]$  меняется мало, концентрация  $C_A$  будет постоянна, если  $C_{A, \text{г}}$  также неизменна, что обычно и бывает на практике. Такое стационарное значение  $C_A$  будет устойчивым, т. к. сама система стремится устранить внешние возмущения: действительно, при случайном возрастании  $C_A$  по сравнению со стационарной величиной уменьшится скорость массопереноса (9.33) из-за снижения движущей силы ( $\bar{C}_A - C_A$ ) и одновременно возрастет скорость потребления А культурой (9.34). Случайное воздействие, вызвавшее снижение  $C_A$ , приведет к обратному эффекту и также вызовет силы, возвращающие систему к стационарному состоянию, описываемому (9.35) и (9.36).

Большой практический интерес представляют частные случаи, возможные при значительных различиях в сопротивлениях (9.38).

Если скорость метаболизма А очень велика за счет либо большой величины  $k_A$ , либо высокой концентрации клеток  $[N_K]$ , то  $k_A[N_K] \gg \beta_A$  и для обратных величин — сопротивлений — справедливо неравенство

$$\frac{1}{\beta_A} \ll \frac{1}{k_A[N_K]}. \quad (9.39)$$

Тогда (9.38) может быть упрощено, поскольку малым сопротивлением в сумме допустимо пренебречь, т. е.  $k_{\text{эф}} \approx \beta_A$  и общая скорость

$$r_A \cong \beta_A \bar{C}_A = \beta_A \frac{1}{\gamma_A} C_A, \text{ г.} \quad (9.40)$$

Этот крайний случай соответствует диффузионному режиму протекания процесса, причем сам характер зависимости (9.40) указывает, что в таких условиях  $C_A \cong 0$ , т. е. культура потребляет компонент А, диффундирующий из фазы II при его почти полном отсутствии в жидкой — первой — фазе. Понятно, что все факторы, способствующие увеличению коэффициента массопередачи  $\beta_A$ , будут ускорять общий процесс культивирования за счет улучшения снабжения клеток лимитирующим субстратом, к этому же в принципе будет приводить и увеличение концентрации А или его парциального давления во второй — газовой — фазе.

Второй крайний случай, когда  $\beta_A \gg k_A[N_K]$ , достигается в условиях медленного потребления А культурой или ее низкой концентрации. Неравенство

$$\frac{1}{\beta_A} \ll \frac{1}{k_A[N_K]} \quad (9.41)$$

приводит в этом случае (9.37) к виду

$$r_A \cong k_A[N_K] \bar{C}_A = k_A[N_K] \frac{1}{\gamma_A} C_A, \text{ г.} \quad (9.42)$$

Скорость потребления компонента А, согласно (9.42), определяется только кинетическими факторами, т. к. такой режим можно назвать кинетическим.

В этих условиях массоперенос обеспечивает максимально возможное снабжение клеток компонентом, поступающим из газовой фазы, а текущая концентрация  $C_A$ , как это видно из сравнения (9.34) и (9.42), практически не отличается от равновесной, соответствующей насыщению. Естественно, единственной возможностью для ускорения роста культуры в этих условиях становится повышение содержания А во второй фазе, т. е. рост парциального давления А в газовом потоке.

Понятно, наконец, что между рассмотренными частными случаями  $\beta_A \ll k_A[N_K]$  и  $\beta_A \gg k_A[N_K]$  лежит достаточно широкая

область, где значения этих величин, а следовательно, и сопротивлений сравнимы. Эту область принято называть переходным режимом, когда на общую скорость потребления  $A$  и роста культуры влияют и кинетические, и диффузионные параметры, роль которых меняется по мере приближения к одному из крайних случаев.

Наиболее простым и надежным способом выявления влияния диффузионных факторов при культивировании является изменение поверхности контакта фаз, которое может быть достигнуто интенсификацией гидродинамической обстановки в аппарате. Экспериментальные исследования поверхности раздела в системах «газ — жидкость» показали, что величина поверхности контакта, отнесенная к единице объема жидкости, возрастает пропорционально приведенной скорости газа в колонных аппаратах. Особенно сильно она увеличивается с ростом интенсивности перемешивания в аппаратах с мешалками, где сообщаемая мешалкой энергия пропорциональна (в определенных пределах) кубу частоты вращения и пятой степени диаметра лопастно-дисковых (турбинных) мешалок. В процессе роста культуры скорость потребления компонента, растворенного в газовой фазе, обычно не зависит от частоты вращения мешалки, поэтому ускорение роста и потребления субстрата при интенсификации гидродинамического режима в биореакторе указывает на влияние диффузионных факторов и на возможность увеличения производительности аппарата путем снятия диффузионных сопротивлений.

Достижение концентраций растворенного кислорода, при которой он перестает быть лимитирующим компонентом среды (участок II кривой на рис. 9.9), возможно, как уже отмечалось, путем роста концентрации  $O_2$  в газовой фазе и (или) увеличением коэффициента массопередачи за счет развитой поверхности контакта фаз. Второй путь предпочтительнее, прежде всего, из экономических соображений, т. к. не требует обогащения воздуха кислородом, однако этим способом нельзя создать концентрации выше равновесной, т. е. выше растворимости. Если оптимальная концентрация растворенного в воде  $O_2$  выше равновесной для воздуха, неизбежно использование газовой смеси, обогащенной кислородом.

Для некоторых культур концентрация кислорода, равновесная по отношению к воздуху, оказывается ингибирующей, что соответствует участку III кривой роста рис. 9.9. В этом случае, очевидно, нецелесообразно уменьшать содержание кислорода в газовой смеси, поскольку тот же эффект может быть достигнут некоторым ограничением массообмена за счет меньшей интенсивности перемешивания и т. п.

В заключение необходимо подчеркнуть, что все сказанное

выше в § 9.3 относится к неассоциированным культурам. Образование агрегатов из нескольких клеток, а также довольно частое прикрепление клеток к неподвижным частям аппарата резко меняет все зависимости, т. к. для таких положений лимитирование обычно заключается в медленном проникновении субстрата и других компонентов среды внутрь многоклеточных образований. В результате этого ассоциат может даже лизироваться изнутри при нормальном развитии клеток, находящихся на поверхности; естественно, что количественные закономерности роста таких популяций не поддаются какому-либо априорному описанию.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. При протекании процесса с участием иммобилизованного на твердой поверхности фермента устанавливается стационарное состояние, при котором скорости массопереноса субстрата и его превращения равны между собой. Как вы объясните в связи с этим понятие лимитирования одной из стадий такого процесса?

2. Биохимическая реакция протекает в кинетическом режиме с участием фермента, иммобилизованного на твердой поверхности. Известно, что вещество Р является ингибитором фермента. Какие исследования следует предпринять, если предполагается изучать влияние Р на иммобилизованный фермент? Что изменится в содержании исследований, если вещество Р не ингибирует, а активирует иммобилизованный фермент?

3. Ферментативная реакция протекает в диффузионном режиме с катализатором, нанесенным на поверхность стеклянных шариков. Может ли такой процесс описываться уравнением Михаэлиса — Ментен? Как может измениться кинетическое описание такого процесса при снижении эффективности перемешивания жидкой фазы?

4. Каковы достоинства и недостатки крупнопористых и мелкопористых носителей для иммобилизации ферментов?

5. Каковы преимущества и недостатки методов иммобилизации ферментов и клеток в природных и синтетических полимерных гелях по сравнению с приемами, основанными на химическом связывании с твердой инертной поверхностью?

6. Какими могут быть диффузионные и технологические осложнения при использовании клеток, иммобилизованных в геле, вследствие а) набухания геля; б) размножения культуры; в) лизиса части клеток?

7. Как вы опишете диффузионные сопротивления, возникающие при аэробном культивировании: а) дрожжей на жидких *n*-алканах; б) бактерий на метане (природном газе); в) дрожжей или бактерий на метаноле?

8. При промышленном получении микробного белка на *n*-алканах отмечено положительное влияние на стадии ферментации поверхностно-активных веществ, а при производстве L-лизина регламентом предусмотрено введение в ходе биосинтеза поверхностно-активных веществ, способных уменьшать пенообразование. Какое влияние на гидродинамическую обстановку в биореакторе оказывают эти ПАВ и как с этих позиций можно объяснить наблюдаемые эффекты?

9. Повысить концентрацию растворенного в среде кислорода можно разными способами — повышая массообменные характеристики (сульфитное чис-

ло) биореактора, увеличивая давление в аппарате или переходя на подачу воздуха, обогащенного кислородом. Как вы объясните эффект, получаемый в каждом из этих случаев, и сравните их принципиальную и технологическую эффективность?

10. В качестве одного из вариантов иммобилизации ферментов и особенно клеток можно рассматривать применение мембранных биореакторов, у которых полупроницаемая мембрана удерживает лишь ферменты или клетки. Каковы особенности этого способа по сравнению с другими известными приемами — иммобилизацией в геле, на неподвижной твердой поверхности, на диспергированных в среде твердых частицах и т. п.?

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА К ТРЕТЬЕМУ РАЗДЕЛУ

1. Аткинсон Б. Биохимические реакторы. — М.: Пищевая промышленность, 1979. — 280 с.
2. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. Биокинетика. — М.: Наука, 1979 — 248 с.
3. Березин И. В., Клесов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. — Изд-во МГУ, 1976. — 320 с.
4. Бирюков В. В., Кантере В. М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. — М.: Наука, 1985. — 292 с.
5. Блохина И. Н., Угодчиков Г. А. Исследование динамики микробных популяций. Системный подход, Волго-Вятское кн. изд-во, Горький, 1980. — 182 с.
6. Введение в прикладную энзимологию. Иммобилизованные ферменты. Ред. И. В. Березин, К. Мартинек, Изд-во МГУ, 1982. — 383 с.
7. Иванов В. Н., Угодчиков Г. А. Клеточный цикл микроорганизмов и гетерогенность их популяций. — Киев: Наукова думка, 1984. — 279 с.
8. Кафаров В. В., Винаров А. Ю., Гордеев Л. С. Моделирование биохимических реакторов. — М.: Лесная промышленность, 1979. — 342 с.
9. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М.: Высшая школа, 1980. — 272 с.
10. Матвеев В. Е. Научные основы микробиологической технологии. — М.: Агропромиздат, 1985. — 224 с.
11. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978. — 331 с.
12. Печуркин Н. С. Популяционная микробиология. — Наука: СО Новосибирск, 1978. — 277 с.
13. Сб. «Ферментация и технология ферментов»//Пер. с англ. В. М. Вадимова под ред. К. А. Калунянца. — М.: Легкая промышленность, 1983 — 336 с.
14. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. — М.: Мир, 1980 — 432 с.

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Предисловие . . . . . | 3 |
|-----------------------|---|

## 1 РАЗДЕЛ. БИОХИМИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ПРОМЫШЛЕННЫМИ ПРОЦЕССАМИ

|                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Глава 1. Основные принципы регуляции микробного метаболизма                               | 5   |
| § 1.1. Классификация продуктов метаболизма . . . . .                                      | 5   |
| § 1.2. Характеристики роста микроорганизмов. Методы культивирования . . . . .             | 8   |
| § 1.3. Контроль роста микробной культуры и экспрессия генов . . . . .                     | 12  |
| § 1.4. Мутационные дефекты метаболической регуляции . . . . .                             | 17  |
| § 1.5. Элементы методологии генетической инженерии . . . . .                              | 22  |
| § 1.6. Контроль клеточного метаболизма и эффекты проницаемости мембран . . . . .          | 24  |
| § 1.7. Секреция ферментов микроорганизмами . . . . .                                      | 27  |
| Контрольные вопросы . . . . .                                                             | 28  |
| Глава 2. Биохимические основы синтеза метаболитов и биоконверсии углеводного сырья        | 29  |
| § 2.1. Микробный синтез аминокислот и его регуляция . . . . .                             | 29  |
| § 2.2. Ферментативные процессы синтеза аминокислот и разделения их рацематов . . . . .    | 37  |
| § 2.3. Продуцирование микроорганизмами антибиотиков и их модификация . . . . .            | 46  |
| § 2.4. Регуляция образования ферментов как конечных продуктов . . . . .                   | 57  |
| § 2.5. Микробиологическое и химико-энзиматическое получение органических кислот . . . . . | 61  |
| § 2.6. Микробиологический синтез витаминов . . . . .                                      | 65  |
| ✓ § 2.7. Получение экстрацеллюлярных полисахаридов . . . . .                              | 67  |
| § 2.8. Получение углеводного сырья путем биоконверсии растительных материалов . . . . .   | 71  |
| Контрольные вопросы . . . . .                                                             | 74  |
| Глава 3. Утилизация субстратов клетками как основа управления процессами биосинтеза       | 75  |
| § 3.1. Метаболизм n-алканов . . . . .                                                     | 75  |
| § 3.2. Метаболизм метана и метанола . . . . .                                             | 89  |
| § 3.3. Метаболизм этанола . . . . .                                                       | 97  |
| § 3.4. Метаболизм водородокисляющих бактерий . . . . .                                    | 99  |
| Контрольные вопросы . . . . .                                                             | 102 |
| Рекомендуемая литература к первому разделу . . . . .                                      | 102 |

## 2 РАЗДЕЛ. ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ И РАСЧЕТ ПРОЦЕССОВ БИОТЕХНОЛОГИИ

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Глава 4. Основы термодинамического описания биохимических реакций                       | 104 |
| § 4.1. Основные положения термодинамики в приложении к биохимическим реакциям . . . . . | 104 |
| § 4.2. Практические расчеты при описании равновесия биохимических реакций . . . . .     | 110 |
| § 4.3. Термодинамика необратимых процессов в приложении к биохимии . . . . .            | 117 |
| Контрольные вопросы . . . . .                                                           | 123 |

|                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Глава 5. Термодинамические расчеты в биотехнологических процессах</b>            | 124 |
| § 5.1. Стехиометрия и материальные балансы микробиологических процессов             | 124 |
| § 5.2. Энергетическая эффективность процессов микробиологического синтеза           | 130 |
| § 5.3. Термодинамическое описание стационарного состояния биотехнологических систем | 137 |
| <i>Контрольные вопросы</i>                                                          | 142 |
| Рекомендуемая литература ко второму разделу                                         | 143 |

### 3 РАЗДЕЛ. КИНЕТИКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

|                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Глава 6. Кинетическое описание ферментативных процессов</b>                                                  | 144 |
| § 6.1. Основные принципы кинетического описания ферментативных реакций                                          | 144 |
| § 6.2. Количественное описание обратимого ингибирования и активации ферментов                                   | 154 |
| § 6.3. Учет спонтанной инактивации ферментов в ходе ферментативных превращений                                  | 165 |
| § 6.4. Влияние температуры на скорость ферментативных реакций                                                   | 168 |
| <i>Контрольные вопросы</i>                                                                                      | 172 |
| <b>Глава 7. Основные кинетические закономерности роста глубинных культур и накопления продуктов метаболизма</b> | 173 |
| § 7.1. Феноменологическое описание процессов культивирования микроорганизмов                                    | 174 |
| § 7.2. Влияние субстрата на рост популяции микроорганизмов                                                      | 180 |
| § 7.3. Влияние продуктов метаболизма на рост микробных популяций                                                | 191 |
| § 7.4. Сложные модели роста популяций                                                                           | 194 |
| § 7.5. Влияние условий культивирования на скорость роста микроорганизмов                                        | 200 |
| § 7.6. Кинетика накопления продуктов метаболизма                                                                | 205 |
| § 7.7. Кинетика гибели микроорганизмов                                                                          | 210 |
| <i>Контрольные вопросы</i>                                                                                      | 213 |
| <b>Глава 8. Количественное описание глубинного культивирования в идеальных аппаратах</b>                        | 214 |
| § 8.1. Глубинное культивирование в идеальном периодическом биореакторе                                          | 216 |
| § 8.2. Культивирование микроорганизмов в проточном аппарате идеального вытеснения                               | 219 |
| § 8.3. Культивирование микроорганизмов в проточном аппарате полного смешения. Хемостатные культуры              | 222 |
| § 8.4. Культивирование отъемно-доливным способом                                                                | 231 |
| § 8.5. Культивирование микроорганизмов в системе из нескольких идеальных биореакторов                           | 234 |
| § 8.6. Смешанные культуры и автоселекция при непрерывной ферментации                                            | 238 |
| <i>Контрольные вопросы</i>                                                                                      | 241 |
| <b>Глава 9. Влияние массопереноса на кинетику процессов биотехнологии</b>                                       | 243 |
| § 9.1. Иммобилизация ферментов на твердых непористых носителях                                                  | 243 |
| § 9.2. Иммобилизация ферментов на пористых носителях. Иммобилизация клеток                                      | 249 |
| § 9.3. Диффузионные ограничения в процессах культивирования микроорганизмов и клеток                            | 262 |
| <i>Контрольные вопросы</i>                                                                                      | 269 |
| Рекомендуемая литература к третьему разделу                                                                     | 270 |

