Министерство образования
Российской Федерации

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
Московский государственный университет леса

А.Д. Неклюдов, А.Н. Иванкин

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебник

Допущено Учебно-методическим объединением по образованию в области лесного дела в качестве учебника для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению «Химическая технология»

Издательство Московского государственного университета леса

Москва – 2016

УДК 573.6
6Л2 Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Экологические основы биотехнологии: Учебник для студентов спец. 180301. – М.: МГУЛ, 2016. – 416 с.: ил. 120.

В учебнике рассмотрены экологические основы технологических процессов как единство современных достижений химии, экологии и биотехнологии.

Рекомендуется для углубленного изучения студентами технических специальностей.

Рецензенты: д.х.н., профессор И.А. Ямсков, зав. лабораторией физиологически активных биополимеров ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН;

к.т.н., доцент Кузнецова Т.Г., кафедра ветеринарно-санитарной экспертизы Московского государственного университета прикладной биотехнологии

Кафедра химии и биотехнологии лесного комплекса

Авторы: Андрей Дмитриевич Неклюдов, д.х.н., профессор;
Андрей Николаевич Иванкин, д.х.н., профессор

ISBN

© Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., 2016
© Московский государственный университет леса, 2016

Введение

Каждому образованному человеку известно, что под термином «биосфера» понимают область активной жизни, охватывающей нижнюю часть атмосферы, гидросферу и верхнюю часть литосферы. Термин «биосфера», впервые предложенный австрийским ученым Э. Зюссом в 1875 г, нередко употребляют как синоним термину природа. Особая заслуга в разработке учения о биосфере принадлежит русскому ученому – энциклопедисту В.И. Вернадскому (1863–1945). К сожалению, возможности биосферы в поддержании нормального человеческого существования весьма ограничены. Запасы горючих ископаемых постепенно подходят к концу, площадь земель, с которых можно устойчиво получать хороший урожай, вовсе не велика. Способность рек и других водных ресурсов перерабатывать наши отходы, уже практически использована до предела, а возрастание концентрации углекислого газа в атмосфере происходит постоянно и с такой скоростью, что этому уже не способны противостоять никакие природные процессы. Будущее человечества, причем не отдаленное, а самое близкое, зависит от поведения людей, которые сейчас живут на планете.

Что же делать, чтобы уцелеть в той ненадежной лодке, каковой является в настоящее время наша земля? Каким образом наладить наши взаимоотношения с окружающей средой? Как добиться того, чтобы наше дальнейшее существование длилось достаточно долго и не угрожало бы всей остальной жизни на планете? Ответы на них человечество давно уже искало в мифологии, религии и философии. В последнее время общество стало возлагать все большие надежды на науку. Но наука сама по себе часто не может предложить решения насущных проблем, поскольку движущая сила любой науки – любопытство, трансформирующиеся порой в неодолимую страсть постижения устройства мира. Для удовлетворения же жизненных потребностей отдельного человека и целого общества в целом служит технология – совершенно особая форма деятельности, существовавшая в каждой цивилизации и обусловливающая порой ее развитие. Среди уже устоявшихся технологий, таких как металлургия, сельское хозяйство, тяжелое машиностроение и др., в последние 20–30 лет особое место заняла биотехнология – наука о химических взаимодействиях и микроорганизмах, способных осуществлять разнообразные химические реакции и тесно связанная с химией и экологией.

Освоение человеком еще на заре своего существования определенных технологий позволило ему занять совершено особое место среди всех других микро- и макроорганизмов. Фактически человек захватил принципиально новую нишу, став, выражаясь на экологическом жаргоне, сверхэффективным хищником и сверхэффективным конкурентом. Освоение с конца XVIII века одной из важнейших технологий – использование энергии горючих ископаемых – стало еще одним крупным шагом в завоевании природы. В результате человеку стало казаться, что он является полновластном хозяином на Земле и этому его положению уже ничего не угрожает. Однако быстрый рост народонаселения, истощение природных ресурсов и накопление вредных продуктов хозяйственной деятельности привели к тому, что во многих местах нашей планеты ситуация стала критической не только для еще оставшихся там элементов дикой природы, но и для самого человека. Успехи в области многих технологий, позволяющие человеку на протяжении всей его истории достигать все большей независимости от остальной биосферы, стали оборачиваться все большими несчастиями. Характерным примером такого несчастья стала катастрофа на Чернобыльской атомной электростанции.

Каков же выход из сложившейся ситуации? Как это ни парадоксально – тоже в развитии технологии, но имеющей другую целевую направленность. Эта технология должна быть направлена на то, чтобы обеспечить достойную жизнь всем людям этой планеты при условии поддержания хотя бы на нынешнем уровне всей остальной биосферы со всеми ее обитателями, с влажными тропическими лесами Амазонии, сибирской тайгой и арктической тундрой.

Для того, чтобы разрабатывать и внедрять подобную технологию или технологии, способствующие сохранению жизни на земле, для того, чтобы быть готовыми вкладывать в эти технологии немалые средства (жертвуя при этом какими-то другими, возможно, совсем немаловажными интересами), мы, прежде всего, должны хорошо знать истинное положение вещей. Очевидно, что без объективной информации невозможно и думать о принятии правильного решения.

Настоящий учебник по курсу «Экологические основы биотехнологии» для студентов, аспирантов и научных работников разработан на базе учебных пособий авторов: «Экологические основы биотехнологических производств» и «Экологические основы производств. Взаимосвязь экологии, химии и биотехнологии», вышедших в издательстве МГУлеса в 2002-2003 гг. Авторы попытались изложить суть ряда недавних химических, биохимических и биотехнологических достижений, способных, на наш взгляд, если и не решить полностью многие экологические проблемы, то, во всяком случае, наметить путь к их эффективной реализации.

Глава 1

МИКРООРГАНИЗМЫ КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛИ ВЕЩЕСТВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ, ИХ РАЗНООБРАЗИЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Мир микроорганизмов обширен и разнообразен. Он включает в себя многие тысячи представителей разных систематических групп, причем открываются все новые и новые виды. Размеры микроорганизмов меньше разрешающей способности человеческого глаза (около 0,2 мм), поэтому их изучение связано с использованием микроскопов, а также особых методов выращивания, обычно на стерильных средах, и последующим выделением в виде чистых культур т.е. культур, в которых присутствуют только определенные штаммы одного вида.

Штамм – это чистая культура микроорганизмов одного вида, у которых изучены морфологические и физиологические особенности. Разнообразные штаммы микроорганизмов одного и того же вида могут по ряду свойств, например, по чувствительности к антибиотикам, отличаться друг от друга.

На основании особенностей организации клеток, т.е. их морфологии, микроорганизмы подразделяют на прокариоты и эукариоты. К прокариотам относятся наиболее простые виды микроорганизмов, например, бактерии, так называемые микрофлоры. Более сложные виды микроорганизмов носят название эукариотов; их морфология и физиология достаточно сложны. К эукариотам относятся многие водоросли, простейшие, например, амебы и грибы. По строению клеток они принципиально не отличаются от высших растений и животных, включая человека.

Микроорганизмы подвижны. Размножение их чаще всего происходит путем простого деления клеток, иногда почкованием или другими бесполовыми способами. Однако у многих эукариотов размножение осуществляется половым путем, в результате которого возникают новые комбинации генов.

Ген – это единица наследственности, вернее единица наследственного материала, то есть определенного участка высокомолекулярного биополимера – дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), ответственной за формирование какого либо признака, например, цвета глаз у человека. Совокупность всех генов организма составляет его генетическую конституцию, так называемый *генотип*.

Генетическая рекомбинация, или обмен генов, имеет место и у прокариотов, однако в отличии от эукариотов, при этом происходит лишь частичная передача генетического материала из одной клетки в другую.

Иногда к микроорганизмам относят и *вирусы*, но чаще их рассматривают как особую категорию биологических объектов, поскольку они не имеют клеточного строения, содержат, в отличие от эукариот и прокариот, лишь один тип нуклеиновых кислот и размножаются только в чужих клетках, так называемых клетках хозяина. Вирусы находят у разных организмов, в том числе и у бактерий. Вирусы бактерий принято называть *бактериофагами.*

Несмотря на то, что первые описания микроорганизмов, сделанные голландским натуралистом А. Левенгуком, появились еще в конце XVII века, микробиология как самостоятельная наука начала формироваться лишь в середине XIX века.

Основополагающее значение для этого имели работы Л. Пастера, доказавшие, что брожение, а также некоторые заболевания человека и животных вызываются специфичными для них микроорганизмами.

Дальнейшие исследования микробиологов многих стран показали, что, несмотря на малые размеры, микроорганизмы могут осуществлять разнообразные процессы, имеющие большое значение в природе и в практической деятельности человека.

Важным свойством микроорганизмов является их способность к быстрому размножению. Известны бактерии, которые делятся каждые 30–60 и даже 8–10 минут, в результате из одной бактериальной клетки массой около $2{,}5 \cdot 10^{12}$ г за 2–4 суток в условиях неограниченного роста может образоваться биомасса в количестве более 10 тонн. В действительности этого конечно не происходит, так как действуют различные лимитирующие факторы, связанные с доступностью питательных веществ, но ясно одно, что возможности микроорганизмов в данном отношении намного превосходят растения и животных. Для примера можно привести следующие данные по увеличению биомассы.

Время, необходимое для удвоения биомассы некоторых микроорганизмов, растений и животных составляет:

бактерии и дрожжи –	20 – 120 мин,
плесень и водоросли –	2 – 6 ч,
трава и растения –	1 – 2 дня,
цыплята –	2 – 4 дня,
поросята –	4 – 6 недель,
крупный рогатый скот –	1 – 2 месяца.

Из представленных данных видно, что микроорганизмы обладают явным преимуществом по скорости увеличения количества биомассы по сравнению с другими живыми объектами.

В зависимости от вида дыхания микроорганизмы подразделяются на *аэробов и анаэробов*. Для первых видов микроорганизмов для дыхания

обязательно требуется кислород или воздух. Вторые могут жить в бескислородных условиях и потреблять в процессе своей жизнедеятельности H_2S, а также сульфат- или нитрат- и другие ионы.

Максимальная температура, при которой может существовать большинство известных микроорганизмов обычно не превышает 40–50°С, но споры некоторых бактерий сохраняют способность к прорастанию даже после их прогревания при температурах 100–160°С. Обнаружены также бактерии, растущие при 90–110°С. Они получили название *термофилов* в отличие от обычных бактерий, живущих при 40–50°С, которые носят название *мезофилов*. Некоторые микроорганизмы, называемые *психрофилами*, могут расти только при температуре 5–20°С.

Известны *ацидофильные микроорганизмы*, которые выдерживают высокую концентрацию кислот и растут при pH среды ниже 1,0. В природе существуют также формы микроорганизмов, живущих в щелочной среде. Некоторые микроорганизмы проявляют высокую устойчивость к ионам тяжелых металлов, обычно токсичных в достаточно низких концентрациях. Интересную группу представляют красные *галобактерии*, способные расти даже в насыщенном растворе NaCI.

Отдельные микроорганизмы переносят значительное гидростатическое давление до 1000–1400 атм. Многие виды микроорганизмов сохраняют свою жизнедеятельность в глубоком вакууме. Известны микроорганизмы, выдерживающие высокие дозы ионизирующего излучения, причем некоторые из них могут существовать в атомных реакторах.

Очень разнообразны микроорганизмы в отношении питания. Многие микроорганизмы, называемые *автотрофами*, синтезируют все необходимые компоненты клеток из углекислоты и воды. К их числу относятся микроформы водорослей и ряд бактерий, которые, как и зеленые растения, используют для биосинтетических процессов энергию света, т.е. осуществляют фотосинтез.

Некоторые микроорганизмы нуждаются для роста в таких биогеных элементах (*биогенах*), как азот, фосфор, сера, марганец, а также в готовых органических соединениях, например, в витаминах. Такие микроорганизмы носят название *гетеротрофы* и к ним относятся многие бактерии, грибы и простейшие. Часть таких микроорганизмов растет только на сложных средах, содержащих витамины, аминокислоты и другие органические соединения.

В целом микроорганизмы способны использовать весьма разнообразный ассортимент питательных веществ – субстратов, начиная с высокомолекулярных (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды) и кончая низкомолекулярными соединениями (аминокислоты, глюкоза). К числу органических соединений, которые используются микроорганизмами, обычно относят целлюлозу, лигнин, углеводы, углеводороды и

ряд других соединений. Известны микроорганизмы, использующие для своего роста не только природные вещества, но также синтетические пластмассы, пестициды и другие соединения неприродного происхождения.

Уникальным свойством ряда бактерий (нитрифицирующие бактерии) является способность фиксировать и усваивать молекулярный азот, что имеет существенное значение для плодородия почв и общего круговорота азота в природе.

Чрезвычайно важно для практики то обстоятельство, что в процессе роста микроорганизмов на различных субстратах они способны выделять в питательную среду такие важные химические соединения как ферменты, полисахариды, антибиотики, органические кислоты и другие продукты их первичного и вторичного метаболизма.

Метаболизм, т.е. обмен веществ, у многих микроорганизмов может существенно меняться в зависимости от условий среды. Этот факт помогает выяснить механизм, лежащий в основе регуляции ряда биохимических реакций, с целью получения нужных для практики химических веществ.

Огромное значение имеет исследование микроорганизмов для развития молекулярной биологии и генетики. Достаточно напомнить, что первые данные относительно роли дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) как носителя генетической информации были получены в опытах на бактериях. Эти опыты явились основой для развития генетической инженерии, т.е. получении штаммов из прокариотов или простейших эукариотов – продуцентов таких важных для человека белков как инсулин, соматотропин, некоторых сывороток гепатита, антикоагулянтов, пептидных гормонов, отсутствие которых может оказаться летальным для человека.

Изучение биохимии и жизнедеятельности микроорганизмов вносит ценный вклад в понимание биологической эволюции. Эти исследования расширяют представления о роли биосферы в условиях земного существования, к которой относятся почва, вода, воздух и весь животный мир, населяющий нашу планету, а также имеет большое значение в связи с вопросом о существовании жизни на других планетах в условиях других галактик.

Глава 2

БИОФИЗИКА И СТРОЕНИЕ КЛЕТОК

В настоящее время уже ни у кого нет сомнений, в том, что даже простейшие микроорганизмы вмещают в себя сложный комплекс удивительно эффективных и в высшей степени координированных химических реакторов, систем информации, контроля, управления и массопередачи. Данные об этом были получены в результате многочисленных экспериментальных исследований с использованием методов, заимствованных из физических и химических наук. Подобный подход к изучению сложных метаболических процессов микроорганизмов оказался весьма плодотворным. Действительно, применимость основных положений химии и физики к биологическим системам является в настоящее время рабочей гипотезой, широко распространенной в комплексе наук о жизни. Для более четкого разграничения области науки, в которой биологические проблемы решаются физическими методами, часто употребляют термин «*биофизика*».

Поворотным пунктом в понимании живых систем можно считать 1838 год, когда немецкие ученые ботаник М.Я. Шлейден и биолог Т. Шванн впервые сформулировали *клеточную теорию*, постулировавшую, что все живые системы состоят из клеток и продуктов их жизнедеятельности. Таким образом, была создана концепция основного строительного элемента жизни.

Эта концепция об общем для всех живых организмов элементе структуры позволила разделить изучение живых систем на два этапа, на первом из которых исследуют составляющие системы клетки, а затем на этой основе стараются понять структуру организма в целом.

Целесообразность такого разделения исследований базируется на том факте, что выделенные из разнообразных организмов клетки имеют много общего как в отношении их строения, так и в отношении выполняемых ими функций. Следовательно, данные, полученные при экспериментальных работах на клетке одного организма, во многих случаях удается успешно перевести на клетки других типов. Наличие общих для всех клеток особенностей, как правило, существенно упрощает задачу изучения поведения микроорганизмов. Сконцентрировав внимание на самых универсальных функциях клеток, можно создать основу для понимания функций всех живых систем.

Вышеназванный подход во многих случаях является вполне оправданным, но это вовсе не значит, что все существующие клетки идентичны. Напротив, клетки мышц, например, резко отличаются от клеток глаза или мозга. Еще большие отличия наблюдаются между клетками растений и животных. Существует множество типов

одноклеточных организмов, которые вкупе со всеми их особенностями строения могут быть разделены на две основные группы: прокариотов и эукариотов.

2.1. Прокариотические клетки

Структура прокариотических клеток или прокариотов, также как и других клеточных систем, была установлена с помощью электронных микроскопов высокой разрешающей способности. В настоящее время достоверно установлено, что прокариоты не имеют заключенного в мембрану ядра, отличаются относительно небольшими размерами и простотой строения. Обычно они существуют изолировано, вне связи с другими клетками. Линейные размеры этих клеток, которые могут иметь сферическую, палочкообразную или спиральную форму, как правило, составляют от 0,5 до 3 мкм. В первом приближении можно считать, что масса одного прокариота составляет 10^{-12} г.

Микроорганизмы этого типа растут очень быстро и широко распространены в природе. Некоторые прокариоты могут удваиваться в размере, массе и числе за 20 мин. Прокариоты, как правило, биохимически универсальны в том смысле, что они могут усваивать самые разнообразные питательные вещества из имеющейся в окружающей среде смеси. Эта особенность прокариот способствует тому, что прокариотические клетки могут приспособиться к самым разным условиям. Поскольку прокариоты обычно существуют как изолированные одноклеточные организмы, у них практически нет средств контроля окружающей среды. По этой причине проявляемая ими гибкость в выборе питательных веществ необходима для их выживания, Быстрый рост и биохимическая универсальность прокариот делают их незаменимыми в биологических исследованиях и биохимической технологии.

На рис. 2.1 изображены основные структурные элементы прокариотической клетки. Клетка окружена жесткой стенкой толщиной около 200 Å ($200 \cdot 10^{-10}$ м). Стенка обеспечивает сохранение клетки как единого целого, что необходимо для ее выживания в меняющихся условиях среды. Непосредственно под стенкой расположена клеточная мембрана, которая обычно имеет толщину около 70 Å и по строению не отличается от мембран других клеток. Иногда ее называют *плазматической мембраной.* Важнейшая функция мембраны заключается в транспорте веществ из клетки в среду и наоборот, причем от мембраны зависит, какие вещества и с какой скоростью будут транспортироваться в клетку и из клетки. Внутри клетки имеется довольно большая, четко не ограниченная область, называемая *нуклеоидом*, которая играет основную роль в контроле жизненно важных функций клетки. Темные пятнышки неправильной формы внутри клетки изображают *рибосомы* – центры важнейшего

биохимического процесса – белкового синтеза. *Цитоплазмой* называется жидкость, занимающая весь остальной объем клетки. В прокариотической клетке имеются также светлые, напоминающие пузырьки области, называемые *резервными гранулами*. Их не видно на приведенном рисунке, но можно различить на некоторых других микрофотографиях.

Обладая многими общими структурными и функциональными элементами, различные прокариоты могут в то же время существенно отличаться друг от друга. Например, у сине-зеленых водорослей имеются мембраны, способные улавливать энергию света и использовать ее для фотосинтеза. В этом сложном процессе усвоения солнечной энергии клетки обеспечиваются необходимым для их жизнедеятельности органическим веществом и выделяют в атмосферу кислород.

Рис 2.1. Электронная микрофотография прокариоты *Bacillus subtilis.* Длина клетки 2 мкм, ширина 1 мкм

2.2. Эукариотические клетки

Второй основной тип клеток составляют *эукариотические клетки.* Эукариотами называют клетки, ядро которых заключено в мембрану. Как правило, эукариотическая клетка по объему в 1000 – 10 000 раз больше прокариотической. К этому типу клеток принадлежат все клетки высших организмов. Эукариотические клетки отличаются большим разнообразием форм, что необходимо, в частности, для обеспечения различных специализированных функций. В составе высших организмов эти клетки сосуществуют и взаимодействуют друг с другом различными путями и поэтому не нуждаются в биохимической гибкости и приспособляемости, столь необходимых для прокариотов.

Как показано на рис. 2.2, по степени сложности внутренней структуры эукариоты намного превосходят прокариотические клетки. Для

эукариот характерна высокая степень пространственной организации и дифференциации отдельных элементов клеточной структуры. Внутренний объем клетки разделен на ряд четко ограниченных структурных компонентов. Каждый из этих компонентов имеет свою структуру и функцию, необходимую для нормальной жизнедеятельности всей клетки.

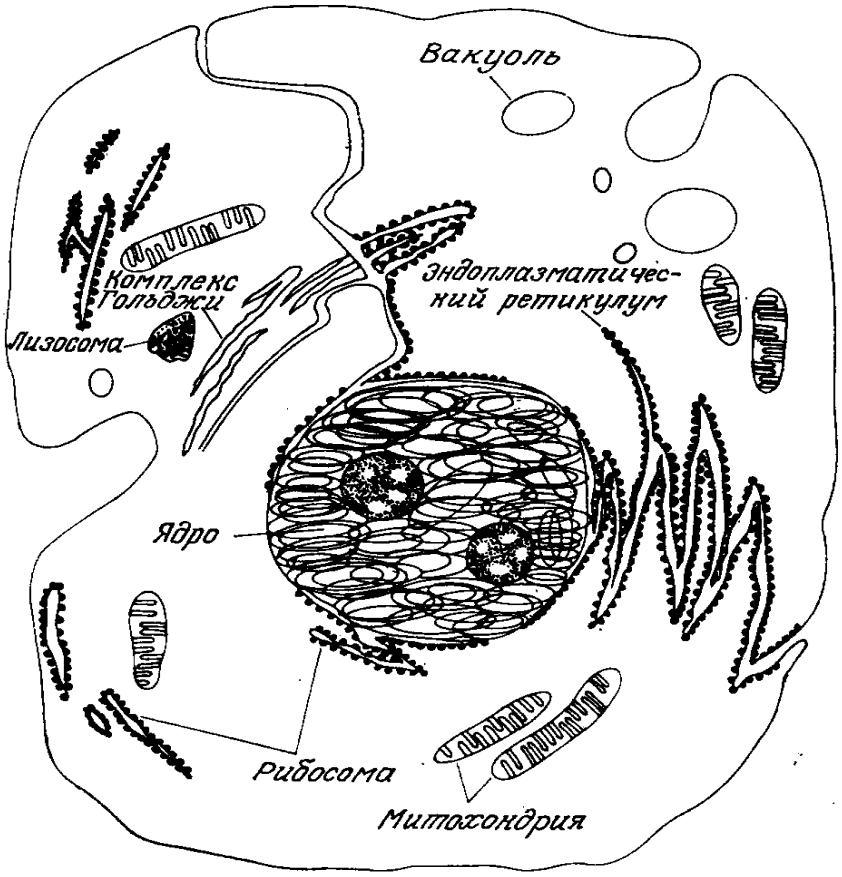


Рис. 2.2. Типичная эукариотическая клетка. Такой идеализированной клетки на самом деле не существует в природе, так как эукариоты существенно различаются по своей организации. Тем не менее, некоторые общие черты и структурные элементы характерны для многих эукариот, поэтому концепция типичной эукариоты в ряде случаев остаётся удобной и полезной

Из рис. 2.2 видно, что клетка окружена плазматической мембраной, аналогичной мембране прокариот. Снаружи эта мембрана может быть защищена клеточной стенкой или оболочкой. Природа других покровных структур клетки зависит от ее типа. Так, клетки высших животных обычно окружены тонкой оболочкой, особые адгезивные свойства которой существенны для связывания клеток друг с другом и последующего образования специализированных тканей и органов (например, печени). Клетки растений, напротив, обычно окружены очень толстой и прочной

стенкой. Стенки отмерших клеток деревьев представляют собой основную составную часть древесины.

В специализации различных структурных элементов эукариот большую роль играют внутриклеточные мембраны. От клеточной мембраны внутрь клетки отходит сложная мембранная система, называемая *эндоплазматическим ретикулумом* или *эндоплазматической сетью.* Ядра эукариот окружены пористыми мембранами. К поверхности большинства элементов эндоплазматического ретикулума прикреплены рибосомы – центры белкового синтеза, о чем уже упоминалось в главе, посвященной прокариотам. Рибосомы последних, однако, несколько меньше рибосом эукариот.

Основной функцией *ядра эукариот* является контроль и регулирование каталитической активности рибосом, причем выделяемые ядром химические посредники не только регулируют скорость химических реакций, но и определяют последовательность присоединения аминокислот при синтезе белка.

Ядро представляет собой один из структурных элементов клетки, окруженной мембранами. Эти специализированные заключенные в мембрану структуры в общем случае называют *органоидами. Митохондрии* – это органоиды с чрезвычайно специализированной и высокоупорядоченной специализированной структурой; митохондрии катализируют реакции, являющиеся основным источником клеточной энергии. В клетках *прототрофов*, которые в качестве первичного источника энергии используют свет, роль основного генератора энергии играют другие органоиды-хлоропласты. Помимо обеспечения клеток энергией хлоропласты и митохондрии выполняют и многие другие биохимические функции.

На рис. 2.2 изображены и другие органоиды – *комплекс Гольджи* (аппарат Гольджи, пластинчатый комплекс), *лизосомы и вакуоли*. В самых общих чертах их функции сводятся к осуществлению некоторых химических реакций и к компартментализации (т.е. к приуроченности к определенным участкам клетки) ряда соединений, обеспечивающих изоляцию последних от остальной плазмы. Процессы компартментализации важны как с точки зрения эффективности протекания реакций, так и с точки зрения предотвращения нежелательных взаимодействий между содержимым органоидов и другими компонентами клетки.

Обнаружение описанных выше типов органоидов в самых различных эукариотах позволило по-новому оценить основные преимущества клеточной теории. Теперь различные стороны жизнедеятельности клеток можно рассматривать как сумму происходящих в органоидах процессов, каждый из которых в свою очередь можно изучать отдельно. Считается, что органоиды одного типа выполняют аналогичные операции и функции

независимо от природы клеток, к которым они принадлежат; пока что не обнаружено исключений из этого правила.

Таким образом, основной путь изучения клетки заключается в определении химического состава, строения и биохимической активности органоидов. Большая часть имеющихся в настоящее время данных о биохимии клетки получена именно таким путем.

2.3. Фракционирование клеток

Основная проблема в изучении свойств определенных органоидов из данного типа клеток заключается в получении достаточного для последующего биохимического анализа количества этих органоидов. Обычно для этой цели выделяют значительное число органоидов из большого числа клеток (из так называемой популяции клеток). Как правило, стандартная методика выделения органоидов включает в себя в качестве первой стадии гомогенизацию суспензии клеток в специальном растворе с помощью трубки с вращающимся пестиком или ультразвука. Таким путем пытаются разрушить клетки, не затрагивая содержащиеся в них органоиды и не нарушая их структуру. Следующая стадия заключается во фракционировании полученной суспензии, которая в идеальном варианте представляет собой смесь выделенных из клеток органоидов.

Как инженеры-технологи, мы знаем, что любой процесс разделения основан на различиях в физических или химических свойствах разделяемых компонентов. Обычный метод фракционирования органоидов клетки базируется на различиях в их физических характеристиках: размере частиц, их форме и плотности.

Например, в применении и интерпретации результатов фракционирования компонентов клеток методом центрифугирования хотя и имеются несомненные успехи, но и имеется ряд ограничений и трудностей. Одна из трудностей характерна для любых работ в области изучения и применения микроорганизмов. Для того, чтобы получить достаточное количество клеток, органоидов, биологически важных молекул и других компонентов клеток, исследователи вынуждены использовать популяцию клеток, т.е. большое число индивидуальных клеток. Обычно принимается, что эта популяция *гомогенна*, или, иными словами, все входящие в ее состав микроорганизмы идентичны. В таких случаях популяция нужна только для увеличения числа этих микроорганизмов с тем, чтобы облегчить дальнейшие экспериментальные исследования.

Однако, обычно входящие в состав популяции микроорганизмы в той или иной степени различны; такую популяцию обычно называют *гетерогенной*. Например, в популяции растущих клеток имеются старые и молодые, большие и малые клетки, часто различающиеся по

биохимическому составу и активности. Даже, если рассматривать одни и те же структурные элементы клеток, то необходимо отметить, что органоиды одного типа, например, митохондрии, находящиеся в одной и той же клетки, также имеют определенные отличия. Поэтому содержащая митохондрии клеточная фракция также представляет собой гетерогенную популяцию. В результате изучения таких смесей определяют, по сути дела, некоторые усредненные характеристики популяции клеток, и, следовательно, найденные параметры будут существенно зависеть от состава популяции.

2.4. Важнейшие типы клеток

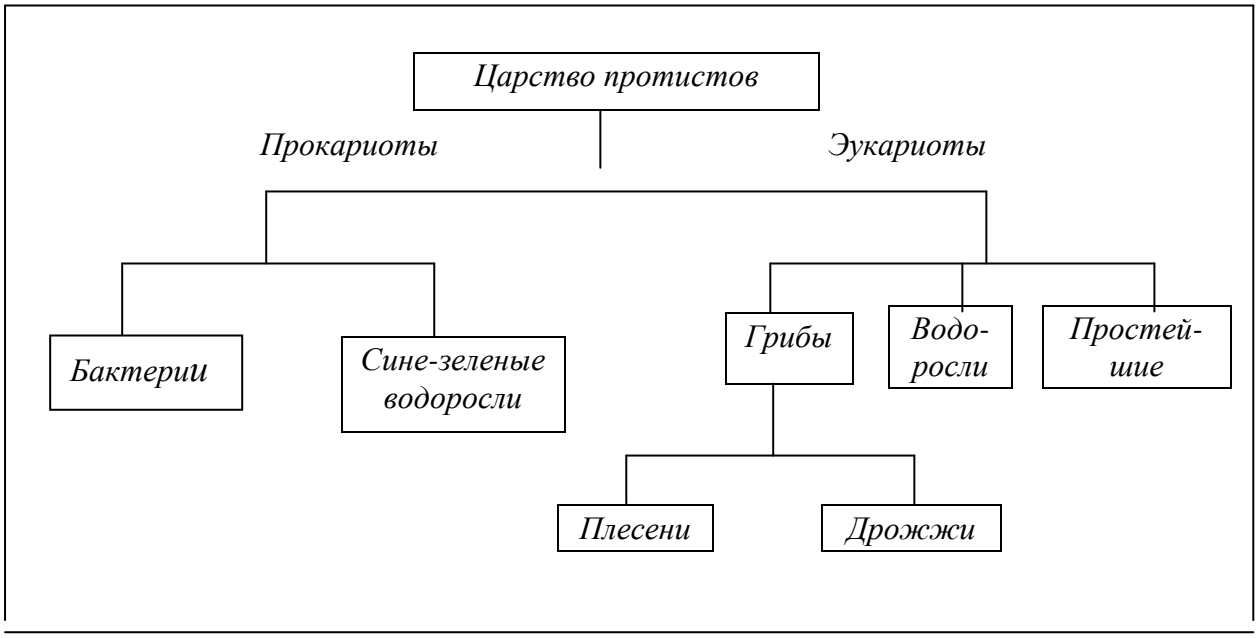
Все живые существа с очень простой биологической организацией по сравнению с растениями и животными относятся по микробиологической классификации к *царству протистов.* К этому царству принадлежат все одноклеточные, а также многоклеточные организмы, построенные из клеток только одного типа, тогда как растения и животные отличаются большим разнообразием типов клеток.

В табл. 2.1 показано деление царства протистов на более мелкие структурные элементы, называемые *таксоны*. Последние различаются рядом характеристик: источниками и способом получения энергии и питательных веществ, скоростями роста и выделения продуктов жизнедеятельности, способами самовоспроизведения, способностью к передвижению и средствами для его осуществления. Немаловажную роль в классификации различных типов микроорганизмов играют и их морфологические различия, т.е. различия в их форме и структуре, так как морфология микроорганизма может в существенной степени влияет на скорость массопередачи питательных веществ и может также в существенной степени определить динамические свойства суспензий, содержащих этот организм.

Искусство биологической классификации назвается *таксономией.* В этой классификации основной единицей является *вид*; организмы одного вида характеризуются высокой степенью близости морфологических и биохимических свойств и в то же время существенно отличаются по этим свойствам от организмов близких видов. Биологический вид обозначается двумя латинскими словами, первое из которых начинается с прописной буквы и обозначает *род организма*, а второе (часто носящее описательный характер) – собственно *вид.* Например, кишечная палочка – очень подробно изученная бактерия, обнаруженная в кишечнике человека, - называется *Escherichia* (наименование рода) *coli* (наименование вида). Латинское название обычно выделяется курсивом; если же из контекста ясно, о каком микроорганизме идет речь, то наименование рода обычно сокращается до первой буквы, например *E. coli.*

Таблица 2.1

Классификация организмов царства протистов



В целях систематизации видов и родов организмов разработана иерархическая схема таксономии, в которой родственные роды объединены в семейства, близкие семейства образуют отряды, объединяющиеся в свою очередь в классы; далее классы сгруппированы в отделы или типы и, наконец, близкие отделы объединены в царства. Например, в табл. 2.1, указаны царство протистов, отдел грибов и класс дрожжей. Часто, однако, различия в микроорганизмах выражены не слишком отчетливо и подобная классификация становится в известной степени искусственной и произвольной, особенно это относится к бактериям и дрожжам.

2.5. Бактерии

Как уже упоминалось в ходе предварительного знакомства с прокариотами, бактерии представляют собой относительно небольшие организмы, обычно заключенные в жесткую оболочку. У многих видов бактерий наружная сторона клеточной стенки покрыта упругой, вязкой оболочкой, называемой капсулой или слизистым слоем. Бактерии представляют собой одноклеточные организмы; морфологически они могут быть разделены на три основные группы: спиралевидные – *Spirilla,* сферические – *Cocci* и палочкообразные – *Bacilli*. Большинство бактерий не способно поглощать световую энергию, может самопроизвольно передвигаться и размножаться путем деления на две дочерние клетки, хотя из всех этих правил известно множество исключений.

Часть бактерий окрашивается на чашках Петри, специальных стеклянных чашечках, где обычно выращиваются микроорганизмы, красителем – кристаллическим фиолетовым в голубой цвет и носит название *грамположительных* в честь исследователя Грама, предложившего подобную классификацию бактерий, другая часть бактерий не окрашивается этим красителем в голубой цвет и носит название *грамотрицатеьных.* Многие бактерии по своим свойствам хорошо коррелируют с этой цветной реакцией, отражающей существенные различия в структуре их оболочек.

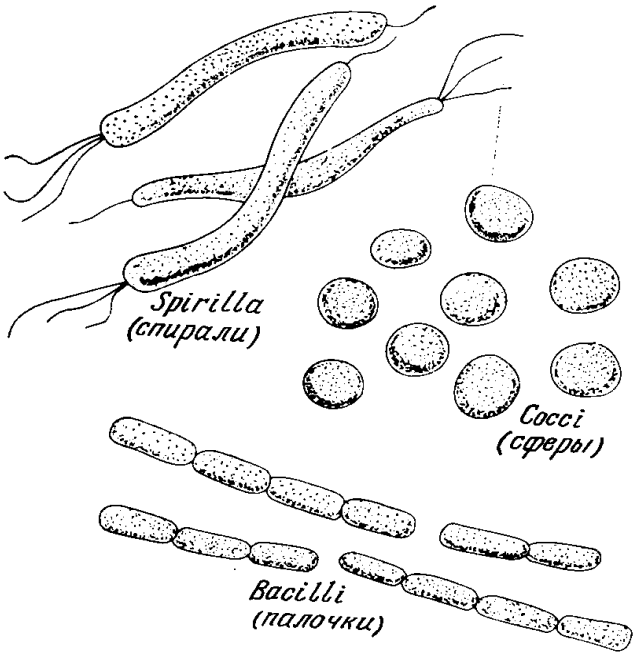


Рис 2.3. Три основных формы бактерий

При промышленном использовании микроорганизмов особенно важен вопрос, обязательна ли подача кислорода в питательную среду. Как уже отмечалось ранее, в *аэробных* процессах для питания микроорганизмов необходима подача кислорода или воздуха. К числу таких процессов относятся практически важные микробиологические производства уксуса, некоторых антибиотиков и добавок к кормам сельскохозяйственных животных. Одна из основных трудностей при разработке технологии подобных процессов, связана с ограниченной растворимостью кислорода в типичных для таких систем водных средах. В *анаэробных* процессах, например в производстве некоторых спиртов или при переработке органических отходов, микроорганизмы с успехом функционируют и в отсутствии кислорода.

Для промышленного использования и контроля бактериального заражения не менее важна способность бактерий образовывать в неблагоприятных условиях так называемые *эндоспоры.* Последние представляют собой «спящую» форму клетки, в которой они без вредных для себя последствий переносят воздействие повышенной температуры, радиации и ядохимикатов. Когда споры оказываются в пригодной для их жизнедеятельности среде, они превращаются в нормально функционирующие клетки. В отличии от споровой формы это нормальное, биологически активное состояние клеток часто называют *вегетативной* формой.

Существуют две основные группы бактерий: спорообразующие и не способные образовывать споры. Как уже отмечалось ранее, споры спорообразующих бактерий весьма устойчивы. Например, аэробные бактерии рода *Bacillus* чрезвычайно широко распространены в природе и легко адаптируются в любых условиях, давая устойчивые споры. С другой стороны, для нормально развивающихся в анаэробных условиях вегетативных форм некоторых видов *Clostridium* кислород летален, однако споры этих бактерий устойчивы к действию кислорода. Другие бактерии, вегетативные формы которых быстро погибают при 45°С, образуют споры, выдерживающие кипячение в воде в течение нескольких часов. Отсюда следует, что если мы хотим убить микроорганизмы нагреванием (*тепловой стерилизацией*), то для уничтожения спорообразующих бактерий необходимы более высокие температуры – обычно кипячение под давлением в автоклавах при температурах выше 120°С.

2.6. Дрожжи

Дрожжи составляют один из важных классов отдела грибов. Грибы, как и бактерии, широко распространены в природе, хотя обычно они живут в почве в относительно менее влажных по сравнению с бактериями регионов. Грибы не способны усваивать энергию солнечного света и, как правило, существуют изолировано в виде отдельных одноклеточных организмов. Несмотря на то, что для большинства грибов характерна довольно сложная морфология, дрожжи легко отличить по внешнему виду – обычно они представляют собой отдельные небольшие клетки длиной от 5 до 30 мкм и шириной от 1 до 5 мкм.

Дрожжи могут размножаться бесполым и половым путями; схема бесполого размножения посредством почкования и деления представлена на рис. 2.4.

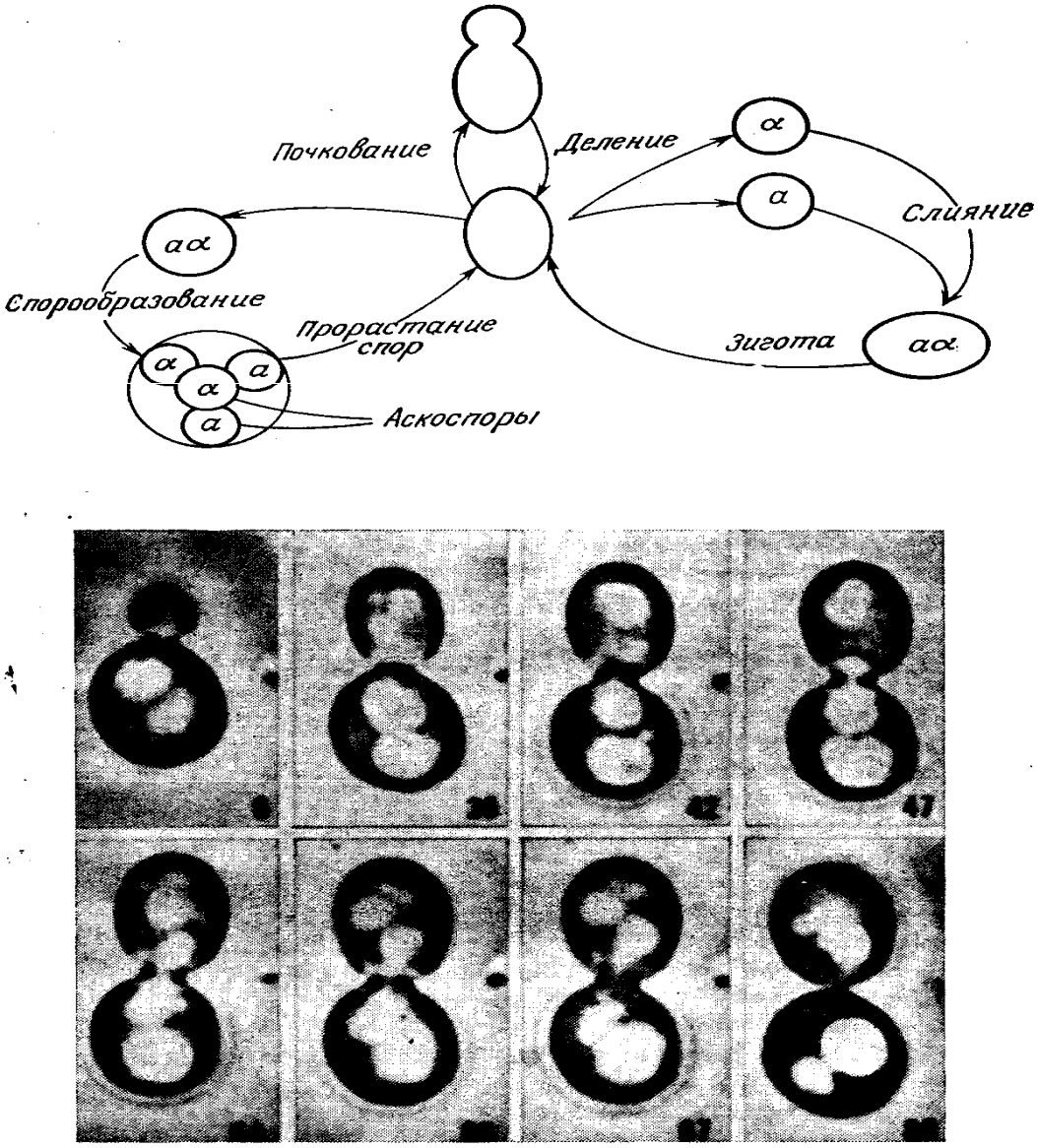


Рис 2.4. На приведённых в нижней части рисунка фотографиях изображён процесс бесполого размножения клетки дрожжей путём почкования. (Числа обозначают время процесса в минутах: 8–36–42–47–52–60–67–80). Как схематически показано в верхней части рисунка, в жизненном цикле дрожжей определённую роль играет и половое размножение

При почковании на родительской клетке сначала начинает расти небольшой отросток. Отделение дочерней клетки от родительской происходит не сразу, благодаря чему становится возможным образование колоний дрожжевых клеток, состоящих из нескольких поколений. В результате деления из одной клетки образуются две новые. Половое размножение дрожжевых клеток также возможно и, как видно из рис. 2.4 осуществляется путем слияния двух *гаплоидных* (имеющих одинарный

набор хромосом) клеток, которое сопровождается разрушением пограничной стенки и образованием *диплоидной* (имеющей два набора хромосом) *зиготы.* Ядро в диплоидной клетке может претерпевать одно или несколько делений, в результате которых образуются *аскоспоры*; каждая из аскоспор в конце концов становится индивидуальной новой гаплоидной клеткой, которая может затем размножаться посредством почкования, деления или половым путем. Аскоспоры, представляющие собой в данном случае закономерный результат размножения этих организмов, не следует путать с рассмотренными выше *эндоспорами*, образующимися в качестве защитной реакции на окружающую среду.

В производстве спиртных напитков дрожжи представляют собой единственно промышленно используемый тип микроорганизмов. Помимо производства пива и вина анаэробные дрожжи применяются для получения в промышленных масштабах технического этилового спирта и глицерина. Как известно, дрожжи также широко используются при выпечке хлеба и как белково-витаминные добавки к кормам для сельскохозяйственных животных.

2.7. Плесени

Плесени – это высшие грибы, обладающие вегетативной структурой, называемой *мицелием.* Как показано на рис. 2.5, мицелий представляет собой сильно разветвленную систему трубок. Внутри этих трубок находится подвижная цитоплазма, содержащая множество ядер. Мицелий может состоять из нескольких типов родственных клеток, длинные, тонкие нити клеток мицелия называют *гифами*. В некоторых случаях мицелий может быть очень плотным. Учитывая необходимость подачи кислорода для нормальной жизнедеятельности плесеней, это может вызвать большие затруднения в их культивировании, поскольку мицелий может оказывать существенное сопротивление массопередаче при перемешивании.

Как и дрожжи, плесени не содержат хлорофилла и обычно не способны передвигаться. Как правило, плесени размножаются спорами половым или бесполовым путем. Свойства спор играют большую роль в классификации грибов.

С промышленной точке зрения наиболее важны плесени *Aspergillus* и *Penicillium* (рис. 2.6).

К числу основных продуктов метаболизма этих микроорганизмов относятся *антибиотики* (продукты жизнедеятельности плесеней, убивающие некоторые микроорганизмы или подавляющие их рост), органические кислоты и биологические катализаторы – *ферменты*.

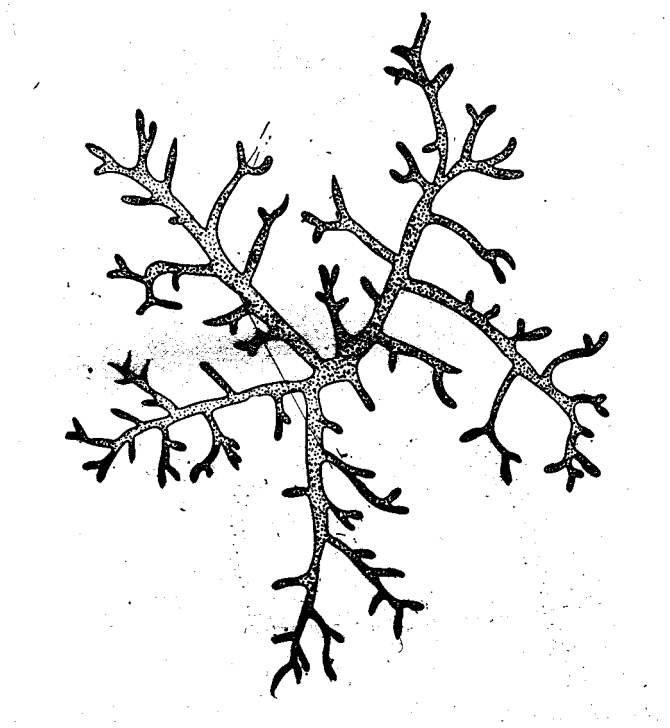


Рис. 2.5. Структура мицелия плесеней. Условия в центре плотного мицелия и в его периферийных могут существенно различаться

Один из штаммов *Aspergillus niger* в нормальных условиях продуцирует щавелевую кислоту, но если питательная среда обеднена фосфатами и ионами некоторых металлов, например меди, железа и магния, то преимущественно образуется лимонная кислота. Эта особенность лежит в основе промышленного биохимического способа производства лимонной кислоты. Таким образом, плесень *A. niger* может служить интересным примером различия в подходах к разработке и оптимизации биохимических и биотехнологических процессов. В биологических системах путем сравнительно небольшого изменения состава питательной среды может быть достигнута значительно большая селективность метаболических процессов.

Еще одно фундаментальное отличие между микробиологическими и небиологическими процессами можно проиллюстрировать на примере пенициллина. Основные успехи в производстве этого антибиотика были достигнуты благодаря получению высокопродуктивных *мутантов* исходного штамма *Penicillium* путем ультрафиолетового облучения его спор. Как уже упоминалось ранее, мутации могут вызываться различными агентами и часто приводят к увеличению выхода нужного продукта метаболизма на несколько порядков. Еще большее значение имеют

мутации в генетической инженерии, о чем будет идти речь в последующих главах.

Прежде чем закончить эту главу, следует кратко упомянуть об *актиномицетах* – группе микроорганизмов, которые обладают свойствами как грибов, так и бактерий. Эти микроорганизмы широко применяются в производстве антибиотиков. Хотя формально актиномицеты относятся к бактериям, по способности образовывать длинные, чрезвычайно разветвленные гифы они напоминают грибы. Процессы производства анибиотиков с использованием актиномицетов и плесеней также имеют много общего. Актиномицеты сближает с бактериями их восприимчивость к заражению одними и теми же вирусами и устойчивость к вирусным заболеваниям.

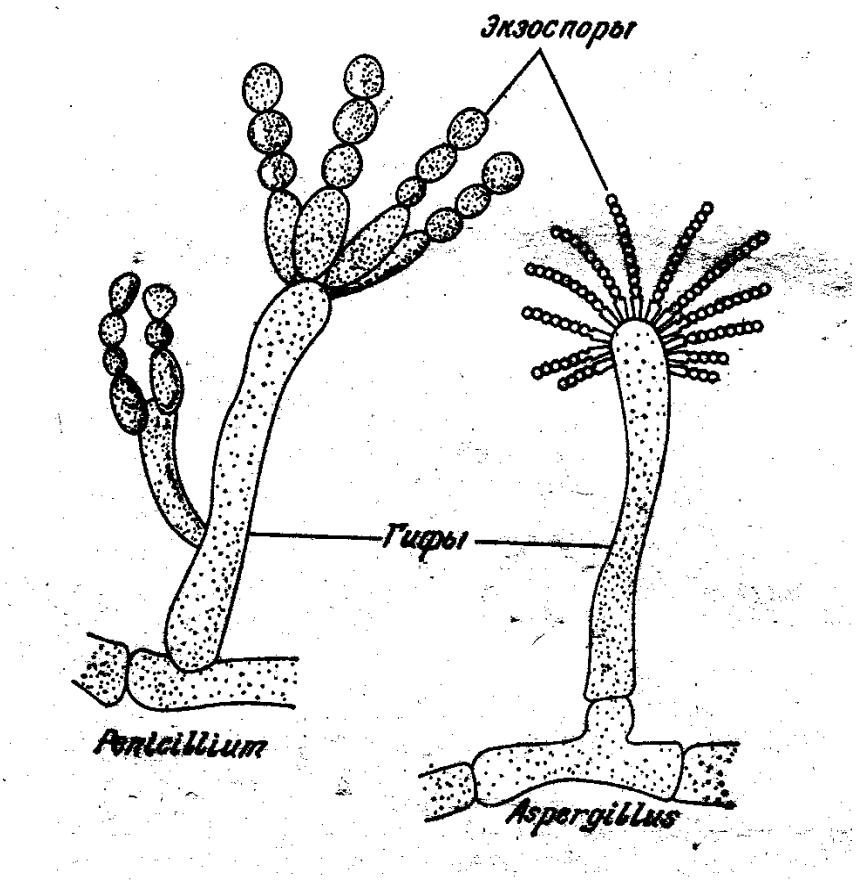


Рис. 2.6. Гифы *Aspergillus* и *Penicillium* двух промышленно важных плесеней

2.8. Водоросли и простейшие

Эти относительно большие эукариоты обладают сложным и высокоупорядоченным строением. *Эвгленовые водоросли,* например, передвигаются при помощи жгутиков, у них нет жесткой оболочки, но

имеется чувствительное к свету пятно, называемое *глазком*. Последнее реагирует на свет и заставляет клетки двигаться к более освещенному месту, что немаловажно для жизнедеятельности этой водоросли, усваивающей, как и большинство других водорослей, световую энергию. Многие *диатомовые* (другой вид водорослей) имеют наружные двухстворчатые оболочки (панцири) разнообразной формы, состоящие в основном из кремнезема. Эти панцири широко используются в промышленности в качестве фильтрующего материала.

Повышенный интерес к водорослям обусловлен их потенциальной ценностью в качестве возможного продукта питания или в качестве добавки к пищевым продуктам. В Японии, например, в настоящее время работает несколько промышленных установок, на которых культивируют водоросли именно для этих целей. Кроме того, в Азии в довольно широких масштабах в пищу употребляют морские водоросли. Последние не являются микроорганизмами и построены из множества однотипных клеток. Как и более простые сине-зеленые водоросли, водоросли-эукариоты выполняют важную функцию в круговороте веществ на земле.

В известном смысле водоросли можно рассматривать как примитивные растения, точно также *простейших*, не способных усваивать солнечную энергию, можно считать примитивными животными. Естественная среда обитания, морфология и активность простейших изменяются в довольно широких пределах. Некоторые *трипаносомы*, например, являются переносчиками серьезных заболеваний, включая африканскую сонную болезнь, или трипаносомиаз. С другой стороны, простейшие *Trichonympha* населяют кишечник термитов и помогают им переваривать древесину. Амебы не обладают какой-либо определенной формой и постоянно меняют свои внешние очертания, в то время как для солнечников (*Heliozoa*) характерно наличие внутреннего скелета и определенной формы.

Хотя простейшие не используются в настоящее время в промышленном масштабе ни для производства клеточной биомассы, ни для синтеза продуктов их жизнедеятельности, они наряду с микроорганизмами играют большую роль в биологической очистке сточных вод. С точки зрения микробиологии эти процессы, широко применяющиеся во всем мире в городах и на больших промышленных предприятиях, поразительно сложны. Бытовые и промышленные сточные воды представляют собой сложную смесь, в состав которой входят различные питательные вещества и самые разнообразные микроорганизмы; поэтому для обработки стоков необходимо большое количество протистов. Эти организмы конкурируют в потреблении питательных веществ, уничтожают друг друга и взаимодействуют многими другими путями, характерными для небольшой экологической системы.

2.9. Растительные и животные клетки

Многие вакцины и другие биохимикаты продуцируются в окружающую среду при культивировании животных клеток в реакторах, т.е. при выращивании клеток вне организма животного. Совершенствование методов выращивания тканевых клеток и разрабатываемые в последние годы методы трансформации животных и растительных клеток открывают новые многообещающие пути для их значительно более широкого промышленного использования. Как выяснилось в последнее десятилетие тканевые клетки можно выращивать почти в таких же реакторах, какие используются для культивирования микроорганизмов, получивших название *биореакторы*.

Если часть ткани животного, обычно получаемую путем разрушения межклеточных связей, поместить в соответствующую питательную среду, то большинство типов клеток погибнут в течение нескольких дней, недель или месяцев. Другие клетки в этих условиях, напротив, будут размножаться и дадут так называемую *первичную линию клеток.* В ряде случаев эти клетки удается *пассивировать*, т.е. перенести в свежую питательную среду, где снова происходит размножение клеток, приводящее ко *вторичной линии клеток.* Некоторые вторичные клетки, выдерживающие, по всей вероятности, неограниченное число пассажей, называют *стабильной, перманентной или установившейся линией клеток.*

Многие линии клеток получены из эпителиальных тканей, например кожного покрова, соединительных тканей, крови и лимфы ряда животных, в том числе человека, хомяка, обезьяны и мыши. Как показали исследования, культуры некоторых тканевых клеток можно выращивать в виде суспензий в жидкой среде, но для роста большинства линий клеток необходимо их закрепление на твердой поверхности, что налагает серьезные ограничения на масштабы промышленного производства вакцин и других биологических продуктов на основе культур животных клеток.

Метод культивирования на микроносителях, который будет подробно рассмотрен в следующих главах, позволил значительно повысить производительность биореакторов, предназначенных для выращивания культур клеток, растущих только на подобных носителях.

Культуры некоторых клеток растительного происхождения можно выращивать также в виде *каллюса* (нароста недифференцированной ткани растения на твердой питательной среде) или в виде суспензии агрегированных клеток. Поскольку растения продуцируют множество практически важных физиологически активных соединений, в том числе душистые вещества, красители, лекарственные средства, опиаты, использование культур растительных клеток является весьма перспективной областью биотехнологии. Как показывают исследования,

культуры растительных клеток могут служить весьма специфическими биокатализаторами многих химических реакций, а также являются весьма полезными для сельского хозяйства, например для регенерации целого растения.

Следует отметить, что можно культивировать также тканевые клетки и некоторых насекомых и других беспозвоночных, однако подобное культивирование еще достаточно ограничено.

Глава 3

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЖИЗНИ

Любой организм должен синтезировать все химические соединения, необходимые для жизнедеятельности и размножения клеток, поэтому, прежде чем приступать к изложению дальнейших основ биотехнологии, необходимо ознакомится с реагентами, продуктами реакций, катализаторами и химическими регуляторами, которые принимают участие в сложной сети химических превращений, происходящих в клетке.

Настоящая глава посвящена главным образом изучению высокомолекулярных соединений, преобладающих в клетке, а также соответствующих небольших мономерных молекул, из которых построены эти полимеры. Полимерные соединения клетки делятся на четыре основных класса: жиры и липиды, полисахариды (целлюлоза, крахмал и т.д.), носители информации – полидезоксирибонуклеиновые и полирибонуклеиновые кислоты (ДНК и РНК соответственно), а также белки. Физико-химические свойства этих соединений важны как для понимания функций клетки, так и для рационального проектирования технологических процессов с участием живых клеток.

В зависимости от строения различные биологические полимеры целесообразно подразделять, также как и химические, на гомополимеры и сополимеры. *Биологические гомополимеры* построены из мономерных единиц одного типа. В этом случае полимеры, содержащие мономерные звенья одного типа, отличаются друг от друга прежде всего молекулярной массой и степенью разветвленности полимерных цепей.

Основная функция гомополимеров в клетке заключается в создании *структурных элементов*, обладающих механической прочностью, химической инертностью и достаточной проницаемостью. Кроме того, в виде гомополимеров в клетках часто хранятся запасы *питательных веществ,* например, глюкоза может храниться в виде биополимера гликогена, своеобразного резервного полисахарида клетки, обеспечивающего снижение молярной концентрации раствора в 10 000 раз или даже в большей степени. Полимер является удобной формой хранения питательных веществ в тех случаях, когда клетке необходимо создать их

избыток без существенного изменения внутриклеточного осмотического давления, которое может разорвать клетку.

Биологические сополимеры построены из нескольких различных мономерных звеньев, число которых может достигать 20. Каждый из таких полимеров имеет определенную молекулярную массу и характерный мономерный состав. Более того, остатки мономеров соединены в строго определенной, генетически запрограммированной последовательности.

Биологические соединения, построенные из таких элементов, как углерод, кислород, азот, водород, фосфор, сера, отличаются не только большим разнообразием, но и высокой устойчивостью. Как правило, они очень медленно взаимодействуют друг с другом, с водой или другими компонентами клетки. Химические реакции с участием таких соединений ускоряются биологическими катализаторами – особыми белками, называемыми *ферментами.* Таким образом, клетка может регулировать как природу, так и скорость происходящих в ней химических реакций путем изменения концентраций ферментов.

Фосфор и сера входят в состав органического вещества всех живых существ, хотя и в относительно небольших количествах. В клетках также всегда присутствуют ионы натрия, калия, магния, кальция и хлора, а также следовые количества марганца, железа, кобальта, меди и цинка, которые необходимы для активации определенных ферментов. Для нормальной жизнедеятельности некоторых организмов требуются также ничтожные количества *микроэлементов*: бора, алюминия, ванадия, молибдена, йода, кремния, фтора и олова. В общем случае для нормальной жизнедеятельности организмов необходимы по меньшей мере 24 различных химических элемента.

Клетки живут в водной среде. Вода обладает целым рядом весьма необычных свойств (высокой теплотой испарения, высокой диэлектрической проницаемостью, способностью образовывать при диссоциации кислоты и основания, склонностью к образованию водородных связей), благодаря которым она является чрезвычайно важным реагентом, участвующим во многих катализируемых ферментами реакций. Кроме того, свойства, проявляемые биополимерами, в значительной степени зависят от свойств того растворителя, в среде которого они находятся. На этом принципе основаны, в частности, многие процессы разделения как биополимеров, так и мономеров.

3.1. Липиды

Липидами называют биоорганические соединения, растворимые в неполярных растворителях (бензоле, хлороформе, эфире и т.д.) и практически нерастворимые в воде. Из такого определения следует, что липиды могут иметь различное химическое строение и выполнять

различные биологические функции. Их относительно низкая растворимость в водных средах является причиной того, что липиды встречаются в основном в неводных биологических фазах, в особенности в клеточных мембранах и мембранах органоидов. К липидам относятся прежде всего жиры, представляющие собой резервы биологического топлива, а также важные промежуточные продукты биологических процессов. Липиды также входят в состав более сложных соединений, например липопротеинов и липосахаридов, которые опять-таки располагаются в основном в биологических мембранах клеток и во внешних оболочках некоторых вирусов.

3.2. Жирные кислоты и родственные липиды

В состав липидов входят насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты. Насыщенные жирные кислоты представляют собой относительно простые вещества общей формулы $CH_3(CH_2)_nCOOH$. В процессе биосинтеза углеводородная цепь жирных кислот строится из идентичных мономерных звеньев с двумя атомами углерода, поэтому жирные кислоты можно рассматривать как не несущие информации короткие биополимеры с концевой карбоксильной группой. В биологических системах *n* обычно принимает четные значения от 12 до 20.

Ненасыщенные жирные кислоты образуются при замене насыщенной (–C–C–) связи на двойную связь (–C=C–). Например, олеиновая кислота является ненасыщенным аналогом стеариновой кислоты (n=16):

$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$
стеариновая кислота	олеиновая кислота

Углеводородная цепь придает этим соединениям гидрофобные свойства, но карбоксильная группа в высшей степени гидрофильна, поэтому, когда жирная кислота находится на границе раздела фаз воздух – вода, небольшое ее количество образует ориентированный мономолекулярный слой (монослой), в котором полярные карбоксильные группы связаны водой, а углеводородные цепи направлены в сторону воздушной фазы (рис. 3.1).

Это явление лежит в основе механизма действия моющих средств, представляющих собой в основном соли жирных кислот. Образование мыльного монослоя значительно снижает поверхностное натяжение на границе воздух – вода, что резко повышает способность раствора смачивать и очищать загрязненные места. Структурная формула типичного моющего средства может быть записана следующим образом

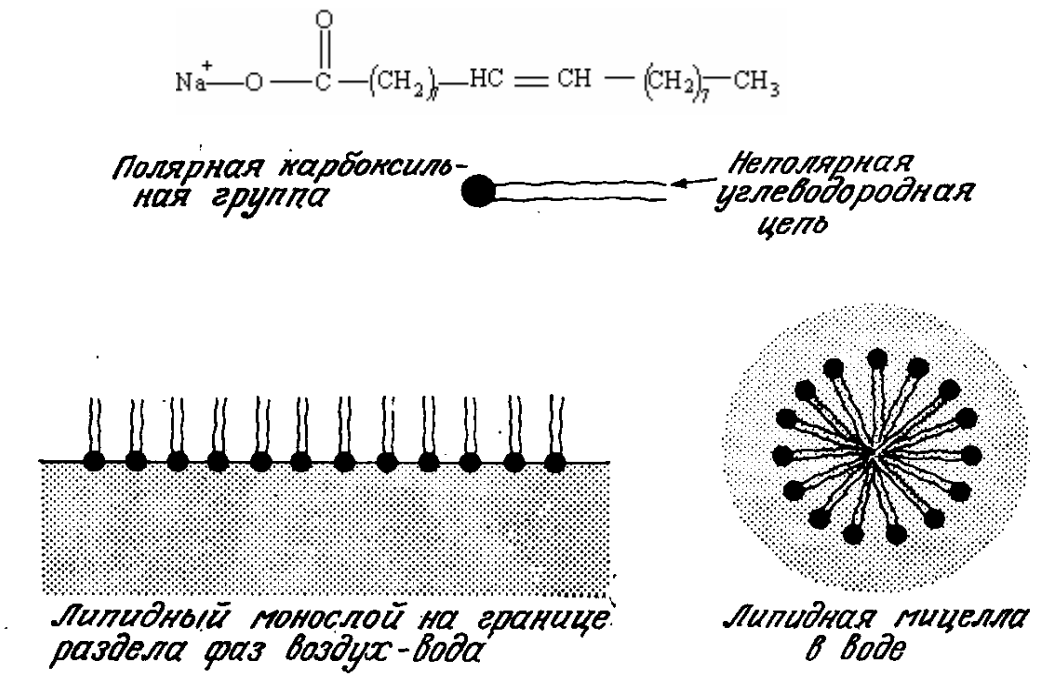
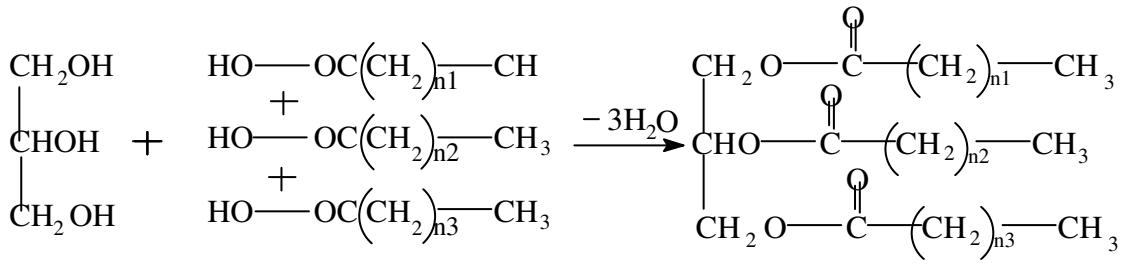


Рис. 3.1. Некоторые устойчивые агрегированные состояния жирных кислот в воде

Такого рода гидрофобно–гидрофильные молекулы липидов обладают очень невысокой растворимостью; повышение концентраций раствора выше того предела, который необходим для создания монослоя, приводит к агрегированию избытка растворенного вещества в виде сравнительно больших упорядоченных структур, называемых *мицеллами* (рис. 3.1). Движущей силой этого процесса является уменьшение общей свободной энергии системы в процессе формирования мицелл из раствора. Обычно структура мицелл диктуется увеличением числа энергетически выгодных контактов между группировками одинаковой степени гидрофобности (гидрофильности) и соответствующим уменьшением числа взаимодействия между гидрофильными и гидрофобными группировками.

Известно, что аналогичные взаимодействия между гидрофобными и гидрофильными участками одного биополимера является причиной существования полимерной цепи в одной предпочтительной конформации.

Жиры, выполняющие важную функцию внутриклеточного топлива, представляют собой сложные эфиры, образующиеся при конденсации жирных кислот с глицерином



В щелочной среде при нагревании жиры и другие липиды гидролизуются до глицерина и солей жирных кислот (мыла) – именно таким путем мыла были впервые получены из животных жиров. Подобная реакция, обратная приведенной выше схеме синтеза жиров, в пищеварительном тракте животных осуществляется при температуре тела и катализируется особыми ферментами, способными расщеплять жиры. Микроорганизмы также продуцируют подобные ферменты, называемые *липазами*, роль которых заключается в гидролизе некоторых жиров на более мелкие фрагменты, способные затем проникать в клетку через клеточные мембраны.

Описанные выше липиды носят название омыляемых липидов, так как они превращаются в щелочном растворе, как это было только что описано, в мыла. Омыляемые липиды в свою очередь делятся на простые и сложные.

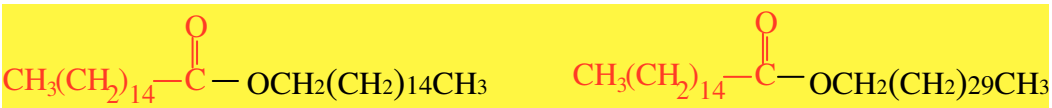
К простым липидам относятся воска, жиры и масла, т.е. те липиды, в результате гидролиза которых образуются два вида химических соединений: спирты и жирные кислоты. К сложным липидам прежде всего относятся фосфолипиды, сфинголипиды и гликолипиды, при гидролизе которых образуются несколько классов химических соединений.

Другой класс липидов не гидролизуется ни щелочью, ни кислотой и поэтому носит название класса неомыляемых липидов. К этому классу относятся многие жирорастворимые витамины, например витамин А, стероиды и другие схожие по строению липиды. Остановимся сначала на кратком рассмотрении свойств простых и сложных омыляемых липидах.

3.3. Омыляемые липиды

Воска – сложные эфиры высших жирных кислот и высших одноатомных спиртов. Они образуют защитную смазку на коже человека и животных и предохраняют растения от высыхания. Примером может служить цетиловый эфир пальмитиновой кислоты – главный компонент спермацета, воскоподобного вещества, заключенного в особом мешке в голове кашалота и широко применяющегося в качестве основы для наиболее дорогих кремов и мазей. Другой эфир пальмитиновой кислоты – мирицилпальмитат – содержится в пчелином воске.

Воска

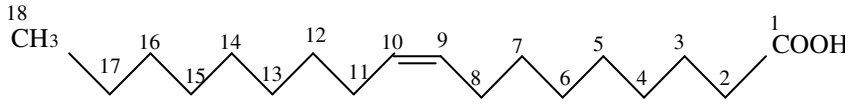


Цетилпальмитат Мирицилпальмитат

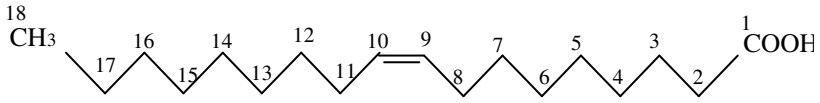
Жиры и масла (нейтральные жиры, глицеролипиды, триацилглицерины) – глицериновые эфиры высших жирных кислот. Как уже отмечалось выше, в организме человека и животных нейтральные жиры играют роль структурного компонента клеток или роль «жирового депо». Их энергетическая ценность примерно в 2 раза больше, чем у белков и углеводов. Известно, что избыточное содержание триацилглицеринов в крови наряду с содержанием холестерина – факторы, указывающие на определенную предрасположенность человека к атеросклерозу.

В природе, за редкими исключениями, встречаются только полные эфиры глицерина, т.е. триацилглицерины. Твердые триацилглицерины называют жирами, жидкие – маслами. Простые триацилглицерины содержат остатки одинаковых кислот, смешанные – различных. В триацилглицеринах животного происхождения преобладают остатки насыщенных жирных кислот. Эти соединения, как правило, твердые вещества. Напротив, жидкие растительные масла содержат в основном остатки ненасыщенных жирных кислот.

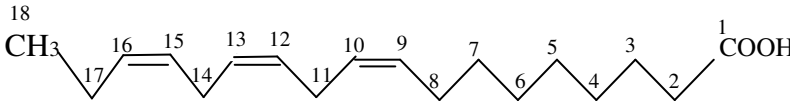
Большинство жирных кислот, входящих в пищевые жиры, имеют *цис*– конфигурацию, причем линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты считаются незаменимыми жирными кислотами, так как они не синтезируются в организме человека и многих животных и должны поступать из вне, обычно с приемом пищи. Структурные формулы этих кислот приведены ниже



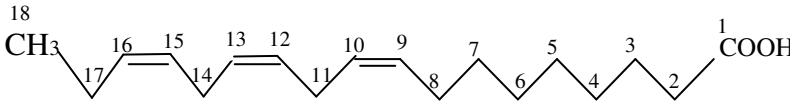
Олеиновая (*цис*-9-октадеценовая) кислота



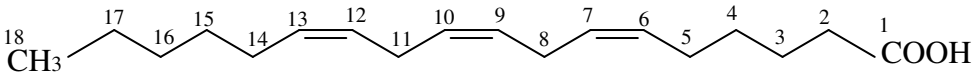
Линолевая (*цис, цис*-9,12-октадеценовая) кислота



α-Линоленовая (*цис, цис, цис*-9,12,15-октадекатриеновая) кислота



γ-Линоленовая (*цис, цис, цис*-6,9,12-октадекатриеновая) кислота



Арахидоновая (*цис, цис, цис, цис*-5,8,11,14-эйкозантетраеновая) кислота

Природные жиры и масла представляют собой смеси смешанных триацилглицеридов. Их количественной характеристикой служит процентное содержание отдельных кислот, а также йодное число – мера ненасыщенности жиров. Йодное число соответствует количеству граммов йода, которое может присоединиться к 100 г вещества. Состав природных жиров и масел и их йодные числа варьируют в достаточно широких пределах. Например, в сливочном масле и молоке содержится значительное количество жирных кислот с короткой цепью, имеющие высокую степень усвояемости организмом человека. В льняном масле преобладает линолевая (62%), а в оливковом масле – олеиновая (84%) кислоты.

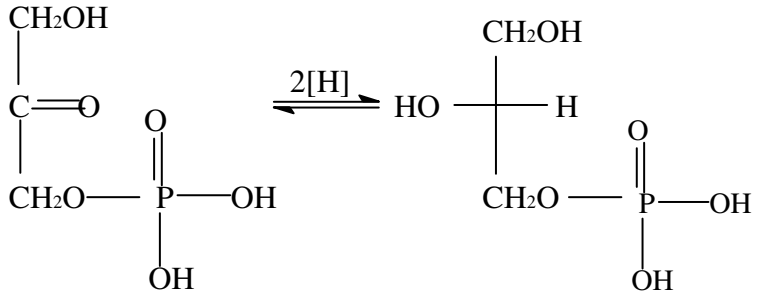
Триацилглицерины, выделенные из разных органов одного и того же организма, могут значительно отличаться по своему жирнокислотному составу. В частности, в подкожной жировой клетчатке больше насыщенных, а в жирах печени – ненасыщенных жирных кислот. Жирнокислотный состав различных жиров и масел обычно определяют с помощью газовых или газожидкостных анализаторов после переэтерификации жиров и получении летучих метиловых эфиров жирных кислот.

3.4. Сложные липиды

Омыляемые сложные липиды обычно делят на три большие группы – фосфолипиды, сфинголипиды и гликолипиды. Некоторые природные липиды трудно классифицировать, так как они содержат группировки, позволяющие отнести их одновременно к нескольким группам.

Фосфолипиды – это липиды, отщепляющие фосфорную кислоту при гидролизе. К ним относятся глицерофосфолипиды и некоторые сфинголипиды. Фосфолипиды характеризуются достаточно высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот.

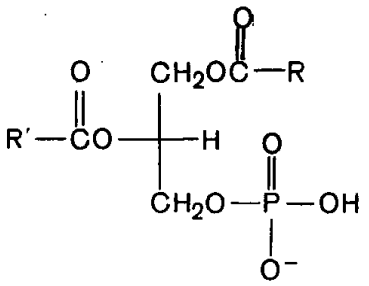
Глицерофосфолипиды – производные глицеро-3-фосфата, главный липидный компонент клеточных мембран. Они сопутствуют жирам в пище и служат источником фосфорной кислоты, необходимой для жизни человека. Глицеро-3-фосфат содержит ассиметрический атом углерода и поэтому может существовать в виде двух стереоизомеров. Природные глицерофосфолипиды имеют одинаковую конфигурацию и являются производными L-глицеро-3-фосфата, образующегося в процессе метаболизма из фосфата дигидроксиацетона при участии биокатализатора – фермента *глицерофосфатдегидрогеназы*



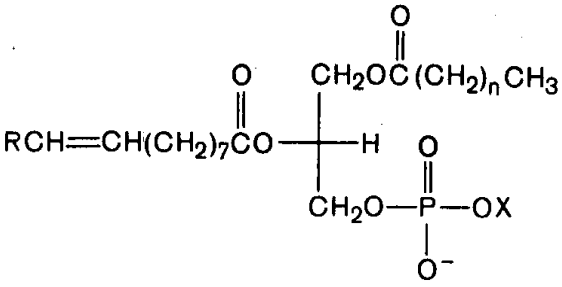
Фосфат дигидроксиацетона L-глицеро-3-фосфат

Среди глицерофосфатидов наиболее распространены *фосфатиды* – сложные производные L-фосфатидовых кислот. L-фосфатидовые кислоты представляют собой этерифицированный жирными кислотами по спиртовым гидроксильным группам L-глицеро-3-фосфат.

Как правило, в природных фосфатидах в положении 1 глицериновой цепи находится остаток насыщенной, в положении 2 – ненасыщенной кислот, а один из гидроксилов фосфорной кислоты этерифицирован многоатомным спиртом или аминоспиртом. В условиях организма (pH = 7,4) оставшийся свободным гидроксил фосфорной кислоты и другие ионогенные группировки в фосфатидах ионизированы



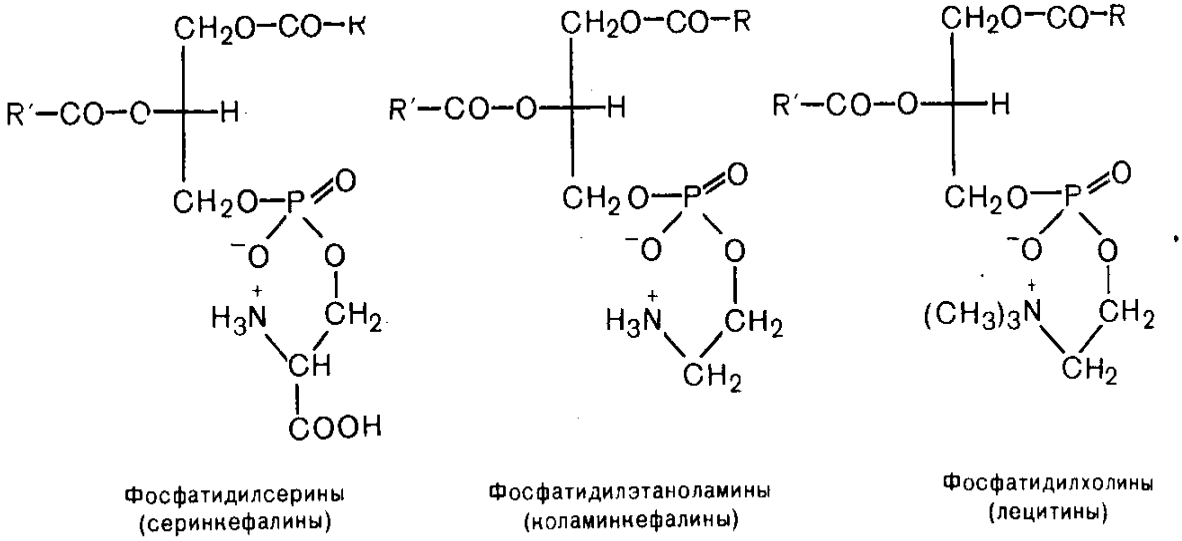
L-фосфатидовые кислоты



Фосфатид (общая структура)

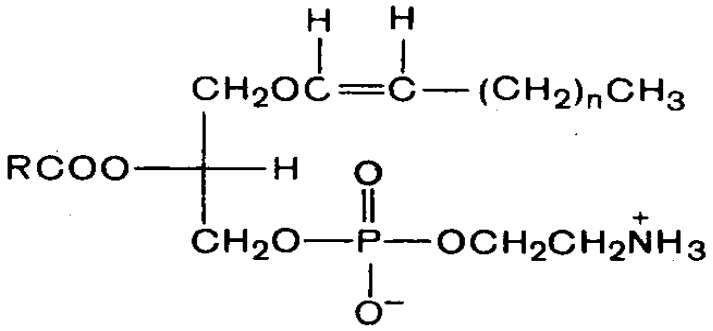
Примером фосфатидов могут служить *фосфатидилсерины, фосфатидилэтаноламины и фосфатидилхолины* – соединения, в которых фосфатидиновые кислоты этерифицированы по фосфатному гидроксилу серином, этаноламином и холином соответственно.

Эти аминоспирты взаимосвязаны между собой, поскольку этаноламин и холин могут образовываться в ходе метаболизма из аминокислоты – серина путем декарбоксилирования и последующего метилирования.



Вместо аминоспирта в качестве спиртового компонента ряд фосфатидов содержит остатки многоатомных спиртов – инозита, глицерина и т.д.

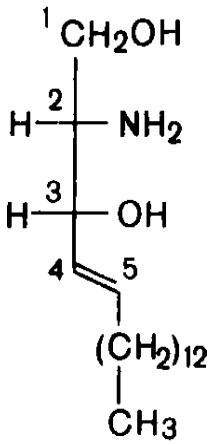
Менее распространены по сравнению со сложноэфирными глицерофосфолипидами липиды с простой эфирной связью, в частности *плазмалогены.* Они содержат остаток винилового спирта, связанного простой эфирной связью с С-1 атомом L-глицеро-3-фосфата, как, например, плазмалогены с фрагментом этаноламина:



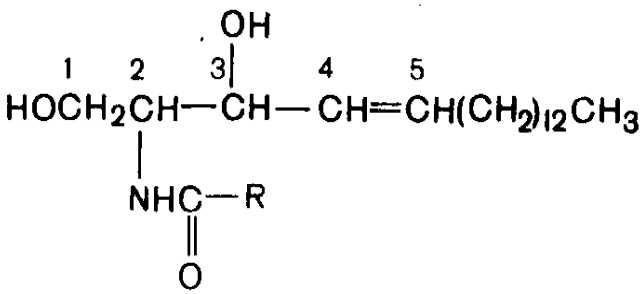
L- фосфатидальэтаноламины (n=9–15)

Плазмалогены составляют до 10% от общего количества липидов центральной нервной системы.

Сфинголипиды – структурные аналоги глицерофосфолипидов, где вместо глицерина используется *сфингозин* – ненасыщенный длинноцепочечный двухатомный аминоспирт. Двойная связь в последнем имеет *транс*-конфигурацию, а ассимитрические атомы С-2 и С-3 – D-конфигурацию. Примером сфинголипидов служат *церамиды* – N-ацильные производные сфингозина, аминогруппа в которых ацилирована жирной кислотой.

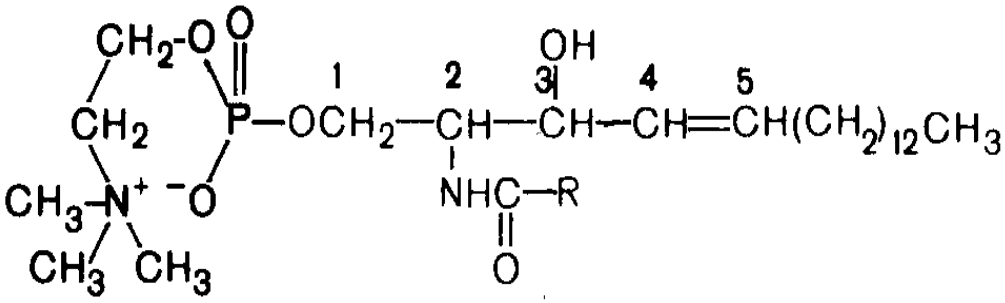


Сфингозин



Церамид

Важную группу сфинголипидов составляют *сфингомиелины*, впервые обнаруженные в нервной ткани. В сфингомиелинах гидроксил у С-1 церамида ацилирован фосфохолиновой группировкой, поэтому их также можно отнести и к фосфолипидам.



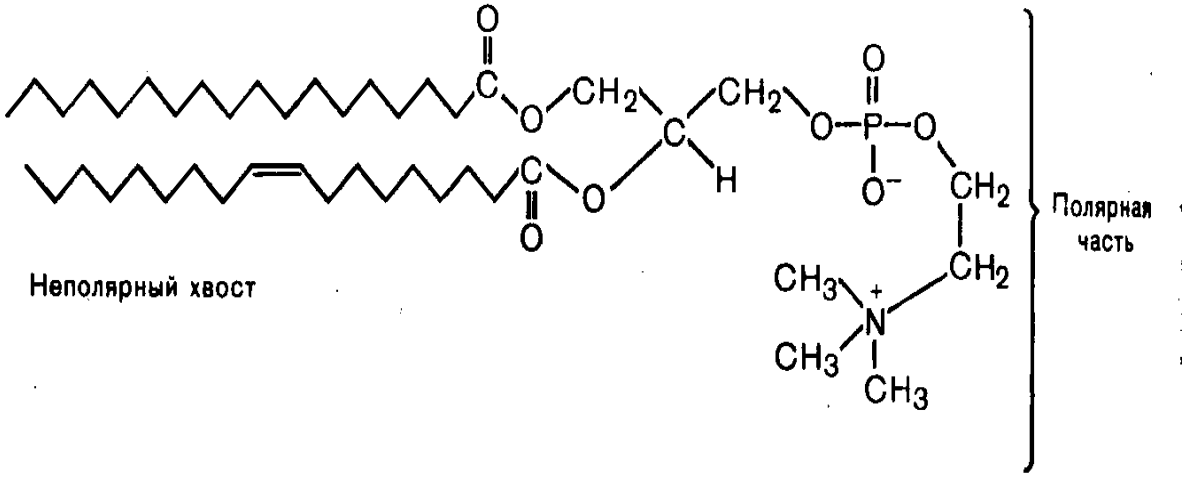
Сфингомиелин

Гликолипиды включают углеводные остатки, чаще D-галактозу, и не содержат фосфорной кислоты и связанных с ней азотистых оснований. Типичные представители гликолипидов – *цереброзиды* и *ганглиозиды* – сфингосодержащие липиды (их можно поэтому считать и сфинголипидами). В цереброзидах, в заметных количествах входящих в состав оболочек нервных клеток, остаток церамида связан с D-галактозой или D-глюкозой β-гликозидной связью.

Ганглиозиды – богатые углеводами сложные липиды, впервые выделенные из серого вещества мозга. В структурном отношении ганглиозиды сходны с цереброзидами, отличаясь тем, что вместо моносахарида они содержат сложный олигосахарид.

Характерная особенность сложных липидов, как уже отмечалось ранее, их *бифильность*, обусловленная наличием неполярных гидрофобных и высокополярных ионизированных гидрофильных группировок. В фосфатидилхолинах, например, углеводородные радикалы жирных кислот образуют два неполярных «хвоста», а карбоксильная, фосфатная и холиновая группы – полярную часть.

Гликолипиды включают углеводные остатки, чаще D-галактозу, и не содержат фосфорную кислоту и связанных с ней азотистых оснований. Типичные представители гликолипидов – цереброзиды и ганглиозиды являются сфингосодержащими липидами (их можно поэтому считать и сфинголипидами). В цереброзидах, в заметных количествах входящих в состав оболочек нервных клеток, остаток церамида связан с D-галактозой или D-глюкозой β-гликозидной связью.



Фосфатидилхолин (лецитин)

Сложные липиды, впервые выделены из серого вещества мозга. В структурном отношении ганглиозиды сходны с цереброзидами.

На границе раздела фаз такие соединения действуют как превосходные эмульгаторы. В составе биомембран, ограничивающих живые клетки и их внутренние органелы, липидные компоненты обеспечивают высокое электрическое сопротивление мембраны, ее непроницаемость для ионов и полярных молекул и проницаемость для неполярных веществ. В частности, большинство анестезирующих препаратов отличается хорошей растворимостью в липидах, что позволят им проникать через мембрану нервных клеток.

В состав клеточных мембран входят в основном белки и липиды, среди которых преобладают фосфолипиды, составляющие 40 – 90% от общего количества липидов в мембране. Строение биомембраны интенсивно изучается в настоящее время. В одной из известных моделей клеточная мембрана рассматривается как липидный бислой. В таком бислое углеводородные хвосты липидов за счет гидрофобных взаимодействий удерживаются друг возле друга в вытянутом состоянии во внутренней полости, образуя двойной углеводородный слой. Полярные группы липидов располагаются на внешней поверхности бислоя.

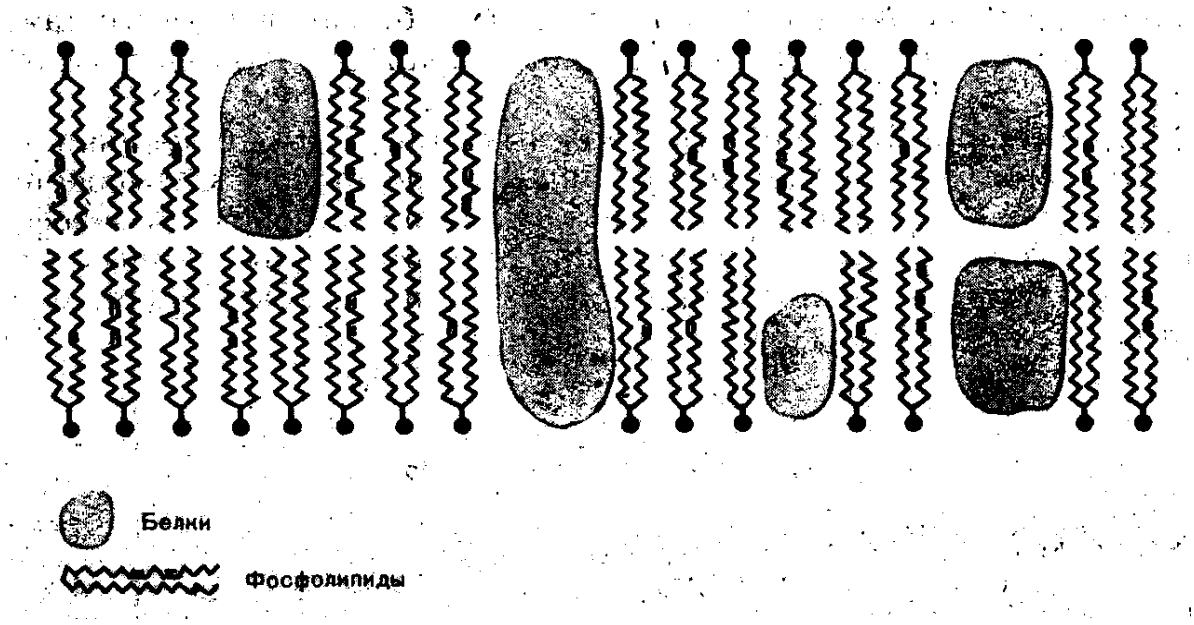


Рис. 3.2. Строение клеточной мембраны

Дополнением к рассмотренной модели является жидкостно-мозаичная модель биомембраны, предполагающая, что мембранные белки встроены в жидкую липидную бислойную основу таким образом, что их гидрофобные участки погружены во внутреннюю полость мембраны, а изолированные остатки аминокислот находятся на ее поверхности.

3.5. Неомыляемые липиды

К неомыляемым липидам, как уже говорилось ранее, относятся органические соединения, не гидролизующиеся в кислых или щелочных растворах, такие как жирорастворимые витамины, стероиды и терпены. Учитывая тот факт, что терпены подробно рассматриваются в курсе органической химии, мы кратко остановимся на отдельных характеристиках жирорастворимых витаминов и стероидов.

Как известно, *витаминами* называют органические вещества, небольшие количества которых необходимы для нормальной жизнедеятельности клеток. Незаменимыми называют те органические соединения, которые сам организм не может синтезировать. При их отсутствии в питании клетка погибает. Понятно, что водорастворимые витамины, например витамин С (аскорбиновая кислота), не являются липидами. В то же время витамины А, Е, К и D не растворяются в воде, но растворимы в органических растворителях, поэтому их обычно формально относят к липидам.

Интерес к микроорганизмам и пищевым продуктам как источникам витаминов обусловлен тем обстоятельством, что к числу незаменимых (или считающихся незаменимыми) для детей и взрослых относятся водорастворимые витамины: тиамин, рибофлавин, никотиновая кислота, пантотеновая кислота, биотин, фолиевая кислота, холин, а также липидные витамины А, D, Е, и К.

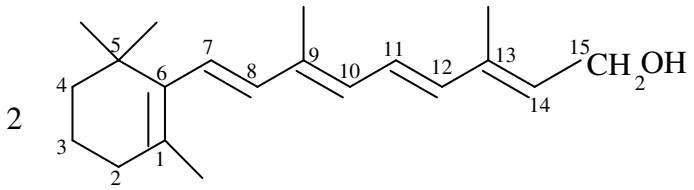
Многие из этих соединений могут синтезироваться различными микроорганизмами. Дрожжи, например, продуцируют эргостерол – предшественник витамина D_2 (кальциферола), превращающийся в него под действием солнечного света. Жирорастворимый витамин К синтезируется микроорганизмами в пищеварительном тракте животных и человека. Этот пример является прекрасной иллюстрацией взаимной помощи, оказываемой одним видом организмов другому (так называемого комменсализма). Известно, что некоторые водорастворимые витамины необходимы для перевода ряда ферментов в активную форму.

Остановимся более подробно на свойствах жирорастворимых витаминов группы Ф, Е и К, а также на простагландинах, которые в последнее время также как и жирорастворимые витамины причисляют к низкомолекулярным биорегуляторам липидной природы.

Витамины группы А считаются факторами роста. Их недостаток в организме приводит к похуданию, высыханию роговицы глаза (куриной слепоте), понижает сопротивляемость организма к различным инфекциям.

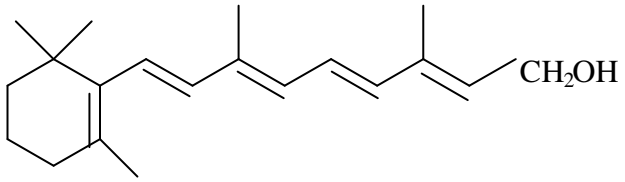
Синтез витамина A_1, ретинола, происходит в живых клетках из β-каротина по ниже приведенной схеме

β-Каротин C_{40}



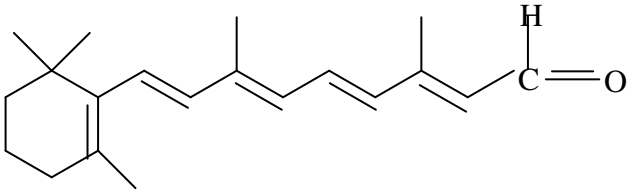
C_{20} Ретинол (витамин A_1)

Роль ретинола в процессе зрительного восприятия достаточно хорошо изучена в настоящее время. В организме он окисляется в альдегид 11-транс-ретиналь, который под действием фермента ретинальизомеразы превращается в 11-цис-ретиналь, а затем связывается с белком палочек сетчатки глаза опсином в иминосоединение с образованием светочувствительного пигмента родопсина. При поглощении света в результате фотоизомеризации ретинальный компонент родопсина переходит в 11-транс-ретиналь, его конформация существенно изменяется, и он отделяется от опсина. Эта реакция служит пусковым механизмом, обеспечивающим возбуждение палочек сетчатки глаза.



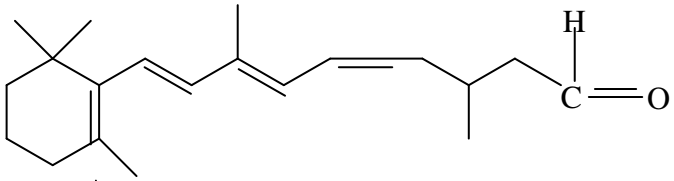
Ретинол

[O]



Ретинальизомераза

11-транс-ретиналь



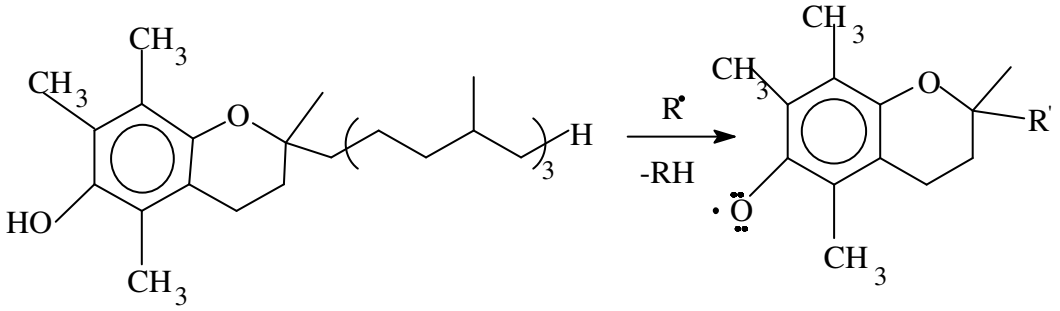
11-*цис*-ретиналь

опсин $\xrightarrow{H_2O}$ Родопсин

В отличие от витаминов группы А, непосредственно относящихся к терпенам, в структуре витаминов групп Е и К присутствуют еще и ароматические фрагменты.

Витамины группы Е, так называемые токоферолы, содержатся в растительных маслах. Их функции пока не вполне ясны. По-видимому, они служат антиоксидантами по отношению к ненасыщенным липидам, ингибируя процесс пероксидазного окисления последних.

Среди витаминов этой группы наиболее важным представителем является витамин Е или α-токоферол. Он представляет собой производное двухатомного фенола гидрохинона с изопреновой боковой цепью, связанной одновременно с ароматическим кислородом одной из гидроксильных групп и соседним атомом углерода бензольного кольца. Остальные атомы водорода бензольного кольца замещены на метильные группы. Последние частично или полностью отсутствуют в *β*-, *δ*-, или γ-токоферолах.

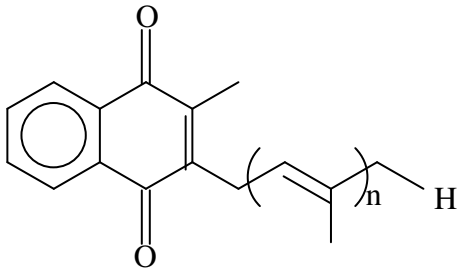


Витамин Е (α-токоферол) Феноксидный радикал α-токоферола

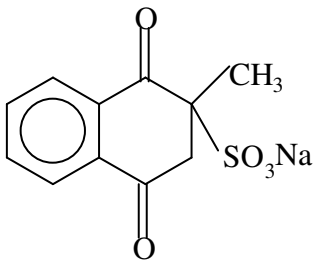
Антиокислительная функция токоферолов определяется их способностью связывать появляющиеся в клетках активные свободные радикалы (участники пероксидазного окисления липидов) в относительно устойчивые и поэтому не способные к продолжению цепи феноксидные радикалы.

Витамины группы К необходимы для обеспечения нормальной свертываемости крови (антигеморрагический фактор). Они являются производными 1,4-нафтохинона и содержат изопреноидную боковую цепь.

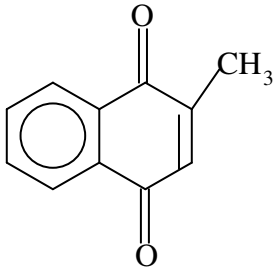
Существуют два семейства витаминов этой группы: филлохиноны – витамины K_1, встречающиеся в растениях, и менахиноны – витамины K_2, имеющиеся у животных и бактерий.



Витамин K_2
(менахиноны n=4,5)



Викасол

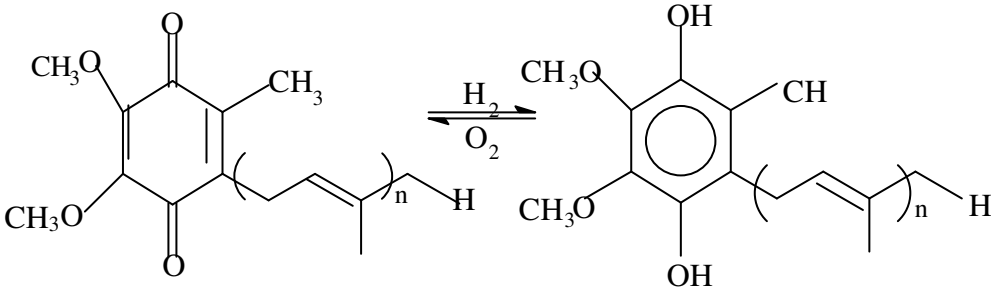


2-метил-1,4-нафто-
хинон (менадион)

Филлохиноны отличаются от хинонов лишь наличием одной двойной связи в изопреновом фрагменте, ближайшем к кольцу. В лечебной практике применяется синтетический водорастворимый аналог витаминов группы К – 2,3-дигидро-2-метил-1,4-нафтохинон-2-сульфонат натрия, викасол, повышающий способность крови к свертыванию.

Для проявления биологической активности витаминов данной группы важно наличие метильного заместителя во 2-ом положении хинонового кольца. Об этом свидетельствует высокая К-витаминная активность 2-метил-1,4-нафтохинона – менадиона. Возможно, в организме менадион претерпевает превращение в соединения с изопреноидной боковой цепью.

Близки по структуре витаминам групп Е и К – убихиноны (в переводе означает «вездесущие хиноны»). Они присутствуют в липидной фракции всех клеточных мембран и принимают участие в окислительно-восстановительных процессах. Сопровождающихся переносом электронов. В приведенной ниже формуле убихинонов, которые также называют коферментом *Q* , число *n* варьирует от 6 до 10. С химической точки зрения эти соединения – производные 1,4-бензохинона, содержащие изопреноидную боковую цепь. Кроме того, в хиноновом кольце присутствуют метоксигруппы, а по соседству с изопреноидной группировкой (как в витаминах К) – метильная группа.

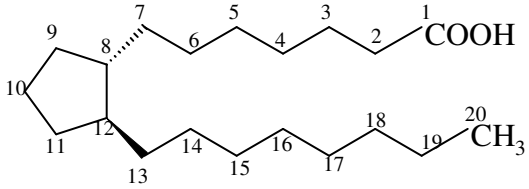


Убихиноны (кофермент *Q*, *n* = 6–10) Восстановленные убихиноны

В организме убихиноны могут легко и обратимо восстанавливаться в гидрохиноны, что и определяет их участие в процессе переноса электронов.

Простагландины. Простагландины относятся к одному из наиболее интересных классов низкомолекулярных биорегуляторов. Они обладают чрезвычайно высокой биологической активностью и широким спектром действия. Единственным местом их образования первоначально считали предстательную железу (простату) – отсюда они и получили свое название. В настоящее время простагландины в малом количестве найдены в большинстве тканей млекопитающих.

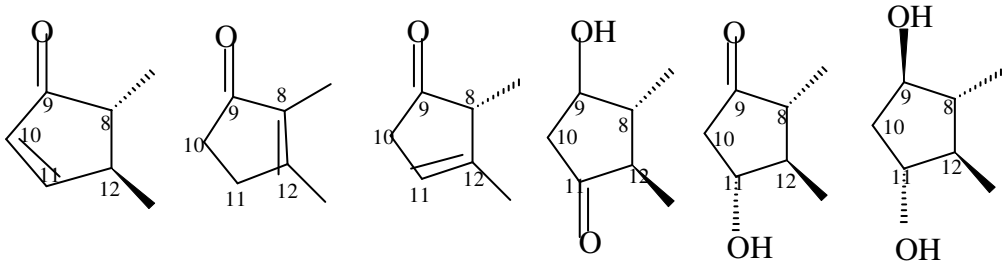
С химической точки зрения, простагландины – функционально замещенные жирные кислоты C_{20}, которые можно рассматривать как производные несуществующей в природе, но полученной синтетическим путем, простановой кислоты.



Простановая кислота

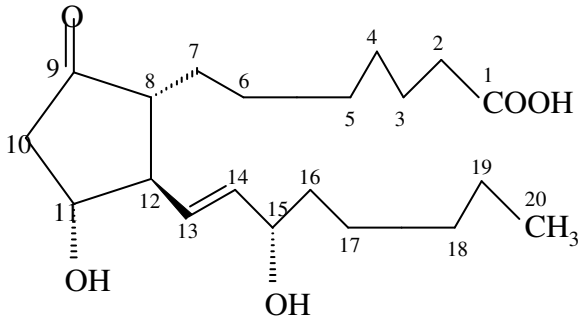
Скелет простановой кислоты в простагландинах включает одну, две или три двойные связи, одну или две гидроксильные группы, а также может содержать карбонильную группу.

В зависимости от природы и положения заместителей в циклопентановом кольце простагландины (ПГ) обозначают буквами A, B, C, D, E и F.



ПГA ПГB ПГC ПГD ПГE ПГF

Каждая группа простагландинов далее по числу двойных связей в боковых цепях делится на три серии, как это показано ниже на примере простагландинов группы E.



Простагландин Е

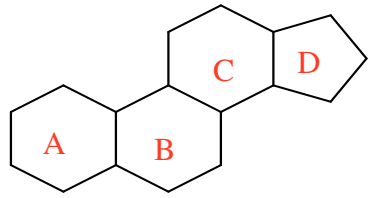
ПГЕ1 – одна двойная связь транс-конфигурации; ПГЕ2 – дополнительно цис-С-5 – С-6 двойная связь, т.е. всего две двойные связи. ПГЕ3 – дополнительно к ПГЕ2 цис-С-17 – С-18 двойная связь, т.е. всего три двойные связи в боковой цепи.

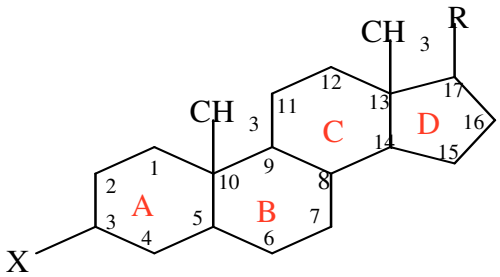
Стабильные простагландины относятся к типам Е и F. Предшественником большинства природных простагландинов является арахидоновая кислота. Все простагландины относятся к сильнодействующим биологически активным веществам. Они расширяют кровеносные сосуды, ингибируют свертывание крови и выделение желудочного сока, стимулируют работу кишечника, легких и бронхов, активируют синтез гликогена в печени. Отмечается их явное влияние на процессы нервного возбуждения, половой цикл у особей женского пола. Так как простагландины вызывают сокращение матки, они могут быть использованы для стимулирования родовой деятельности или предотвращения беременности.

3.6. Стероиды

Стероиды широко распрастранены в природе и выполняют в организме разнообразные функции. К настоящему времени известно около 20 000 стероидов, более 100 из них применяется в медицине.

Стероиды имеют циклическое строение. В основе их структуры лежит скелет стерана (гонана, циклопентанопергидрофенантрена), состоящий из трех конденсированных циклогексановых колец (А, В и С) в нелинейном сочленении и циклопентанового кольца (D). Общая структура стероидов и принятая нумерация атомов в стеране приведены ниже.



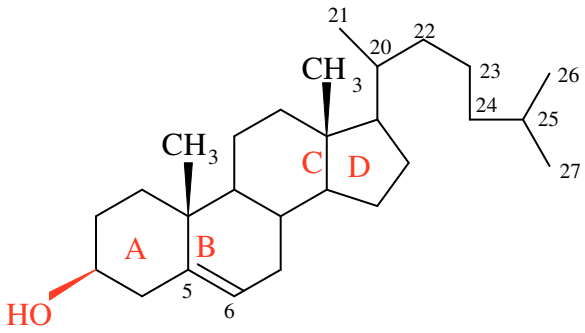


Стеран
(Циклопентанопергидрофенантрен)

Общий скелет стероидов
(X = OH, OR, OCH_3)

Характерная особенность большинства природных стероидов – наличие кислородсодержащего заместителя у С-3, «ангулярных» метильных групп С-18 и С-19, а также алифаического заместителя R у С-17. По величине углеродной цепи этого заместителя стероиды делятся на соответствующие группы, о наиболее важных из которых будет сказано ниже.

Стерины. Как правило, клетки очень богаты стеринами. В основе структуры стеринов лежит скелет углеводорода холстана, алифатический радикал R у С-17 которого включает 8 атомов углерода.

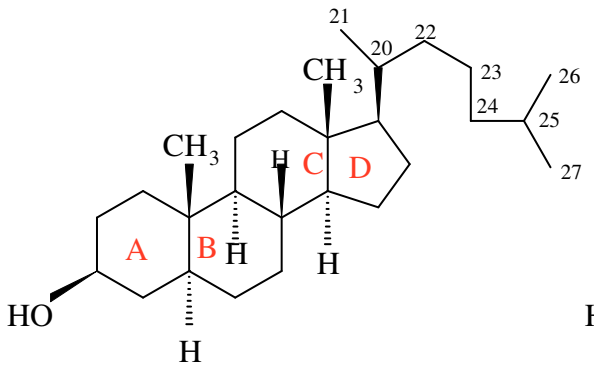


Холестерин

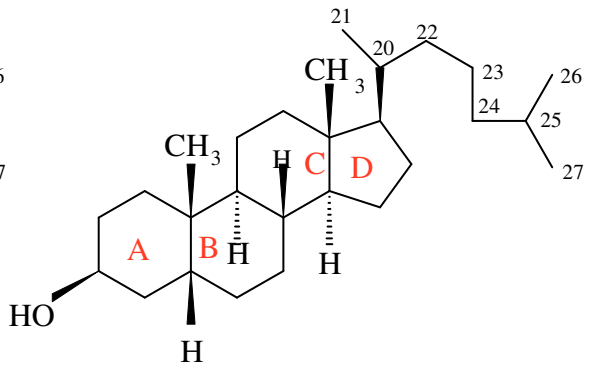
В качестве обязательного заместителя стерины содержат гидроксильную группу при С-3, т.е. являются вторичными спиртами, поэтому в их названии часто присутствует окончание – ол.

Примерами служат встречающиеся в животных клетках холестанол, относящийся к 5α-стероидам, холестерин, а также образующийся из холестерина в кишечнике и присутствующий поэтому в фекалиях копростанол (5β-стероид). Гидроксильная группа во всех трех стероидах имеет β-конфигурацию.

Стерины – предшественники желчных кислот и стероидных гормонов в организме. Холестерин (холестерол, холистен-5-ол-3β) – наиболее распространенный представитель стеринов. Он присутствует практически во всех животных липидах, крови и желчи. Особенностью его структуры является наличие двойной связи в кольце В между положениями С-5 и С-6. Восстановление этой двойной связи приводит к двум стереоизомерам – холестанолу и капростанолу.



Холестанол (3β-OH, 5α-H)

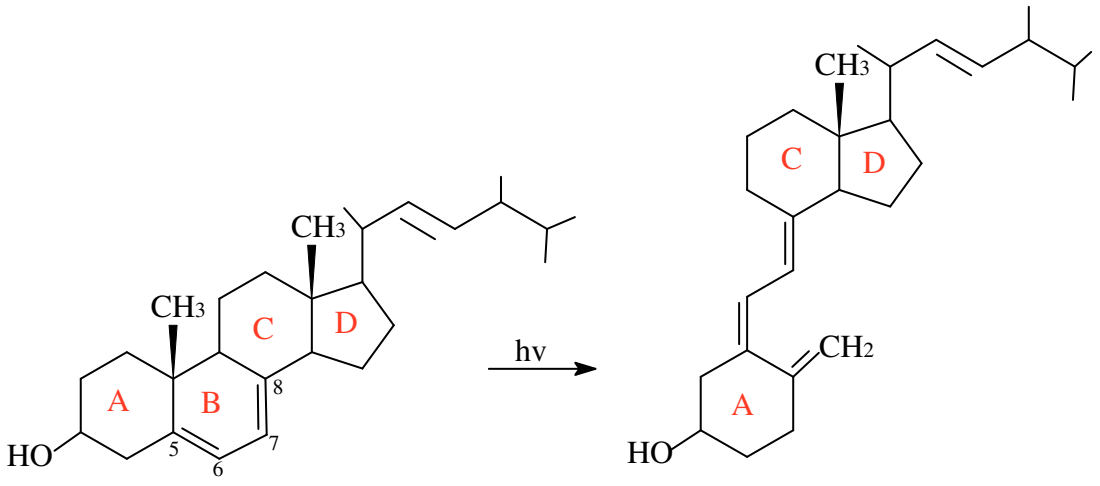


Копрастанол (3β-OH, 5β-OH)

Из общего количества холестерина, содержащегося в организме (около 250 г при массе тела 60 – 70 кг), только около 20 % его поступает с пищей. Основное количество холестерина синтезируется в организме из уксусной кислоты. Нарушение обмена холестерина приводит к его отложению на стенках артерий и, как следствие, уменьшению эластичности сосудов (атеросклерозу). Кроме того, он накапливается в виде желчных камней.

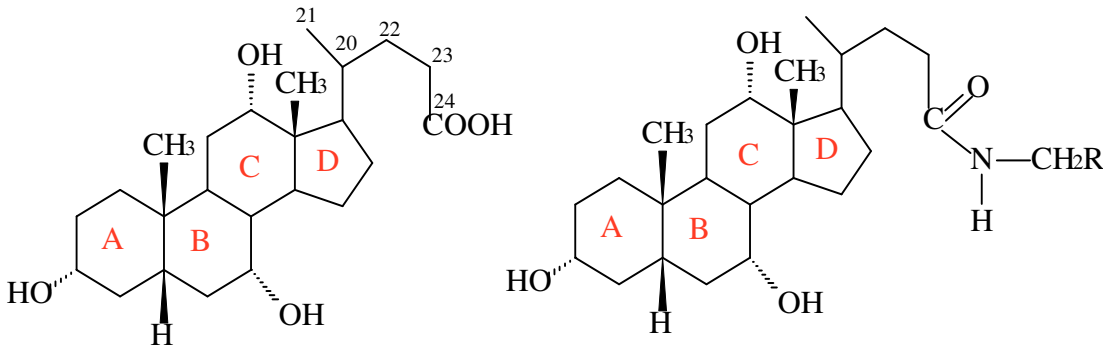
При облучении УФ-светом некоторых стеринов, например встречающихся в бактериях и дрожжах эргостерина (эргостерола), как уже отмечалось ранее, происходит размыкание кольца В и образование продуктов, относящихся к витаминам группы D (антирахитические). Они

содержатся помимо микроорганизмов также в яичном желтке, молоке, сливочном масле и рыбьем жире.



Эргостерин Кальциферол (витамин D_2)

Желчные кислоты. В печени стерины, в частности холестерин, превращаются в желчные кислоты. Алифатическая боковая цепь у С-17 в желчных кислотах, производных углеводорода холана, состоит из 5 атомов углерода и включает концевую карбоксильную группу. Из желчи человека выделены четыре кислоты, которые получили название холевых кислот. Наиболее распространенная среди них – сама холевая кислота. Все гидроксильные группы в ней имеют *α*- расположение, а кольца А и В – *цис*-сочленение.



Холевая кислота (3 α-OH, 5 β-H, 7 α-OH, 12 α-OH)

Гликохолевая (R = COOH) и таурохолевая (R = CH_2SO_3H) кислоты

Другие холевые кислоты отличаются отсутствием одной или двух гидроксильных групп у С-7 или С-12. Желчные кислоты находятся в

организме обычно в виде амидов по карбоксильной группе (посредством пептидной связи к ним присоедены остатки аминокислот – глицина или таурина). Натриевые и калиевые соли этих соединений обладают поверхностно-активными свойствами. Эмульгируя жиры пищи, они улучшают их усвоение, а также активируют фермент липазу, катализирующую гидролиз жиров.

Стероидные гормоны. Гормонами обычно называют биологически активные вещества, образующиеся в результате деятельности желез внутренней секреции и принимающие участие в регуляции обмена веществ и физиологических функций в организме.

Согласно химической классификации все известные гормоны можно разделить на три основных группы:

Аминокислоты и продукты их трансформации. В эту группу включают тироксин и родственные гормоны щитовидной железы, а также катехоламины – адреналин и норадреналин.

Пептиды и белковые гормоны. Они составляют наиболее представительную группу гормонов, в которую входят некоторые олигопептиды (вазопрессин), простые белки (гормон роста – соматотропин, инсулин) и сложные белки – гликопротеины, в частности пролактин стимулирующий развитие молочных желез.

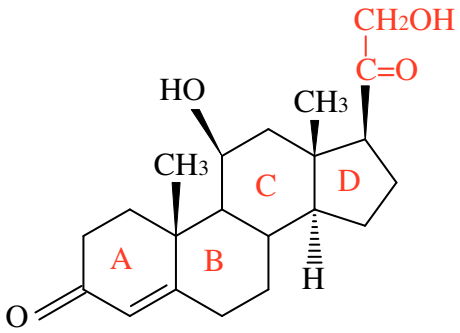
Производные стероидов. К ним относятся гормоны коркового вещества надпочечников, или кортикостероиды, мужские и женские половые гормоны.

В настоящем разделе мы остановимся только на последней группе гормонов, о первых двух речь будет идти в последующих главах.

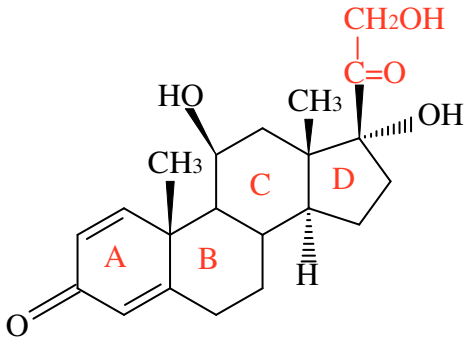
Кортикостероиды (всего их около 40) образуются в корковом веществе надпочечников и регулируют углеводный и солевой обмен. Их боковая цепь у С-17 включает два атома углерода в виде гидроксикетонной группировки. Примерами могут служить кортикостерон и преднизолон, важной структурной характеристикой которых является система α, β-ненасыщенного кетона в кольце А.

Кортикостерон действует как антагонист инсулина, повышая содержание глюкозы в крови. Преднизолон – синтетический стероид, по действию превосходящий свои природные аналоги. Оба этих соединения используются для лечения ревматизма, бронхиальной астмы, воспалительных процессов кожи.

Половые гормоны вырабатываются половыми органами и регулируют половые функции. К их числу относятся женские (гестагены и экстогены) и мужские половые гормоны.

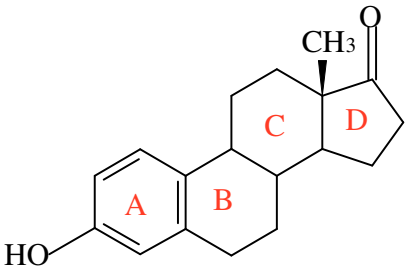


Кортикостерон

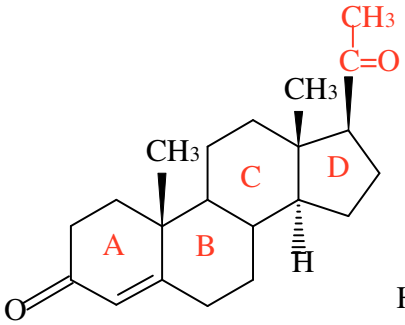


Преднизолон

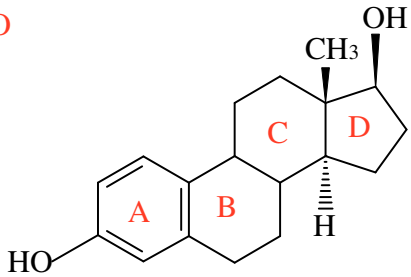
Гестагены, или гормоны беременности, образуются в желтом теле яичников. Они, как и кортикостероиды, являются производными прегнана. Наибольшей активностью среди них обладает прогестерон, боковая цепь которого представляет собой ацетильную группу.



Эстрон



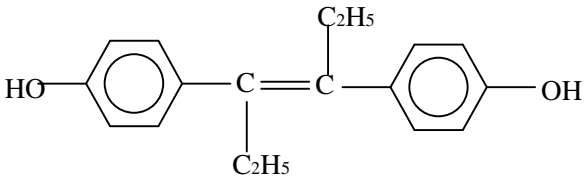
Прогестерон



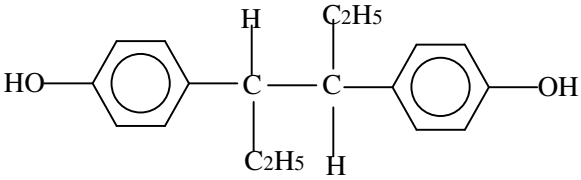
Эстрадиол

Эстрогены контролируют менструальный цикл у женщин. Наиболее важны экстрон и экстрадиол, производные углеводорода экстрана. Отличительный признак их структуры – наличие ароматического кольца А, а также отсутствие боковой цепи у С-17 и метильной группы у С-10. Эстрон – первый половой гормон, выделенный в чистом виде.

Широкий поиск синтетических эстрагенов привел к получению соединений, обладающих мощной экстрогенной активностью. К таким препаратам относятся диэтилстильбэстрол и продукт его гидрирования синэстрол. Эти гормоны одно время широко использовались в сельском хозяйстве для увеличения привеса сельскохозяйственных животных, однако в последнее время установлено, что они оказывают неблагоприятное действие на здоровье человека при их попадании в организм вместе с едой. Тем не менее, в лечебных дозах диэтилстильбэстрол применяется в аптечной практике.

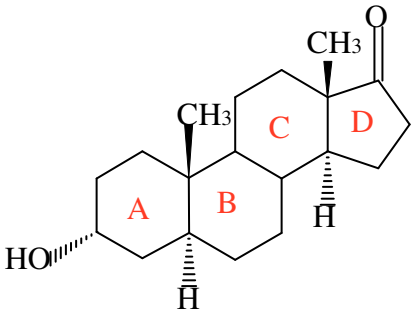


Диэтилстильбэстрол

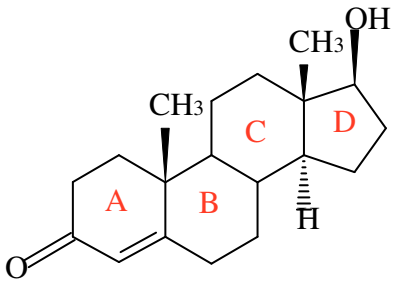


Синестрол

Андрогены стимулируют развитие вторичных мужских половых признаков и выработку спермы. Главные мужские половые гормоны – андростерон и более активный тестостерон. В основе структуры лежит скелет углеводорода андростана. Боковая цепь при С-17 у этих кортикостероидов, как и у эстрогенов, отсутствует, но сохраняются обе «ангулярные» метильные группы.



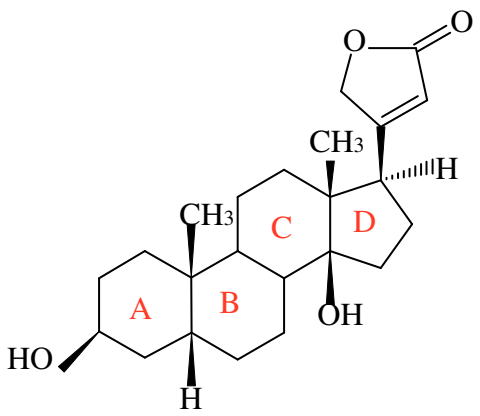
Андростерон



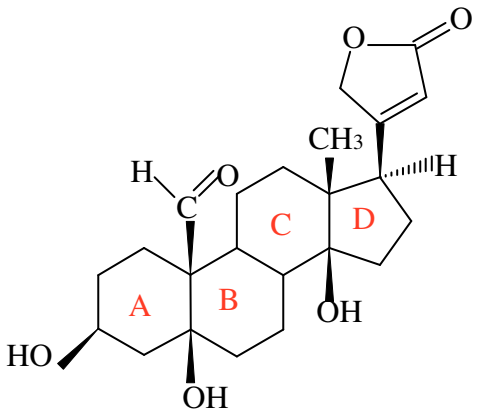
Тестостерон

Сердечные гликозиды. Сердечные гликозиды – соединения стероидного ряда, у которых стероидная часть молекулы играет роль агликона (в этом случае его называют генином) некоторых моно- или олигосахаридов. В небольших количествах они возбуждают сердечную деятельность и используются в кардиологии. В больших дозах они, напротив, являются сердечными ядами. Выделяют эти соединения из различных видов наперстянки (дигиталиса), ландыша, горицвета и других растений.

К генинам сердечных гликозидов растительного происхождения отностся дигитоксигенин и строфантидин.



Дигитоксигенин



Строфантидин

Особенность их структуры – наличие ненасыщенного γ-лактонного кольца у С-17 и *цис*-сочленения колец С и D. Остатки углеводов (ими могут быть 2,6-дидезоксисахара) присоединяются за счет гидроксильной группы у С-3 стероида. Связь между молекулой углерода и генином является β-гликозидной. Примером сердечного гликозида служит ланатозид А, выделенный из наперстянки.

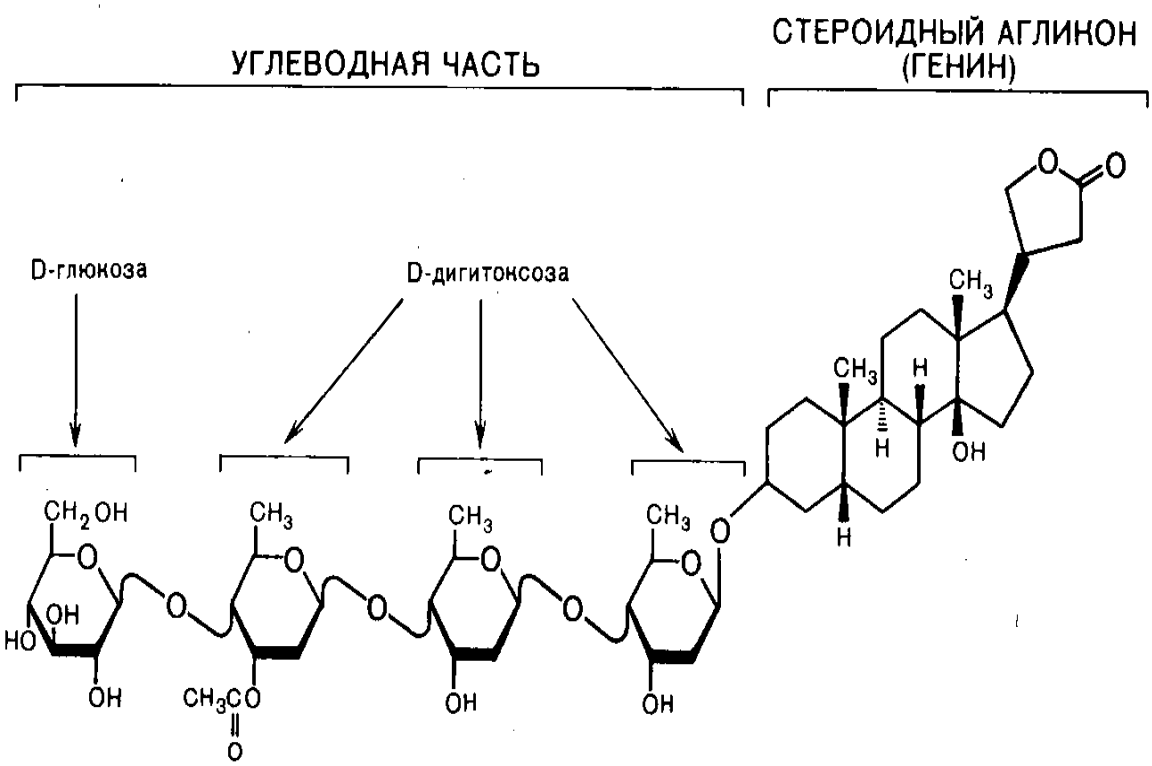


Рис 3.3. Ланатозид

3.7. Сахара и полисахариды

Углеводами называют органические соединения общей формулы $(CH_2O)n$, где n больше или равно 3. Эти соединения, содержащиеся во всех животных, растительных и микробных клетках, выполняют функции как конструктивных элементов, так и резервных питательных веществ клетки. Формула $(CH_2O)n$ достаточно точно отражает их состав и может использоваться в расчетах стехиометрии происходящих в клетке реакций и высвобождающейся при этом энергии.

В биосфере вещества углеводной природы (включая крахмал и целлюлозу) по массе превосходят все другие соединения, вместе взятые. В процессе фотосинтеза диоксид углерода под действием солнечного света превращается в простые сахара, содержащие от 3 до 9 атомов углерода. Образующиеся моносахариды затем полимеризуются, превращаясь в вещества, удобные для построения конструкционных элементов клетки (целлюлоза) или для хранения резерва сахаров (крахмал). Описанные процессы обеспечивают усвоение солнечной энергии и ее накопление в виде определенных химических соединений для последующего использования. Подсчитано, что таким путем ежегодно трансформируется около 10^{18} ккал энергии, что составляет около 0,1 % от всей падающей на землю солнечной энергии. Само собой разумеется, что большая часть этих ежегодно поступающих 10^{18} ккал в конце концов вновь рассеиваются в результате последующего окисления (в основном путем клеточного дыхания) до диоксида углерода.

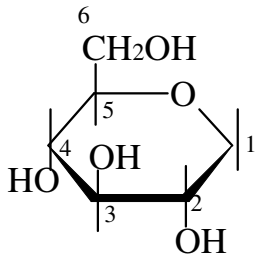
D-глюкоза и другие моносахариды. Моносахариды или простые сахара, представляют собой простейшие углеводы. Моносахариды содержат от трех до девяти атомов углерода и выполняют роль мономерных звеньев при построении не несущих генетической информации биополимеров с молекулярной массой до нескольких миллионов.

Глюкоза, как и другие простые сахара, представляет собой производное полигидроксиуглерода и в природных источниках всегда встречается в виде D - (+) – глюкозы, т.е. в виде оптического изомера, вращающего плоскость поляризации свете вправо.

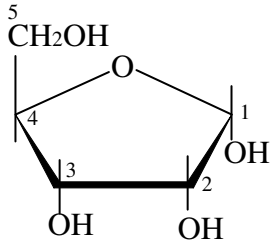
Хотя D-глюкоза по распространенности намного превосходит все другие моносахариды, в живых организмах встречаются и иные простые сахара, например D-маноза, D-фруктоза, D-галактоза и др. Все они имеют альдегидную или кетонную группу.

В названии сахаров сначала обычно указывается природа этой группы, а затем уже число углеродных атомов в цепи. Так, например, глюкоза называется альдогексозой. Символ D означает определенный оптический изомер, в виде которого этот моносахарид практически всегда присутствует в живых системах.

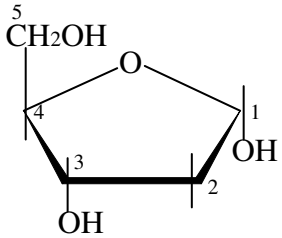
В растворах D-глюкоза большей частью существует в виде циклического соединения, так называемой пиранозы, образующейся в результате взаимодействия альдегидной группы С-1 с гидроксилом при С-5. Символы α и β обозначают пространственное положение гидроксильной группы при С-1.



Пятичленные сахара D-рибоза и дезоксирибоза являются основными компонентами мономерных звеньев нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) и других биологически важных соединений, о которых речь будет идти впереди.

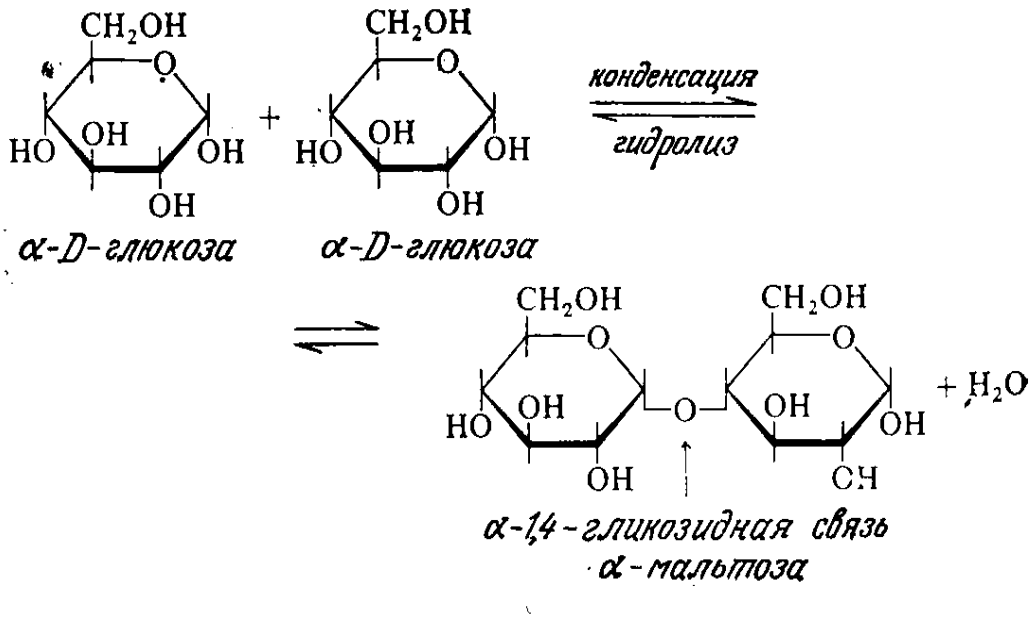


D-рибоза

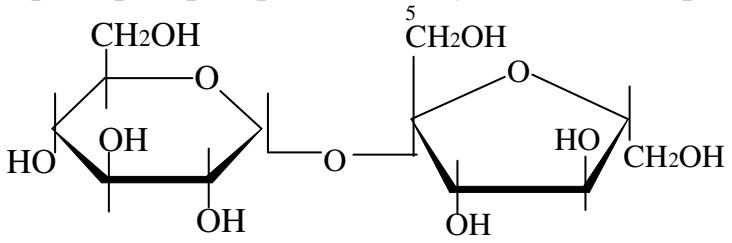


Дезоксирибоза

Поскольку в растворах многие простые сахара существуют преимущественно в циклической форме, они не дают реакций, характерных для альдегидов или кетонов. В то же время в D-гликоперанозном кольце гидроксильная группа при С-1 отличается от других гидроксилов большей реакционной способностью. Как показано ниже, на схеме реакции, эта гидроксильная группа, занимающая α-положение, может вступать в реакцию с гидроксильной группой при С-4 другого сахара, в результате чего элиминируется молекула воды и образуется α -1,4-гликозидная связь:

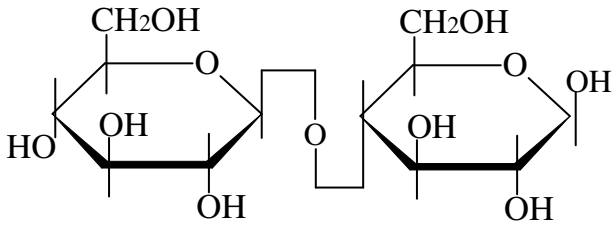


В результате конденсации двух молекул моносахаридов образуется дисахарид. Помимо мальтозы, образующейся из двух молекул D-глюкозы, относительно широко распространены следующие дисахариды:



α-D-глюкоза β-D-фруктоза

сахароза



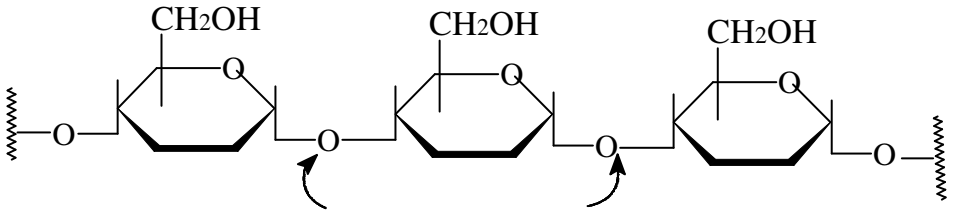
β-D-галактоза β-D-глюкоза

лактоза

Важнейший пищевой продукт, обыкновенный сахар, представляет собой сахарозу, которая обнаружена во всех фотосинтезирующих растениях. Сахароза легче других дисахаридов подвергается гидролизу; образующаяся при этом смесь моносахаридов глюкозы и фруктозы называется инвертным сахаром. Относительно редкий, но важный дисахарид лактоза находится только в молоке. Поскольку некоторые люди

не переносят лактозу и поэтому не могут употреблять в пищу молоко, в настоящее время разрабатываются ферментативные процессы гидролиза молочного сахара.

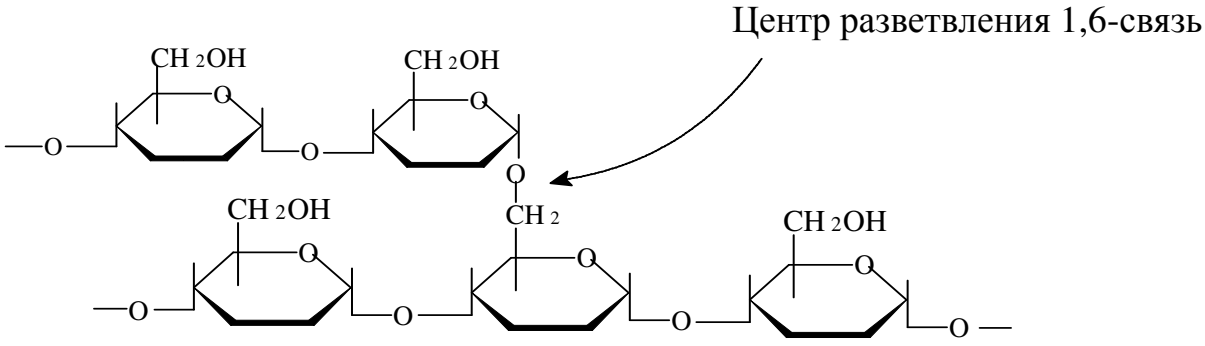
При дальнейшей полимеризации глюкозы могут образоваться новые 1,4-гликозидные связи с образованием амилозы. Последняя представляет собой неразветвленный полимер, построенный из остатков глюкозы с молекулярной массой от нескольких тысяч до полумиллиона дальтон.



α-1,4-гликозидные связи
Участок цепи амилозы

Резервный источник питания крахмал обычно содержит около 20% амилозы, хотя эта величина может меняться в довольно широких пределах. Гранулы крахмала достаточно велики, и с помощью микроскопа их легко увидеть во многих растительных клетках.

Амилозная фракция крахмала, как известно, состоит из нерастворимых в воде линейных полимеров. Основная же часть крахмала представляет собой амилопектин, также полимер D-глюкозы, отличающейся от амилозы разветвленной структурой. В среднем на 25 остатков глюкозы приходится один центр разветвления. Разветвление цепи осуществляется за счет образования гликозидной связи между гидроксилом при С-1 одной цепи и гидроксилом при С-6 другой цепи:



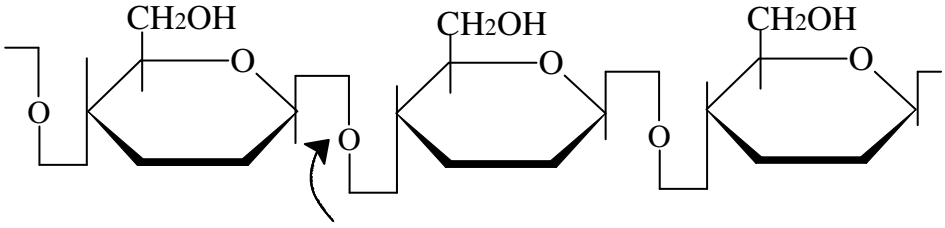
Как правило, молекулы амилопектина больше молекул амилозы. Их молекулярная масса составляет от 1 до 2 миллионов дальтон. Амилопектин растворим в воде и, адсорбируя воду, может образовывать гели. Частичный кислотный или ферментативный гидролиз крахмала приводит к образованию различных разветвленных фрагментов амилопектина, называемых декстринами. Декстрины применяются в качестве

загустителей и при изготовлении паст. При частичном гидролизе крахмала образуется также глюкоза, мальтоза и другие относительно небольшие сахара. Таким путем из кукурузного крахмала получают кукурузную патоку.

3.8. Целлюлоза

Целлюлоза является главным структурным элементом всех растительных клеток, от водорослей до деревьев, и самым распространенным органическим соединением на земле. Типичными примерами материалов, состоящих в основном из целлюлозы, могут служить хлопок и древесина. Считается, что в биосфере ежегодно образуется 10^{11} т целлюлозы. Каждая молекула целлюлозы, как известно, представляет собой длинную неразветвленную цепь, построенную из остатков D-глюкозы и имеющую молекулярную массу от 50 000 до 1 миллиона и более дальтон.

Хотя в целлюлозе остатки глюкозы связаны 1,4-гликозидными связями, эти связи отличаются от тех, которые участвуют в построении амилозы. Это, на первый взгляд, небольшое различие имеет важные последствия. Гликозидные связи типа α-1,4, характерные для крахмала, легко расщепляются ферментами множества микроорганизмов, растений и животных. Напротив, лишь очень немногие живые существа способны гидролизовать β-1,4- связи целлюлозы. Одним из обычных продуктов ферментивного гидролиза целлюлозы является дисахарид целлобиоза, молекула которого построена из двух остатков глюкозы, соединенных β -1,4-гликозидной связью.



β-1,4-связь

Полигликозидная цепь целлюлозы

Устойчивость целлюлозы к расщеплению как в природных, так и в лабораторных условиях обусловлена не столько особенностями β-1,4-гликозидной связи, сколько кристаллической структурой целлюлозы и особой «упаковкой» ее молекул в биологических структурах. Для целлюлозы характерны внутрицепочечные водородные связи между гидроксильной группой при С-3 и атомом кислорода пиранозного кольца, а изредка также и водородные связи между отдельными цепями, как это

видно из ниже приведенной схемы. Эти связи обуславливают формирование из отдельных цепей целлюлозы больших надмолекулярных структур, называемых кристаллитами и легко различимых на электронных микрофотографиях.

Как известно, большая часть целлюлозы концентрируется в высоко упорядоченных кристаллических областях, в которых цепи или фибриллы целлюлозы упакованы настолько плотно, что в них с большим трудом проникают даже молекулы воды. По этой причине целлюлоза не растворима в воде. Менее упорядоченные участки этого биополимера, называемые аморфными, обычно составляют около 15 % микроструктуры целлюлозы. Аморфные участки сравнительно легко гидролизуются, например, кислотами. Кристаллические области поддаются деструкции гораздо труднее.

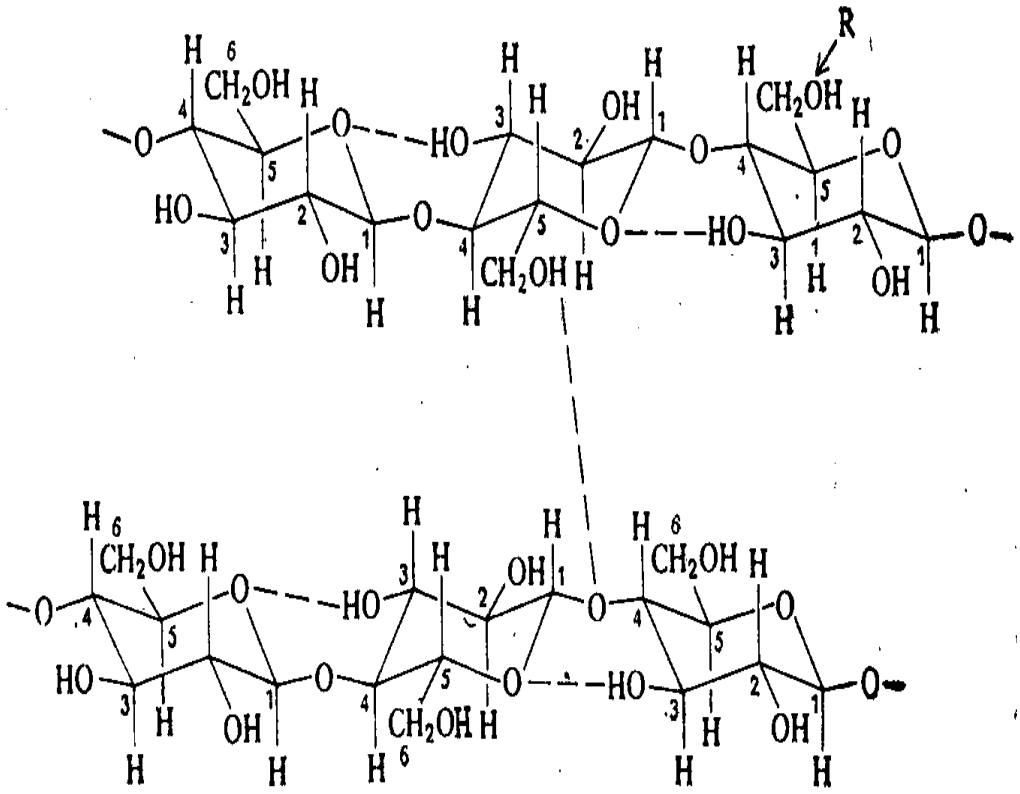


Рис. 3.4. Схематическое изображение системы водородных связей между остатками глюкозы в целлюлозе. Символом R обозначен центр возможной химической модификации целлюлозы. Так, в метилцеллюлозе, ацетилцеллюлозе и карбоксиметилцеллюлозе R=CH_3, $COCH_3$ и CH_3COONa соответственно

Цепи молекул целлюлозы сгруппированы в микрофибрилы, между которыми может находиться другой важный полисахарид – гемицеллюлоза.

В древесине и других материалах целлюлозной природы молекулы гемицеллюлозы окружают кластеры микрофибрил. Эти сложные элементы структуры в свою очередь окружены оболочкой из лигнина, упрочненной многочисленными поперечными связями.

Материалы описанной химической структуры обычно называют лигноцеллюлозой. Растительная биомасса, продукция целлюлозно-бумажной промышленности и ее отходы, как видно из ниже приведенной таблицы, содержат значительные количества лигноцеллюлозы. В которых относительное содержание целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина может меняться в широких пределах. Эти данные свидетельствуют также о том, что растительная биомасса является самовозобновляемым источником не только материалов на основе целлюлозы, но и больших количествах другого потенциально ценного сырья.

Таблица 3.1

Относительное содержание (масс. %) целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина в растительной биомассе, продукции целлюлознобумажного производства и ее отходов

Материал	Целлюлоза	Геми-целлюлоза	Лигнин
Древесина твердых пород	40–55	24–40	18–25
Древесина мягких (хвойных) пород	45–50	25–35	25–35
Трава	25–40	25–50	10–30
Листва	15–20	80–85	около 0
Волоски хлопкового семени	80–95	5–20	около 0
Газетная бумага	40–55	25–40	18–30
Отходы бумажного производства	60–70	10–20	5–10

Как известно, состав гемицеллюлоз изменяется в довольно широких пределах в зависимости от природы растения. В общем случае гемицеллюлозы представляют собой короткие разветвленные полимеры, построенные из остатков пентоз (ксилозы и арабинозы) и некоторых гексоз (глюкозы, галактозы и маннозы). Эти мономерные звенья, как правило содержащие большое количество ацетильных групп, связаны 1,3-, 1,6- и

1,4-гликозидными связями, о чём будет подробнее сообщено в соответствующей главе.

Гемицеллюлоза довольно легко поддается гидролизу с образованием растворимых соединений, например при обработке разбавленной (0,05–3%) серной кислотой или даже горячей водой. Значительно более устойчсива к гидролизу лигниновая оболочка полисахаридных компонентов биомассы.

Лигнин, как известно, представляет собой полифенол переменного состава. Известное представление о степени сложности и гетерогенности этого вещества дает модель структуры лигнина ели, приведенная на рис.3.5.

Такая неупорядоченная комбинация различных деталей структуры в высшей степени устойчива к действию химических и ферментативных агентов.

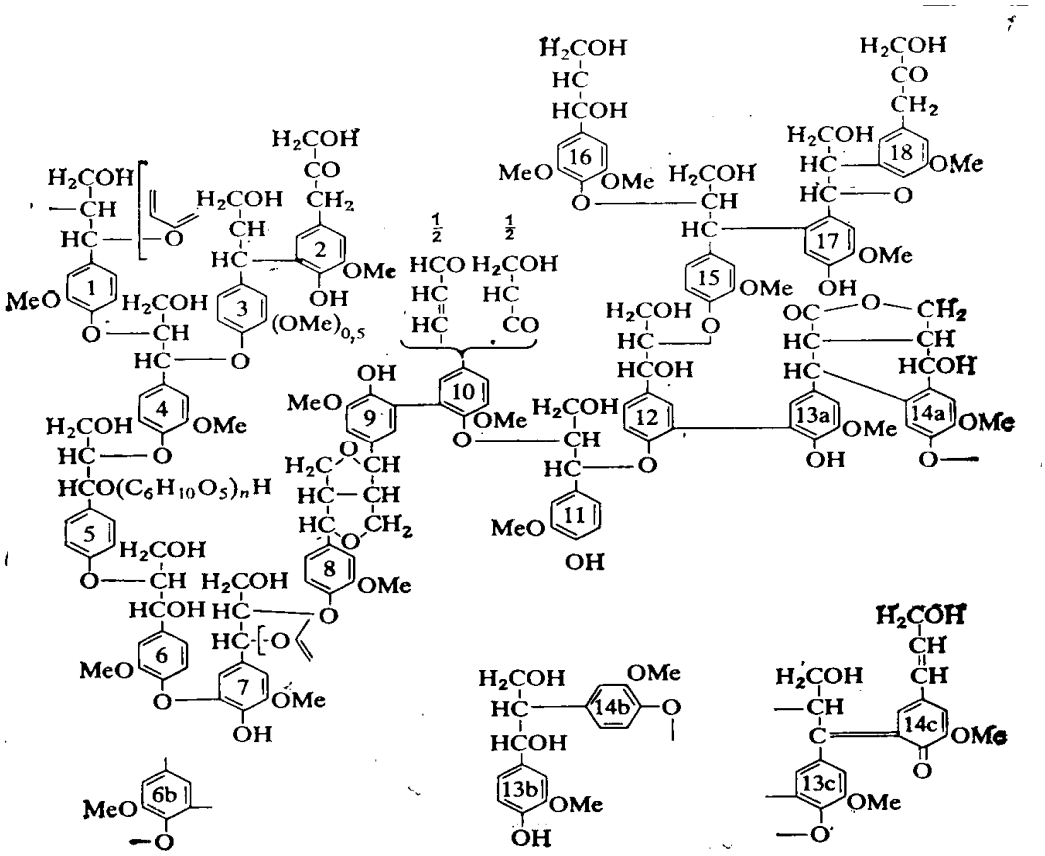


Рис. 3.5. Схематическое изображение на плоскости химического строения лигнина ели

3.9. Гликоген

В животных организмах гликоген является структурным и функциональным аналогом растительного крахмала. По строению он

подобен амилопектину, но имеет еще большее разветвление цепей. Условно можно считать, что разветвленность молекулы гликогена вдвое больше, чем амилопектина.

Сильное разветвление способствует выполнению гликогеном энергетической функции, так как только при наличии большого числа концевых остатков можно обеспечить быстрое отщепление нужного количества молекул глюкозы.

Молекулярная масса гликогена необычайно велика. Так, измерения молекулярной массы у этого полисахарида, выделенного со всеми предосторожностями во избежания расщепления макромолекулы, показали, что она равна 100 млн. дальтон. Такой размер макромолекул содействует выполнению функции резервного углерода. В силу своих больших размеров молекула гликогена не проходит через мембрану и остается внутри клетки. Пока не возникнет потребности в энергии.

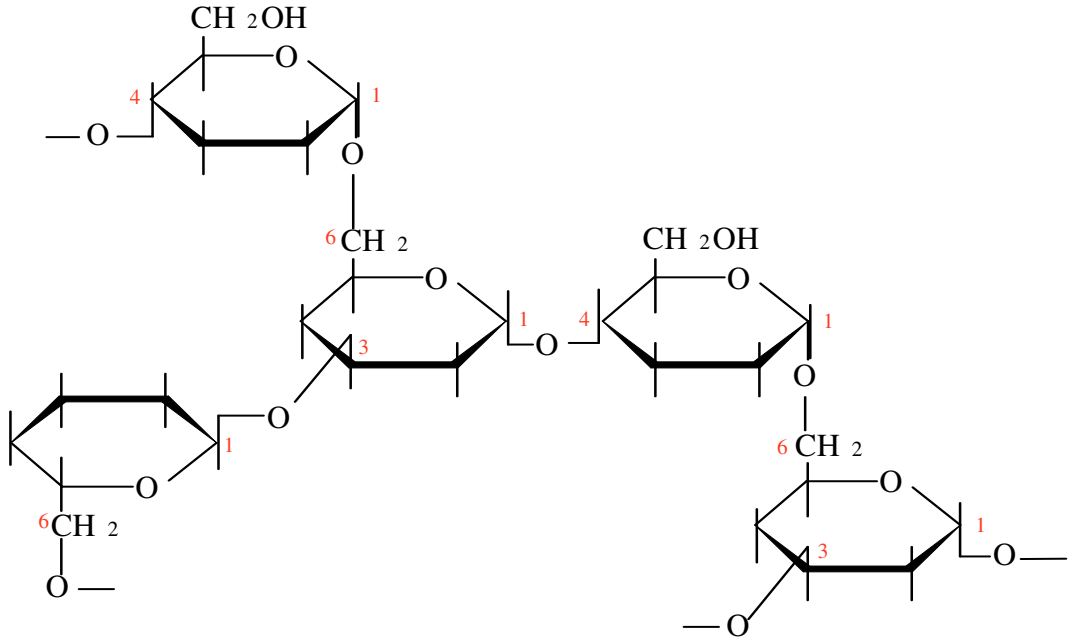
Гидролиз гликогена в кислой среде протекает очень легко с количественным выходом глюкозы. Это используется при анализе тканей на содержание гликогена: горячей щелочью из тканей извлекают гликоген, осаждают его спиртом, гидролизуют в кислой среде и определяют количество образовавшейся глюкозы.

3.10. Декстраны

Декстраны – это полисахариды бактериального происхождения. В промышленности их получают микробиологическим путем при действии микроорганизмов *Leuconostos mesenteroides* на растворе сахарозы.

Декстраны построены из α-D-глюкопиранозных остатков. Макромолекулы их сильно разветвлены. Основным типом связи являются α(1 – 6)-, а в местах разветвления, также, как и у амилопектина, α(1 – 4)-, α(1 – 3)- и реже α(1 – 2)-гликозидные связи.

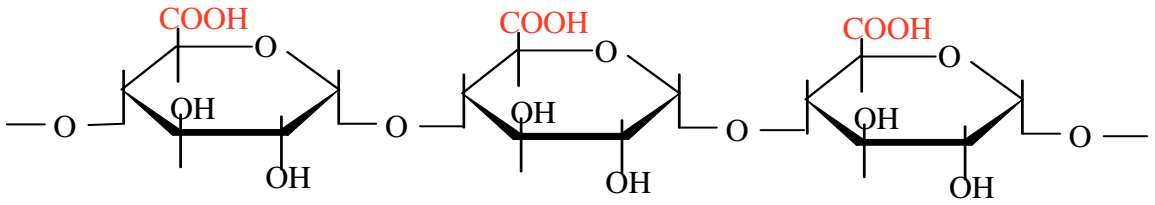
Декстраны широко используются в медицине как заменители плазмы крови, а также в качестве основы для получения *сефадексов* – ионообменников и молекулярных сит, широко использующихся в биохимии и биотехнологии. Высокая молекулярная масса природных декстранов делает их непригодными для приготовления инъекционных растворов вследствие плохой растворимости. В связи с этим молекулярную массу снижают до 50–100 тысяч с помощью кислотного гидролиза или ультразвука и получают так называемый кровезаменитель «полиглюкин» или дезинтоксикационный инъекционный раствор низкомолекулярного декстрана – препарат «реополиглюкин». Благодаря антигенным свойствам декстрана, он широко применяется в качестве носителя ферментов, предназначенных для инъекционной терапии.



Декстран

3.11. Пектиновые вещества

Пектиновые полисахариды обычно содержатся в плодах и овощах. Для них характерно желеобразование в присутствии органических кислот, что используется в пищевой промышленности (получение желе, мармеладов и др.) В основе пектиновых веществ лежит *пектовая* кислота, являющаяся полигалактуроновой кислотой. Остатки D-галактуроновой кислоты связаны α(1 – 4)-гликозидными связями.



Полигалактуроновая (пектиновая) кислота

Некоторые пектиновые вещества оказывают противоязвенное действие и являются основой ряда медицинских препаратов (например «плантаглюцида» из подорожника).

3.12. Альгиновые кислоты и некоторые другие полисахариды

Альгиновые кислоты содержатся в бурых водорослях. Неразветвленная цепь этих растительных полисахаридов построена из

соединенных (1–4)-связями остатков D-маннуровой и L-галуроновой кислот (эти компоненты являются эпимерами по С-5).

Альгиновые кислоты содержат большое количество свободных карбоксильных (-СООН) групп и используются как гелеобразователи в пищевой промышленности, а также как носители для многих ферментных препаратов и живых микробных или других клеток.

Следует отметить, что морские водоросли служат вообще источником многих полисахаридов, широко применяющихся в различных отраслях промышленности. Так, широко применяющийся в биохимических и микробиологических исследованиях агар представляет собой гетерополисахарид, содержащий большое количество сульфатных групп. Агар состоит из смеси агарозы и агаропектина. В полисахаридной цепи агарозы чередуются остатки D-галактозы и L-лактозы. Еще одним полисахаридом, выделяемым из водорослей является каррагенан, широко применяющийся в инженерной энзимологии в качестве носителя для ферментов и клеток.

3.13. Нуклеиновые основания, нуклеозиды, нуклеотиды

Нуклеиновые кислоты играют главную роль в передаче наследственных процессов (генетической информации) и управлении процессом биосинтеза белка. История их изучения начинается с выделения швейцарским химиком И. Мишером (1868) из ядер клеток вещества кислотного характера, названного им нуклеином и получившего позже название нуклеиновой кислоты.

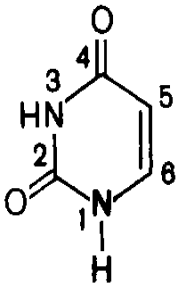
Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные соединения, молекулярная масса которых колеблется в пределах от 25 тыс. до 1 млн. дальтон. Полимерные цепи нуклеиновых кислот построены из мономерных единиц – *нуклеотидов*, в связи с чем нуклеиновые кислоты получили название *полинуклеотидов***.** Особенность нуклеотидов состоит в том, что обычно «неделимое» мономерное звено в данном случае представляет собой трехкомпонентное образование, включающее гетероциклическое основание, углеводный остаток и фосфатную группу.

Углеводными компонентами служат две пентозы: D-рибоза и 2-дезокси-D-рибоза. Отсюда нуклеиновые кислоты делятся на рибонуклеиновые, содержащие рибозу (РНК), и дезоксирибонуклеиновые, содержащие дезоксирибозу (ДНК).

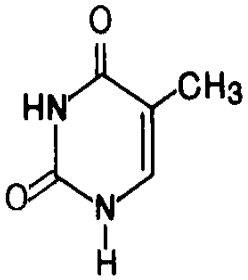
Нуклеиновые основания. Так в химии нуклеиновых кислот называют входящие в их состав гетероциклические соединения пиримидинового и пуринового рядов. В качестве заместителей в гетероциклическом ядре они содержат либо оксо (урацил, тимин), либо аминогруппу (аденин), либо одновременно обе эти группы (цитозин, гуанин). Для них принято

сокращенное трехбуквенное обозначение, составленное из первых букв их латинского названия, но чаще всего их обозначают для простоты только по одной букве их латинского названия. Далее приведены нуклеиновые основания в лактамной форме.

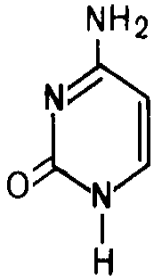
Пиримидиновые



Урацил Ura
(2,4-диоксо-пиримидин)

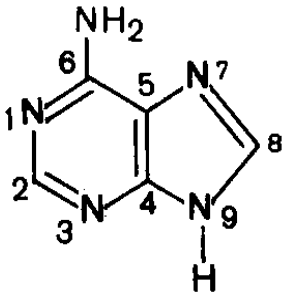


Тимин Thy
(5-метил-2,4-диоксо-пиримидин, 5-метил-урацил)

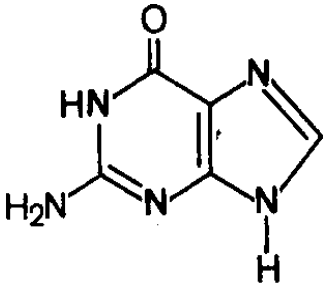


Цитозин Cyt
(4-амино-2-оксо-пиримидин)

Пуриновые



Аденин Ade
(6-аминопурин)



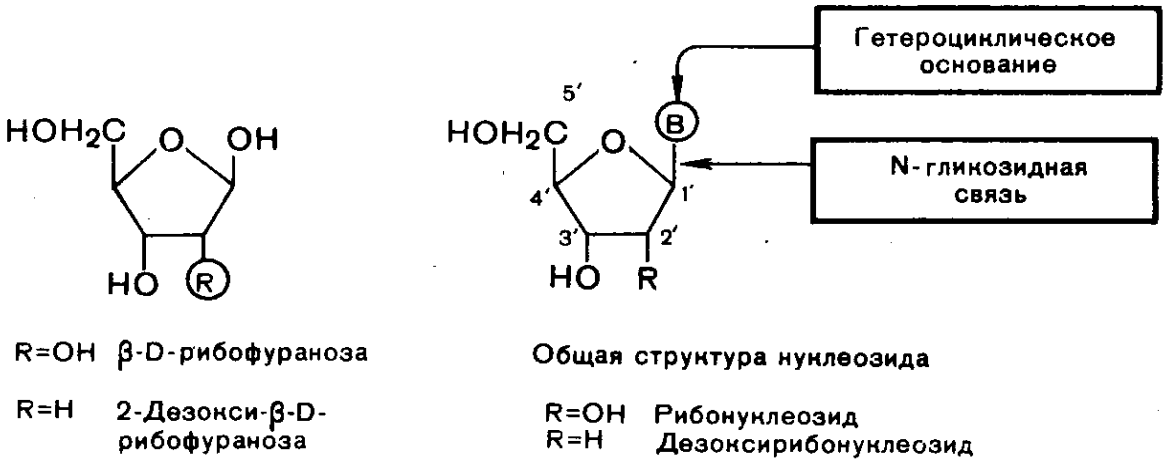
Гуанин Gua
(2-амино-6-оксопурин)

Нуклеиновые кислоты различаются также входящими в них гетероциклическими основаниями: урацил входит только в РНК, а тимин в ДНК.

РНК	**ДНК**
Урацил Цитозин, аденин, гуанин	Тимин Цитозин, аденин, гуанин

Нуклеозиды. Рассмотренные выше гетероциклические основания образуют N-гликозиды с D-рибозой или 2-дезокси-D-рибозой. Такие соединения называют нуклеозидами.

D-рибоза и 2-дезокси-D-рибоза входят в состав природных нуклеозидов в фуранозной форме (атомы углерода в них нумеруют цифрой со штрихом). Гликозидная связь осуществляется между аномерным атомомом углерода С-1 рибозы (или дезоксирибозы) и атомом азота N-1 пиримидинового и N-9 пуриновых оснований. Природные нуклеозиды всегда являются β-аномерами.



В зависимости от природы углеводного остатка различают *рибонуклеозиды и дезоксирибонуклеозиды*. Название нуклеозидов строится как для гликозидов, например β-аденинрибофуранозид и т.п. Однако более употребительны названия, производимые от тривиального названия соответствующего нуклеинового основания с суффиксами **-идин** у пиримидиновых и **-озин** у пуриновых нуклеозидов.

Цитозин + Рибоза → Цит**идин**

Цитозин + Дезоксирибоза → Дезоксицит**идин**

Аденин + Рибоза → Аден**озин**

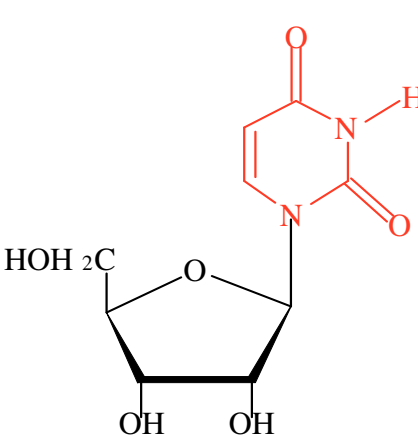
Аденин + Дезоксирибоза → Дезоксиаден**озин**

Исключение составляет *тимидин* (а не дезокситимидин), используемое для дезоксирибозида тимина, входящего в состав ДНК. В тех редких случаях, когда тимин встречается в РНК, соответствующий нуклеозид называется *риботимидином*. Нуклеозиды сокращенно обозначают однобуквенным кодом (существует также трехбуквенный код). В однобуквенном сокращении используется начальная буква их латинского названия с добавлением префикса d в случае

дезоксинуклеозидов, например дезоксиаденозин обозначается dA. Правда, в тех случаях, когда речь идет только об одной рибонуклеиновой кислоте или в случае описания последовательности нуклеозидов в ДНК префекс d обычно не ставится.

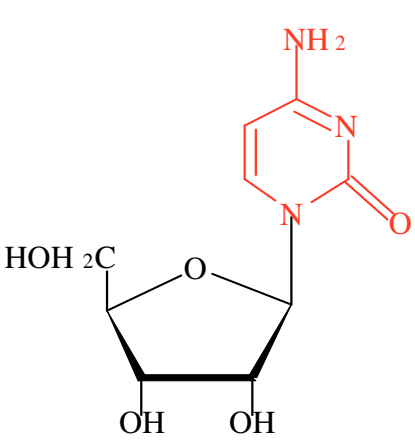
Уридин (U)

Урацил

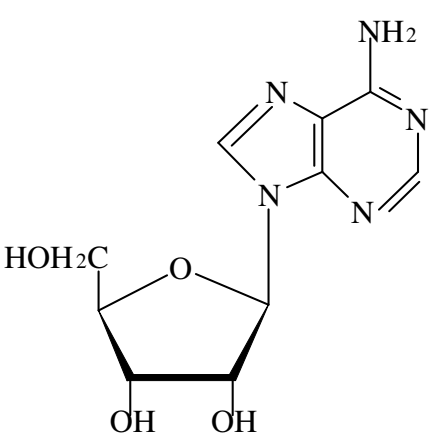


Цитидин (C)

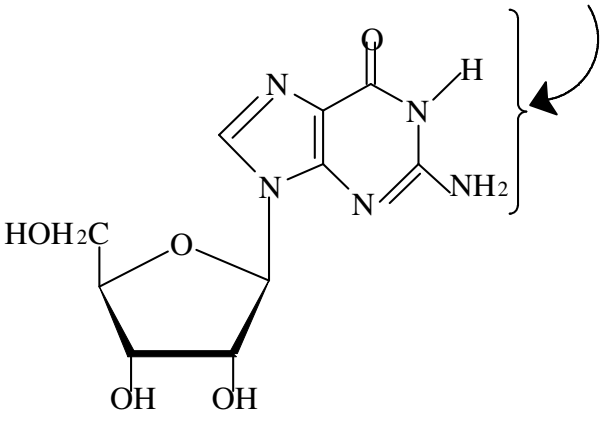
Цитозин



Аденин



Гуанин

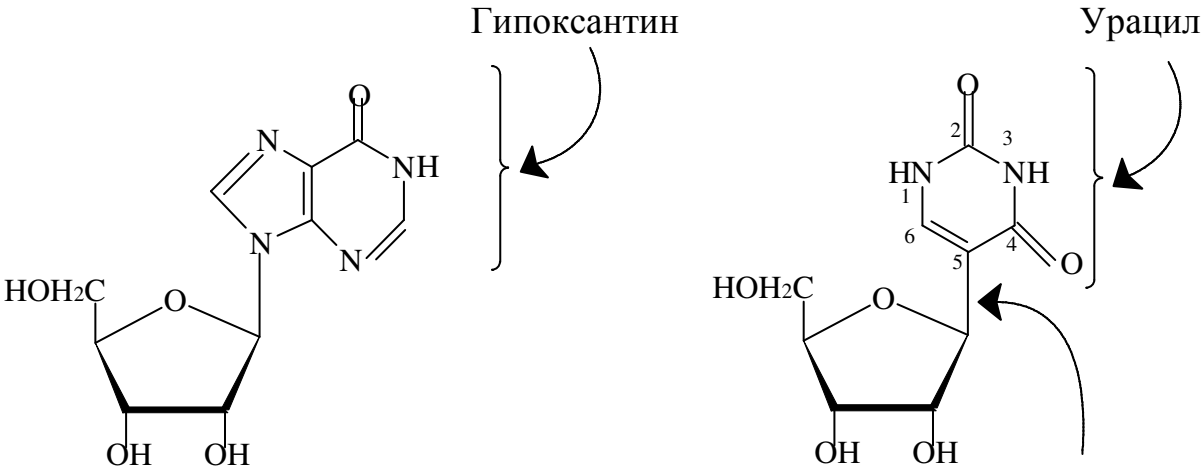


Аденозин (A)

Гуанозин (G)

Являясь N-гликозидами, нуклеозиды устойчивы к гидролизу в слабощелочной среде, но расщепляются в кислой. Пуриновые нуклеозиды гидролизуются легче, чем пиримидиновые.

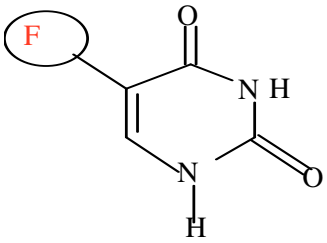
В состав некоторых РНК входят часто необычные нуклеозиды. Например, рибонуклеозид – *инозин*, который можно рассматривать как продукт дезаминирования аденозина, а также *псевдоуридин*, который является не N-, а C-гликозидом, с чем связана его высокая устойчивость к гидролизу.

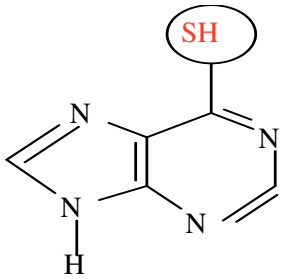


Инозин Псевдоуридин С-гликозидная связь

Лекарственные средства нуклеиновой природы. При лечении некоторых опухолевых заболеваний в качестве лекарственного средства используют синтетические производные пиримидинового и пуринового рядов, по строению похожие на естественные метаболиты (в данном случае – на нуклеиновые основания), но не полностью им идентичные, т.е. являющиеся антиметаболитами. Например, 5-фторурацил выступает в роли антагониста урацила и тимина, 6-меркаптопурин – аденина. Конкурируя с метаболитами, они нарушают на разных этапах синтез нуклеиновых кислот в организме.

Нуклеозиды – антибиотики. В клетках в свободном состоянии содержатся некоторые нуклеозиды, не являющиеся компонентами нуклеиновых кислот. Эти нуклеозиды обладают антибиотической активностью и приобретают все большее значение при лечении злокачественных образований. Известны несколько десятков таких нуклеозидов, выделенных из микроорганизмов, а также растительных и животных тканей.





5-Фторурацил 6-Меркаптопурин

Нуклеозиды-антибиотики отличаются от обычных нуклеозидов некоторыми деталями строения либо углеводной части, либо гетероциклического основания. Это позволяет им играть, по-видимому,

роль антиметаболитов. Нуклеозидные антибиотики пиримидинового ряда часто подобны цитидину, пуринового ряда – аденозину.

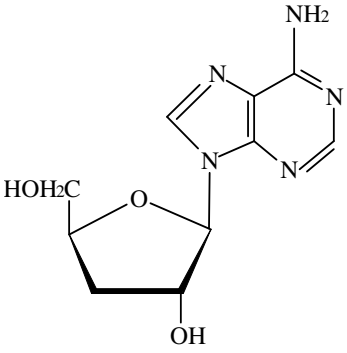
Например, выделенный из грибницы *Cordyceps militaries* антибиотик *кордецепин* отличается от аденозина только отсутствием в углеводном остатке 3′-ОН-группы. Сильными антибиотическими свойствами обладает *пуромицин,* выделенный из культуральной жидкости *Streptomyces alboniger.*

Пуромицин представляет собой 3′-дезокси-3′-амино-N,N-диметиладенозин, ацилированный по 3′-аминогруппе остатком О-метилтирозина. Он является ингибитором рибосомального синтеза белка.

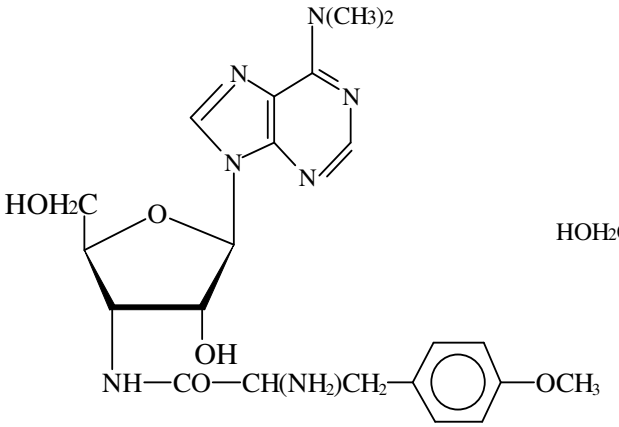
Выраженным действием на вирус СПИДа, снижающим его размножение, обладает *азидотимидин*.

Некоторые микроорганизмы выделяют вещества нуклеозидной природы, в состав которых вместо рибозы входит ее эпимер по С-2 β-D-арабиноза.

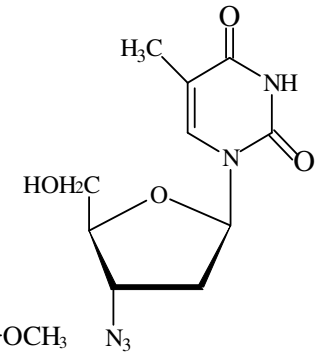
Весьма сильными антивирусными и антигрибковыми свойствами обладают *арабинозилцитозин и арабинозиладенин*.



Кордицепин

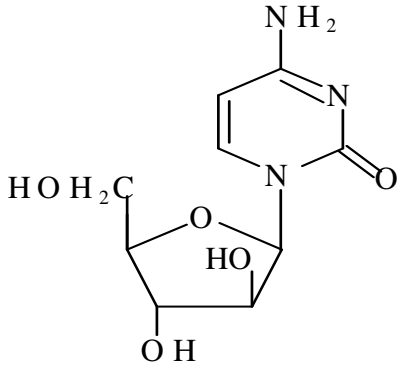


Пуромицин

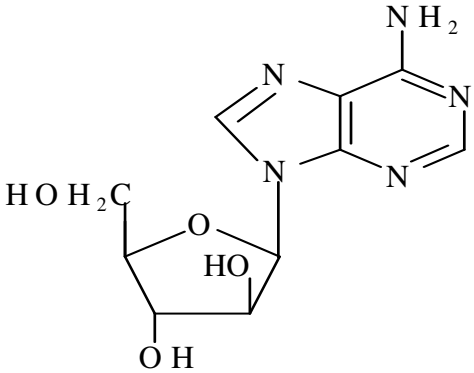


Азидотимидин

.



1-β-D-арабинофуранозил-цитозин



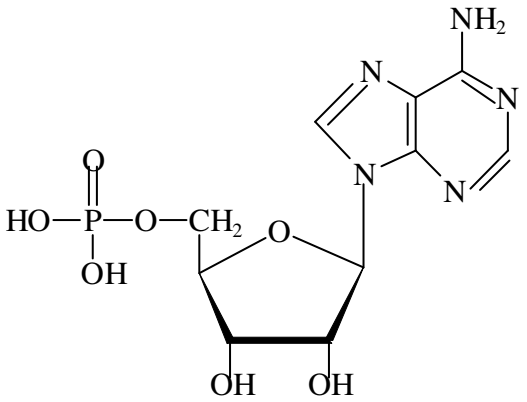
9-β-D-арабинофуранозиладенин

Как видно из приведенных примеров, имеющейся «небольшой» разницы в строении или конфигурации одного атома углерода (С-2) в углеводном остатке достаточно, чтобы соединение играло роль ингибитора биосинтеза ДНК. Эти данные служат основой для создания новых лекарственных препаратов методом молекулярной модификации природных биологически активных веществ.

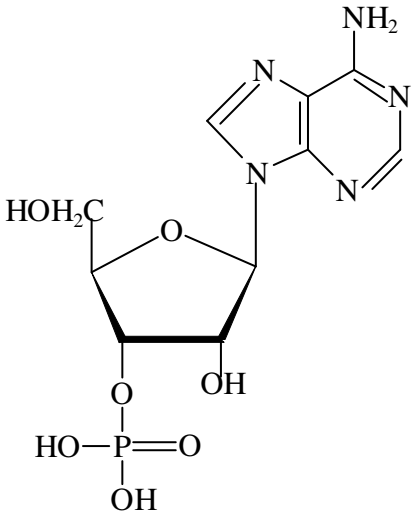
Нуклеотиды. Нуклеотидами называются фосфаты нуклеозидов. Фосфорная кислота обычно этерифицирует спиртовый гидроксил при С-5′ или С-3′ в остатке рибозы (рибонуклеотиды) или дезоксирибозы (дезоксирибонуклеозиды). Рассмотрим общий принцип строения нуклеотидов на примере фосфатов аденозина. Для связывания трех компонентов в молекуле нуклеотида используется сложноэфирная и N-гликозидная связи. Нуклеотиды можно рассматривать, с одной стороны, как эфиры нуклеозидов (фосфаты), с другой – как кислоты (в связи с наличием остатка фосфорной кислоты.

За счет фосфатного остатка нуклеотиды проявляют свойства двухосновной кислоты и в физиологических условиях при pH близким к 7,0 находятся в полностью ионизированном состоянии.

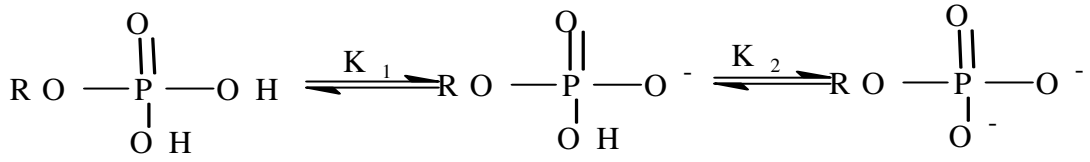
Для нуклеотидов используют два вида названия. Одно включает наименование нуклеозида с указанием положения в нем фосфатного остатка (например, аденозин-3′-фосфат, уридин-5′-фосфат). Другое строится с добавлением суффикса -**ловая кислота** к названию остатка пиримидинового (например, 5′-уридиловая кислота) или пуринового (например, 3′-адениловая кислота) оснований.



Аденозин-5’-фосфат, 5’-адениловая кислота



Аденозин-3’-фосфат, 3’-адениловая кислота



R-остаток нуклеозида

Используя принятый для нукдеозидов буквенный код, 5′-фосфаты записываются с добавлением латинской буквы «р» перед символом нуклеозида, 3′-фосфаты – после символа нуклеозида. Аденозин-5′-фосфат обозначается рА, аденозин-3′-фосфат как Ар и т.д. Эти сокращенные обозначения используются, как правило, только для записи последовательности нуклеотидных остатков в нуклеиновых кислотах.

Наиболее широко используется в биохимической литературе их названия как моно-, ди- или три-фосфата с отражением этого признака в сокращенном коде, например AMP, АДР, ATP для аденозин-5′-фосфата, аденозин-5′-дифосфата или аденозин-5′-трифосфата.

При гидролизе соединяющих фосфатные группы фосфодиэфирных связей высвобождается большое количество энергии. Например, при гидролизе двух фосфодиэфирных связей и превращении ATP в AMP освобождается около 125 кДж, энергии вполне достаточной для образования пептидной связи в белках.

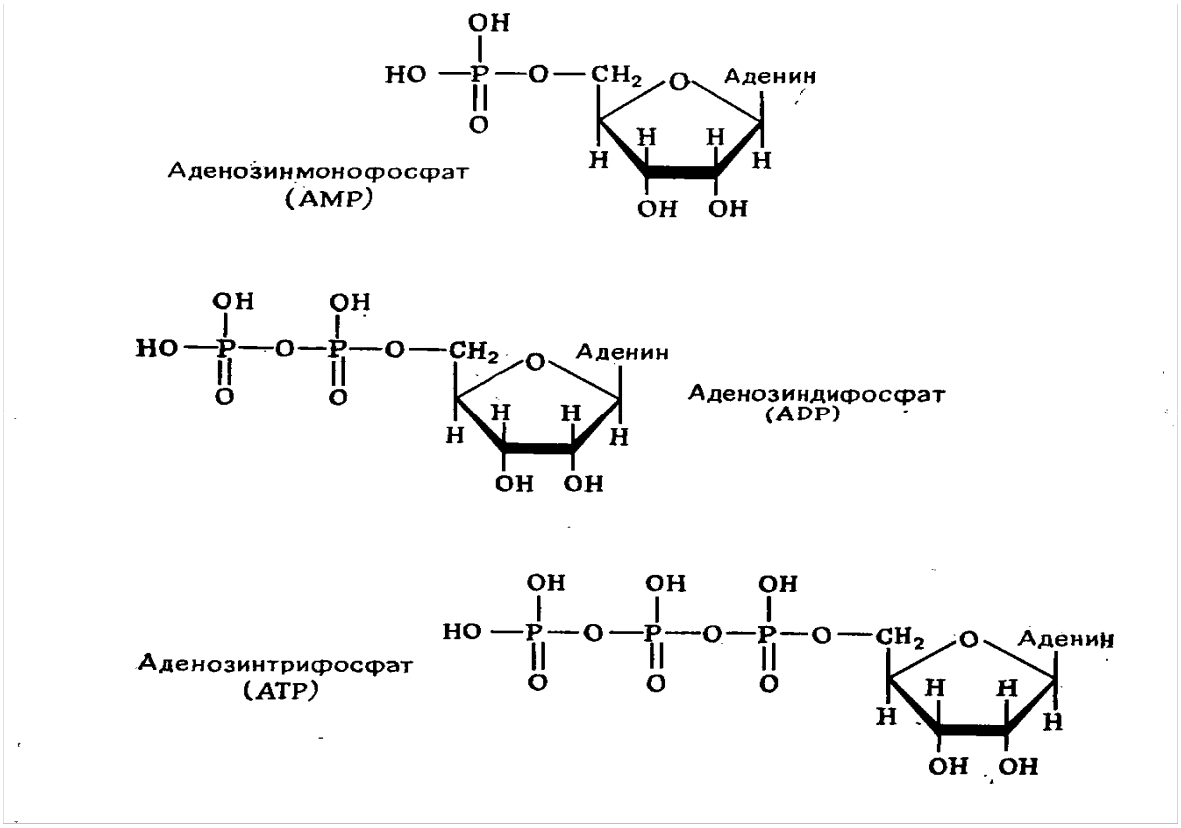


Рис. 3.6. Фосфаты аденозина. AMP, ADP и ATP участвуют в процессах переноса энергии в клетке

В настоящее время принято считать, что АТР является основным аккумулятором и переносчиком химической энергии во всех клетках без исключения. Эта энергия, как правило, затем расходуется для биосинтеза полимеров, при транспорте веществ через мембраны и при движении клеток. Дифосфаты и трифосфаты других нуклеотидов также могут выполнять аналогичные функции в химии клетки, но основными переносчиками энергии служат все же аденозинфосфаты. Эта способность АТР быть аккумулятором энергии послужила основанием для широкого его использования в медицинской практике в качестве средства, существенно повышающего иммунитет организма.

Аденозинмонофосфат (AMP) также играет существенную роль в нормальном функционировании клеток, являясь не только структурным элементом нуклеиновых кислот, но и *коферментом* для многих реакций, протекающих с участием ферментов, о чем будет известно из следующих глав книги. Такими же коферментами для многих других ферментативных реакция являются флавинаденинуклеотид (FAD), никотинамид-адениндинуклеотид (NAD) и кофермент А, структура которых показана на ниже приведенной схеме.

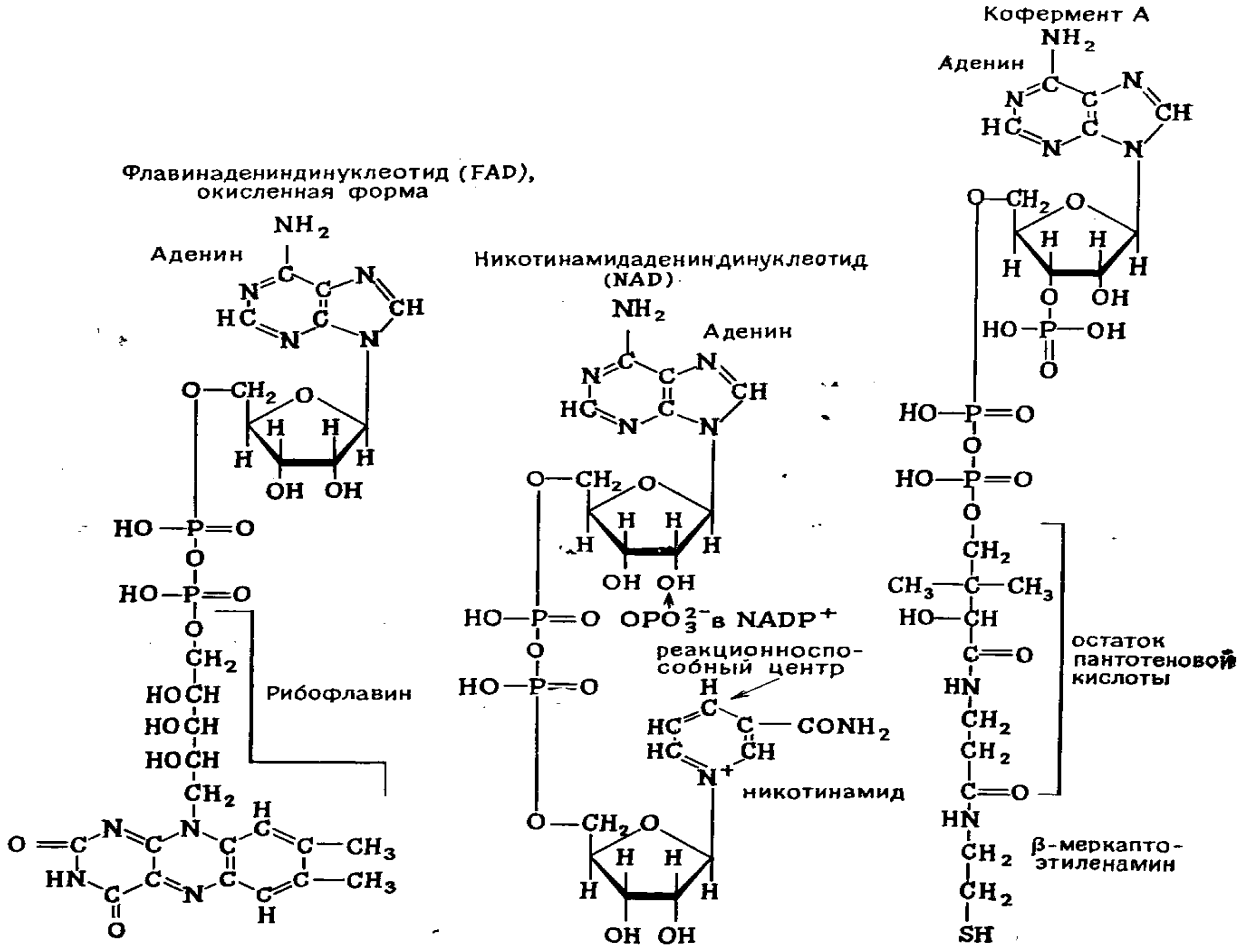
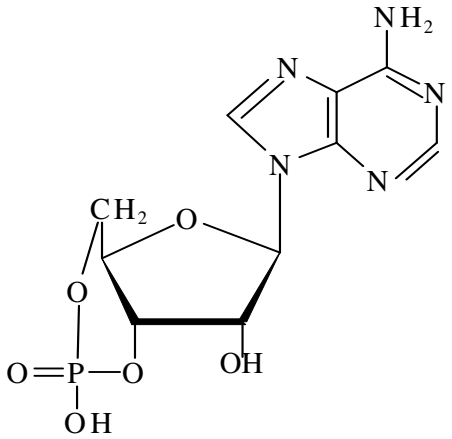


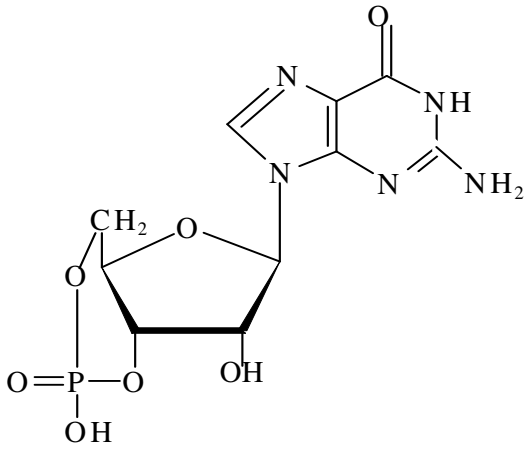
Рис. 3.7. Три важных кофермента, являющихся производными нуклеотидов

Циклофосфаты. К циклофосфатам относятся нуклеотиды, у которых фосфорная кислота этерифицирует одновременно две гидроксильные группы углеводного остатка. Практически во всех клетках присутствуют два нуклеозидциклофосфата – аденозин-3′,5′-циклофосфат и гуанозин-3′,5′- циклофосфат. В биохимической литературе широко используется их сокращенное обозначение как цикломонофосфатов, например циклоаденозинмонофосфат – cAMP, циклогуанозинмонофосфат – c GMP.

В настоящее время изучена роль cAMP, который выполняет в организме регулятора множества реакция, включая реакции образования полисахаридов и резервных полимеров (жиров).



Аденозин-3′, 5′- циклофосфат



Гуанозин-3′,5′-циклофосфат

3.14. Структура и функции нуклеиновых кислот

В настоящее время известно, что ДНК содержится в основном в ядрах клеток, РНК преимущественно находится в рибосомах, а также в плазме клеток. Как и полисахариды, полинуклеотиды образуются путем конденсации мономеров с отщеплением воды, причем, как в РНК, так и в ДНК, нуклеотиды соединены между собой фосфатными связями, образующимися с участием гидроксильных групп при С-3′ и С-5′ рибозы или дезоксирибозы. На рис. 3.7 приведена структура одного из три-нуклеотидов.

Известно, что клеточные молекулы ДНК невероятно велики: вся наследственная информация прокариот хранится в одной молекуле ДНК с молекулярной массой порядка $2 \cdot 10^9$. В эукариотах ядро может содержать несколько больших молекул ДНК. Отрицательные заряды ДНК нейтрализуются двузарядными катионами (в прокариотах) или основными аминокислотами (в эукариотах).

Следует подчеркнуть, что последовательность нуклеотидов, как это показано на рис. 3.7, имеет направление или полярность, обусловленную тем обстоятельством, что на одном конце цепи находится свободная гидроксильная группа при С-5’, а на другом – гидроксил при С-3′. На том же рисунке приведен удобный способ изображения нуклеотидной последовательности в направлении от 5′- к 3′- концу. Часто применяют и еще более короткие обозначения. Предположим, например, что первое, второе и третье основания на рис. 3.7 являются цитозином, аденином и тимином , тогда та же самая нуклеотидная последовательность может быть записана в виде pApApE или даже еще короче: CAT.

В 1953 году американским биохимиком Джеймсом Уотсоном и английским биофизиком Фрэнсисом Криком было высказано предположение, что молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, образующих двойную спираль, как это показано на рис. 3.9. Имеющий форму правильной спирали каркас молекул построен из остатков сахаров и фосфатных групп. Внутри двойной спирали расположены пуриновые и пиримидиновые основания. Именно комбинация таких оснований в полинуклеотидной цепи содержит в себе всю генетическую информацию, в частности данные о структуре синтезируемых рибонуклеиновых кислот и белков. Механизмы, регулирующие и использующие генетическую информацию ДНК будут рассмотрены в последующих главах.

Азотистое основание одной цепи двойной спирали взаимодействует с пространственно наиболее близко расположенным основанием другой спирали строго определенным образом, так что **аденин** специфично связывается только с **тимином**, а **гуанин –** с **цитозином.** На рис. 3.10 показано замечательное геометрическое сходство этих пар оснований, а также наличие двух и трех водородных связей в парах оснований A–T и C–G соответственно.

Две цепи ДНК имеют противоположную направленность (5′–3′ и 3′–5′). В результате, располагая информацией о нуклеотидной последовательности одной цепи ДНК, например 5′ CGAATCGTA 3′, можно сделать вывод о строении соответствующего фрагмента двухспиральной молекулы ДНК. В нашем случае этот фрагмент будет иметь структуру:

5’ CGAATCGTA 3’

3’ GCTTAGCAT 5

Точно такую же двухспиральную структуру можно получить, если была задана последовательность 5′ TACGATTCG 3′. Таким образом, в информационном смысле последовательность одной цепи ДНК определяет

последовательность *комплементарной* другой цепи ДНК, т.е. каждая цепь служит матрицей для другой цепи.

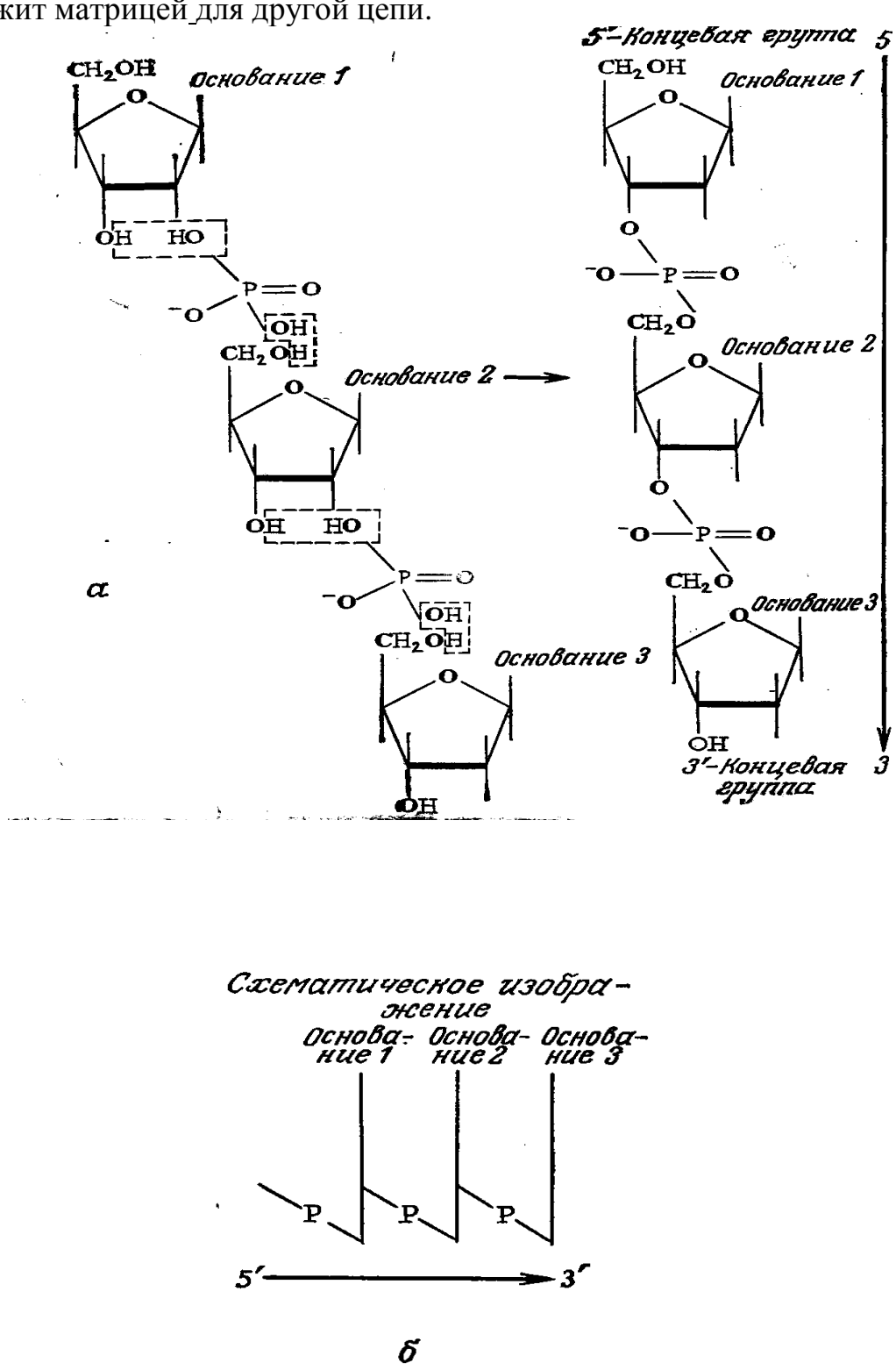
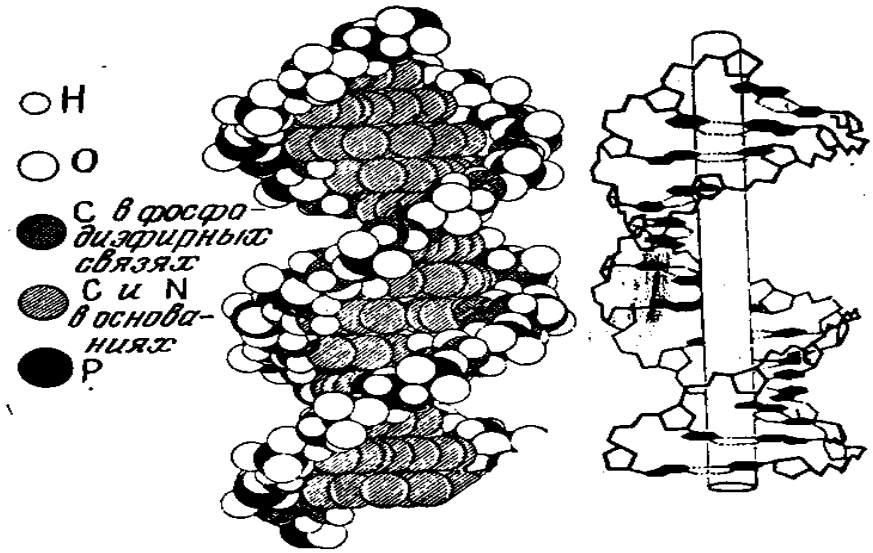


Рис. 3.8. *а* – конденсация нескольких нуклеотидов с образованием цепи, связанной фосфодиэфирными связями, *б* – упрощенное схематическое изображение нуклеотидной цепи



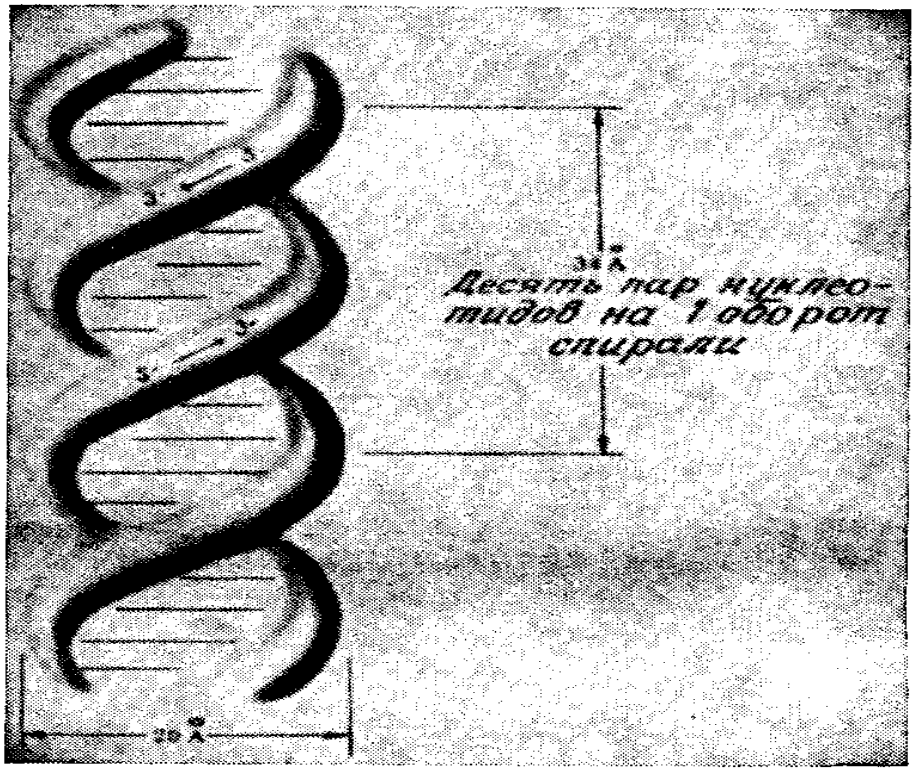


Рис. 3.9. Изображенная несколькими способами структура двойной спирали ДНК. На этом рисунке показана классическая структура Уотсона-Крика, называемая также В-ДНК; она представляет собой правую спираль, в которой плоскости пар оснований перпендикулярны оси спирали. В нижней части рисунка приведена схема, иллюстрирующая некоторые геометрические параметры этой структуры

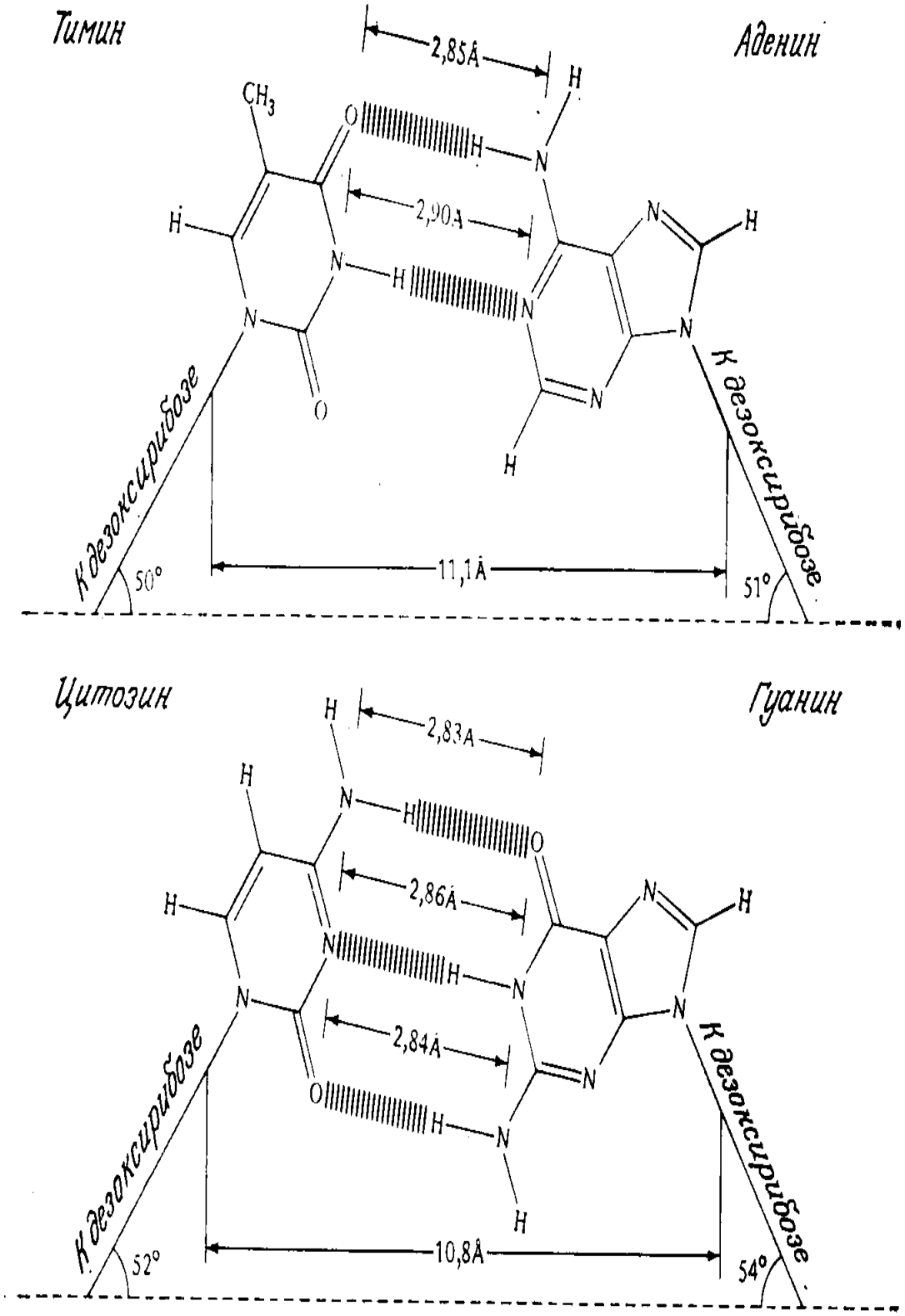


Рис. 3.10. Комплементарные пары оснований аденин-тимин и гуанин-цитозин, образующиеся за счет водородных связей и обладающие очень близкими пространственными характеристиками, что способствует формированию пар оснований внутри двойной спирали молекулы ДНК

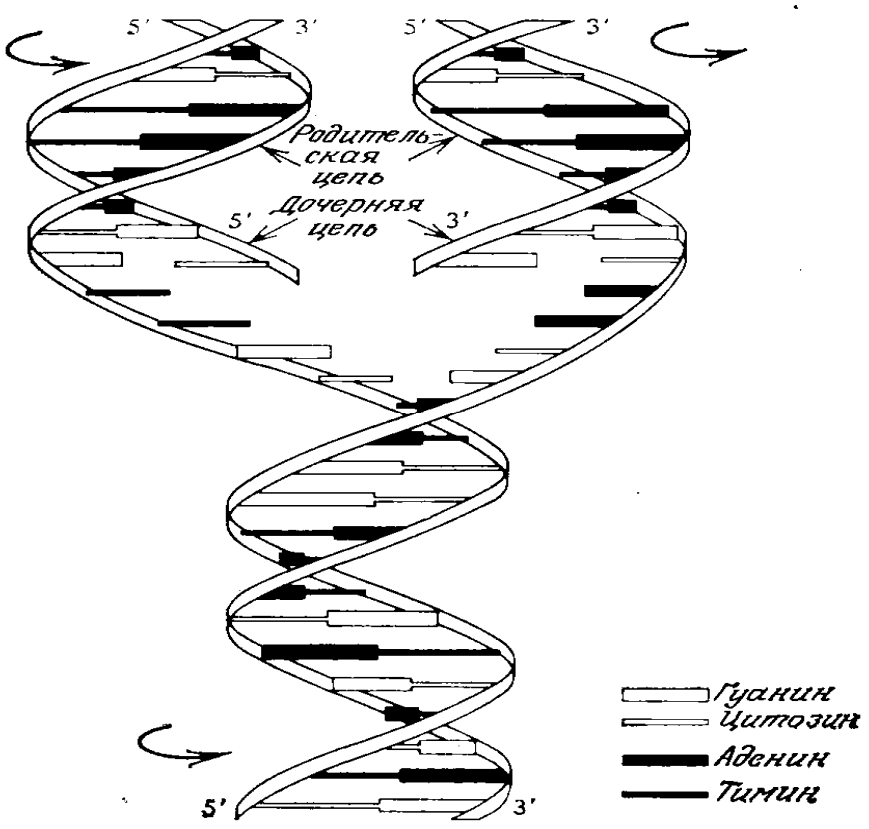


Рис. 3.11. Упрощенная схема репликации ДНК. По мере разделения цепей родительской ДНК на них синтезируются комплементарные цепи, что приводит к образованию двух дочерних молекул, идентичных родительской ДНК

Это характерное свойство ДНК является основой для синтеза дочерних ДНК из исходной родительской молекулы ДНК – процесса, называемого *репликацией* ДНК. Если две комплементарные цепи ДНК разделяются и на каждой из цепей в соответствии с правилами образования пар оснований строятся двойные спирали, то конечным продуктом такого процесса будут две новые молекулы, каждая из которых полностью идентична исходной двухцепочечной ДНК и содержит одну новую и одну старую цепь (рис. 3.8.). Редкие нарушения такой сборки ДНК из-за изменения факторов окружающей среды приводят к генетическим мутациям и фактически предопределяют эволюционную изменчивость живых организмов.

Таким образом, образование пар оснований составляет химическую основу считывания биологической информации, закодированной в нуклеотидной последовательности ДНК. Справедливость общих принципов такого механизма была убедительно доказана экспериментами

по выращиванию клеток *E. coli* сначала в среде, содержащей ^{15}N, а затем в среде только с нормальным изотопом азота ^{14}N.

Содержащие различные изотопы ДНК могут быть разделены на ультрацентрифуге. *Ультрацетрифугирование* и применение изотопных меток, в том числе радиоактивных, являются важнейшими инструментами экспериментальных исследований в современной биохимии и биотехнологии.

Другая важная деталь структуры ДНК – водородные связи, с помощью которых формируется пары оснований (см. рис. 3.10 – 3.11). Водородные связи способствуют стабилизации двухцепочечной структуры ДНК, однако эта стабилизация не является ни постоянной, ни обратимой. Как показано на схеме (рис. 3.11) , биологическая функция ДНК основана на раскручивании спирали и разделении двух своих цепей.

В ходе дальнейшего рассмотрения данной проблемы, относящейся к области молекулярной генетики, мы ознакомимся и с другими важными функциями одноцепочечных сегментов ДНК.

Разделение двух цепей ДНК при нагревании является основой важного метода идентификации различных ДНК. Поскольку пары оснований AT связаны двумя водородными связями, а пары CG – тремя, то содержащие большее число пар AT участки ДНК плавятся (так условно называется процесс разделения двух цепей) раньше, чем участки, обогащенные парами GC. Процесс плавления легко контролируется путем изменения поглощения раствора ДНК при 260 нм. Одноцепочечные ДНК поглощают сильнее и процесс плавления ДНК регистрируется по увеличению общей абсорбции.

Температурой плавления ДНК, $T_{пл}$, называют температуру, при которой изменение абсорбции составляет 50 % от разницы в абсорбции между полностью двухцепочечной и полностью расплавленной (одноцепочечной) ДНК. Как и следовало ожидать, величина $T_{пл.}$ коррелирует с содержанием GC. Например, ДНК из *E. coli*, содержащей 50% GC, имеет $T_{пл.} = 69^{o}C$, а ДНК из *Pseudomonas aeruginosa* с 68 % GC характеризуется $T_{пл.} = 76^{o}C$. Содержание GC в различных организмах меняется в широких пределах (от 23 до 75%). Особенности нуклеотидного состава иногда используются для идентификации организмов.

Если раствор расплавленной ДНК охладить, то разделенные комплементарные цепи вновь образуют структуру типа двойной спирали (эту операцию называют *отжигом*). Аналогично два различных одноцепочечных сегмента ДНК с частично комплементарными последовательностями могут подвергаться *гибридизации* с образованием сегмента двойной спирали. Гибридизация является важнейшим экспериментальным приемом в биохимии и технологии рекомбинантных ДНК. В завершении, следует отметить, что двухцепочечную ДНК можно также расплавить или денатурировать путем добавления щелочи или

кислоты, что приводит к ионизации оснований. Можно упомянуть также, что с точки зрения гидродинамики двухцепочечная ДНК в растворе ведет себя подобно жесткому стержню, в то время как одноцепочечная ДНК по своему поведению напоминает неупорядоченный полимерный клубок.

Как уже было выше упомянуто, вся информация, необходимая для выполнения клеткой ее важнейших функций, в том числе роста и деления, в бактериях типа *E. coli* содержится в одной молекуле ДНК, которая имеет строение гигантского кольца. В нативном состоянии ДНК из *E. coli* существует в *сверхспирализованной форме.* В случае прокариотов ДНК клетки носит название *хромосомы*. Кольцевая хромосома *E. coli* построена из 4,7 миллиона пар оснований.

В заключенном в мембрану ядре эукариот ДНК обычно поделена между несколькими хромосомами; последние могут быть намного больше хромосом прокариот. В состав хромосом эукариот входят также небольшие основные белки, называемые *гистонами*, которые составляют около половины массы хромосомы. Этот комплекс нуклеиновых кислот и белков хромосом эукариот называется *хроматином*. В хлоропластах и митохондриях эукариотических клеток также имеются отдельные, более мелкие молекулы ДНК.

Весьма существен тот факт, что клетки могут содержать и другие молекулы ДНК. Относительно небольшие кольцевые ДНК, существующие во многих бактериях и эукариотах, называют *плазмидами*. Бактериальные плазмиды, например, представляют собой замкнутые двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК, содержащие от 4 до 50 тысяч пар оснований.

Биологические функции плазмид состоят в обеспечении клетки – хозяина полезными, но не самыми необходимыми качествами, например устойчивостью к антибиотикам. В биохимических исследованиях и в технологических процессах плазмиды занимают одно из самых центральных мест, являясь важнейшим инструментом генно-инженерных методов рекомбинантных ДНК.

Другие небольшие молекулы ДНК могут быть введены в живые клетки вирусами. Небольшие вирусы, способные заражать бактерии, называют бактериофагами или просто *фагами*. Последние могут вызвать ряд трудностей в крупномасштабных технологических процессах с использованием чистых бактериальных культур. В то же время изучение фагов позволило внести большой вклад в развитие молекулярной генетики. Кроме того, фаги используются для создания стабильных рабочих коллекций или *библиотек сегментов ДНК*. Фаг λ *E .coli* содержит одну циклическую двухцепочечную молекулу ДНК, построенную из 48,6 тысяч оснований. ДНК фага Т2 *E.coli* состоит из 166 тысяч оснований.

Основная функция ДНК заключается в хранении инструкций для синтеза молекул РНК определенной нуклеотидной последовательности и длины. Некоторые из этих РНК затем направляют синтез различных

специфических белков. *Кодирующей последовательность молекулы РНК сегмент ДНК,* называется, как уже отмечалось ранее, *геном*.

Во всех клетках имеются рибонуклеиновые кислоты трех типов. Четвертый тип характерен для некоторых вирусов. Молекулы РНК построены из остатков рибонуклеотидов, углеводным компонентом которых является рибоза (а не дезоксирибоза, как в ДНК). Подобно ДНК, в РНК нуклеотиды расположены в определенной последовательности. В сущности, нуклеотидная последовательность РНК строится на основе той информации, которая содержится в соответствующих сегментах ДНК. В передаче информации от ДНК к РНК основную роль опять-таки играет образование пар оснований. Правила образования пар оснований в этом случае аналогичны тем, которым подчиняется процесс образования пар оснований двухцепочечных ДНК, за исключением пары аденин – тимидин; при синтезе РНК вместо нее формируется пара аденин – урацил по схеме:

ДНК(матрица)	РНК (синтезируемая на матрице)	ДНК(матрица)	РНК (синтезируемая на матрице)
T	A	C	G
A	U	G	C

В нормальном цикле жизнедеятельности клетки участвуют различные РНК, выполняющие важную функцию считывания и реализации генетической информации, заложенной в ДНК. *Матричная,* или *информационная* РНК (м-РНК или и-РНК) комплементарна последовательности оснований гена в ДНК. Каждая молекула м-РНК переносит определенную информацию от ДНК к другому механизму биохимического аппарата клетки. Поскольку объем этой информации меняется в довольно широких пределах, то и величина молекул м-РНК тоже может быть различной. Обычно цепь м-РНК содержит 10^3 – 10^4 нуклеотидов.

РНК почти всегда имеет одноцепочечную структуру, тогда как образование меж- и внутримолекулярных пар оснований часто играет важную роль в структуре или функции РНК.

Содержащаяся в м-РНК информация считывается в *рибосоме*. До 65% рибосомы составляет *рибосомальная РНК* (р-РНК), которая в свою очередь может быть разделена на РНК нескольких типов. В частности, рибосома *E. coli* содержит три различные РНК, обозначаемые 23S, 16S и 5S, которые содержат около $3\cdot10^3$, $1{,}5\cdot10^3$ и $1\cdot10^2$ нуклеотидных остатков соответственно. В рибосомах из цитоплазмы клеток – эукариот, с другой

стороны, имеются 28S, 18S, 7S и 5S р-РНК, а в рибосомах митохондрий и хлоропластов обнаружены РНК, специфичные только для этих органоидов.

Транспортные РНК (т-РНК) отличаются наименьшей молекулярной массой и содержат всего лишь от 70 до 95 нуклеотидных остатков. Они находятся в цитоплазме клетки и участвуют в процессе реализации генетического кода в рибосоме. Нуклеотидные последовательности и, следовательно, структура и функции различных клеточных р-ДНК и т-РНК, как и м-РНК, определяются последовательностями нуклеотидных остатков соответствующих генов клеточной ДНК.

Конечный результат этого сложного процесса передачи и трансляции информации заключается в синтезе молекулы белка. Таким образом, белки представляют собой конечный результат генетической информации, носителем которой является ДНК.

3.15. Белки и аминокислоты

Белки представляют собой наиболее распространенные органические соединения клетки, которые составляют от 30 до 70% от общей массы сухих веществ в клеточном содержании. Как известно, все белки построены из четырех самых распространенных биологических элементов – углерода, водорода, азота и кислорода. В среднем белки содержат 50% C, 7% H, 23% O и 16% N. Кроме того, в белках содержится до 3% серы, которая играет важную роль в стабилизации структур почти всех белков за счет образования дисульфидных …–S–S–… связей между атомами серы, расположенными в различных участках полимерной цепи.

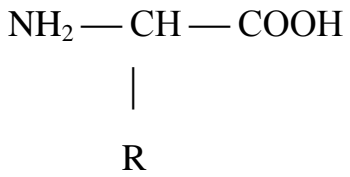
Роль белков в природе универсальны, но одна из главнейших функций белков заключается в их способности служить биокатализаторами многочисленных биохимических реакций, протекающих в клетке. Как уже упоминалось ранее, такие белки-катализаторы носят название *ферментов*. Одни ферменты локализуются в различных участках клетки. Некоторые из них находятся в растворенном или даже в суспендированном состоянии в цитоплазме клетки и в таком виде распределяются по всему ее объему, другие связаны с мембранами клеток или существуют в виде ассоциатов с другими веществами, с которыми они способны образовывать надмолекулярные агрегаты. Ранее упоминалось о гормональной роли полипептидов или низкомолекулярных белков. Кроме этого белки могут выполнять структурные функции (кератин, фиброин, коллаген), транспортные функции (гемоглобин, миоглобин), двигательные функции (актин, миозин), защитные функции (иммуноглобулины), функции запаса питательных веществ для клетки и организма (казеин, яичный альбумин), а также быть одними из самых сильных ядов и

токсинов, например, змеиный яд (гирудин), дифтерийный токсин, токсин ботулинуса.

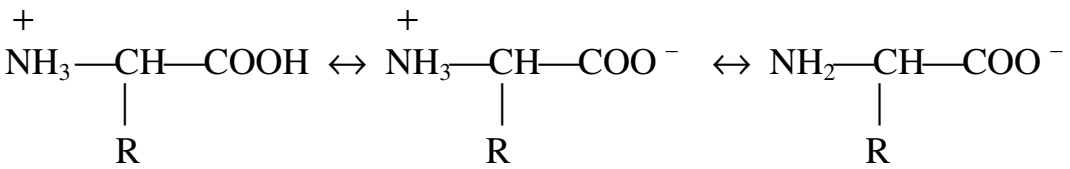
Названию «белки», наиболее принятому в отечественной и мировой литературе, соответствует слово *протеин*, производное от греческого слова *proteios*, что означает первый.

Пептиды и белки состоят из остатков α-аминокислот. Общее число встречающихся в природе аминокислот достигает 300, однако некоторые из них обнаруживаются лишь в определенном сообществе или даже в одном организме. Среди них выделяется группа из 20-ти наиболее важных α-аминокислот, постоянно встречающихся практически во всех белках (см. табл. 3.2).

α-Аминокислоты – гетерофункциональные соединения, они обязательно содержат карбоксильную и аминогруппы в своей молекуле, находящиеся у одного и того же атома углерода. Общая формула аминокислот, содержащих в своей структуре алифатический радикал R, может быть записана в следующем структурном виде:



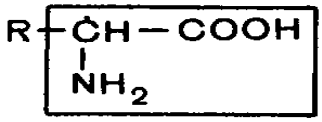
В водном растворе α-аминокислоты существует в виде равновесной смеси диполярного иона, катионной и одновременно анионной форм. Положение равновесия зависит от pH среды. Общим свойством для всех α-аминокислот является преобладание катионных форм в сильнокислых (pH 1–2) и анионной – в сильнощелочных (pH 13–14) средах.



Все аминокислоты, за исключением глицина, известного также под названием «аминоуксусная кислота», имеют оптическую стереоизомерию. Причем, если у бактерий и низших эукариотов в продуктах метаболизма встречаются как L- , так и D-изомеры, например в виде антибиотиков, то высшие эукариоты, включая человека и животных, строят свои белки, гормоны и другие продукты, необходимые для их жизнедеятельности, только из L-аминокислот.

Таблица 3.2

Важнейшие α-аминокислоты

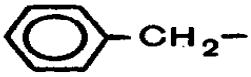
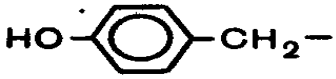
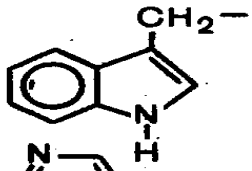
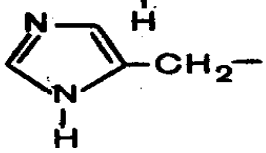
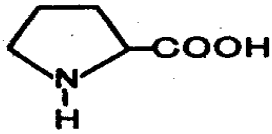


Строение R	Название	Сокращенное название аминокислотного остатка [1]
Алифатические		
$H-$	Глицин	Gly
CH_3-	Аланин	Ala
$(CH_3)_2CH-$	Валин [2]	Val
$(CH_3)_2CH-CH_2-$	Лейцин [2]	Leu
$CH_3-CH_2-CH(CH_3)-$	Изолейцин [2]	Ile
Содержащие OH-группу		
$HO-CH_2-$	Серин	Ser
$CH_3-CHOH-$	Треонин [2]	Thr
Содержащие COOH-группу		
$HOOC-CH_2-$	Аспарагиновая	Asp
$HOC-CH_2-CH_2-$	Глутаминовая	Glu
Содержащие NH_2CO-группу		
NH_2CO-CH_2-	Аспарагин	Asn
$NH_2CO-CH_2-CH_2-$	Глутамин	Gln
Содержащие NH_2-группу		
$NH_2-(CH_2)_3-CH_2-$	Лизин [2]	Lys
$NH_2-C(=NH)-NH-(CH_2)_2-CH_2-$	Аргинин	Arg

[1] Для записи аминокислотных остатков в макромолекулах пептидов и белков используют трехбуквенные (иногда однобуквенные) сокращения их тривиальных названий.

[2] Незаменимые α-аминокислоты.

Продолжение табл. 3.2

Строение R	Название	Сокращенное название аминокислотного остатка [1]
Серусодержащие		
$HS-CH_2-$	Цистеин	Cys
$CH_3-S-CH_2-CH_2-$	Метионин [2]	Met
Ароматические		
	Фенилаланин [2]	Phe
	Тирозин	Tyr
Гетероциклические		
	Триптофан [2]	Trp
	Гистидин	His
Иминокислота		
	Пролин	Pro
(полная формула)		

[1] Для записи аминокислотных остатков в макромолекулах пептидов и белков используют трехбуквенные (иногда однобуквенные) сокращения их тривиальных названий.
[2] Незаменимые α-аминокислоты.

Названия аминокислот хотя и можно строить по заместительной номенклатуре, например, аминокислота, может быть названа 2-аминопропановая (α-аминопропионовая) кислота, но, как правило, для нее и для других аминокислот используются тривиальные названия. Так, для указанной кислоты тривиальное название будет α-аланин (см. табл. 3.2).

Обычно в белковых молекулах принято называть аминокислоты не полностью, а по первым трем буквам их названия, например Гли- или Gly- для глицина, Ала- или Ala – для аланина и т.д. (обозначения в табл. 3.2).

Основным источником α-аминокислот для живого организма служат пищевые белки. Большинство из 20 аминокислот синтезируется в организме человека из остатков сахаров или органических кислот, однако 8 аминокислот не синтезируются организмом человека, так же, как некоторые жирные кислоты и витамины, и должны поступать извне. Они, так же, как и в предыдущих случаях, получили название *незаменимых аминокислот.* К ним относятся: валин (Val, Вал), лейцин (Leu, Лей), изолейцин (Ile, Иле), лизин (Lys, Лиз), треонин (Thr, Тре), метионин (Met, Мет), фенилаланин (Phe, Фен), триптофан (Trp, Трп).

Три аминокислоты не достаточно эффективно синтезируются в организме детей и больных почечными заболеваниями. Эти аминокислоты носят названия *полунезаменимых,* к ним относятся аргинин (Arg, Арг), цистеин (Cys, Цис) и гистидин (His, Гис).

При некоторых врожденных заболеваниях, например фенилкетонурии, человеческий организм перестает синтезировать еще одну кислоту – тирозин (Tyr, Тир), которая в организме здоровых людей образуется при гидроксилировании фенилаланина. В этом случае незаменимой аминокислотой становится тирозин, а фенилаланин приобретает свойства токсина и должен быть удален тем или иным методом из пищевого рациона.

Медико-биологическое значение α-аминокислот. Помимо роли строительных элементов для синтеза белка, большинство аминокислот обладает еще и значительным физиологическим воздействием на организм человека, выполняя в ряде случаев гормональную функцию. Например, глицин обладает функцией гашения нервных импульсов, т.е. является медиатором торможения, и широко применяется в медицинской практике. Глутаминовая и частично аспарагиновая кислоты также играют роль медиаторов торможения, т.е. также частично обладают гормональным действием, и применяются в клинической практике при различных заболеваниях нервной системы, например таких, как эпилепсия. Метионин и гистидин могут быть успешно использованы для лечения и предупреждения заболеваний печени, гистидин и аргинин – для лечения заболеваний почек, цистеин – глазных болезней, а дииодированный тирозин является предшественником – тироксина, важнейшего гормона щитовидной железы.

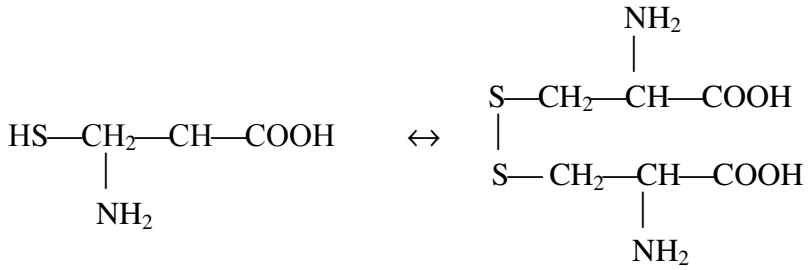
Таким образом, в зависимости от вида радикала R в боковой цепи аминокислоты обладают тем или иным физиологическим действием и соответственно физико-химическими свойствами.

Благодаря способности тиольной группы к легкому окислению, цистеин выполняет защитную функцию при воздействии на организм веществ с высокой окислительной способностью. Он был первым препаратом, проявившим свое противолучевое действие. В экспериментах на лабораторных животных показано, что применение цистеина для

лечения острой лучевой болезни приводит к повышению выживаемости животных, а введение его перед облучением уменьшает степень лучевого поражения.

Окисленная форма цистеина – цистин используется в фармацевтической практике в качестве стабилизатора лекарственных препаратов. Кроме того, процесс превращения цистеина в цистин приводит к стабилизации структуры белков.

Процесс окисления цистеина в цистин лежит в основе многих окислительно- восстановительных процессов, происходящих в клетке.



Цистеин Цистин

α-Аминокислоты, относящиеся к разным стереоизомерам, иногда сильно различаются по вкусу. Например, D-глутаминовая кислота безвкусна, а L-глутаминовая кислота имеет вкус мяса, поэтому L-глутаминовую кислоту, получаемую в огромных масштабах, широко применяют в виде глутамата натрия как вкусовую добавку к пищевым продуктам.

Из аминокислот L-ряда сладким вкусом обладают аланин, серин, пролин, глицин. В связи с этим α-аминокислоты привлекают серьезное внимание исследователей, занимающихся химией пищи, как возможные заменители сладких веществ углеводной природы в связи с проблемой заболевания диабетом. В настоящее время в промышленном масштабе выпускается пищевое вещество *аспартам,* обладающий почти в 200 раз более сладким вкусом, чем сахароза и имеющий аминокислотную природу. Аспартам представляет собой метиловый эфир дипептида L-аспарагинил-L-фенилаланина, т.е. состоит из остатков аспарагиновой кислоты и фенилаланина. В организме аспартам расщепляется на эти две аминокислоты и не приводит к тем последствиям, которые сопровождают сахар.

Чрезвычайно важен для организма путь декарбоксилирования аминокислот и образование так называемых *биогенных аминов*, которые в большинстве своем имеют гормональную природу (адреналин, норадреналин и др.). В организме эту реакцию обычно катализирует фермент *декарбоксилаза*, приводящий, например, к образованию из гистидина – гистамина, который, как известно, вызывает сильные аллергические реакции.

Другим интересным примером является процесс декарбоксилирования глутаминовой кислоты и образования из нее γ-аминомасляной кислоты, широко используемой в медицинской практике для лечения различных нарушений нервной системы.

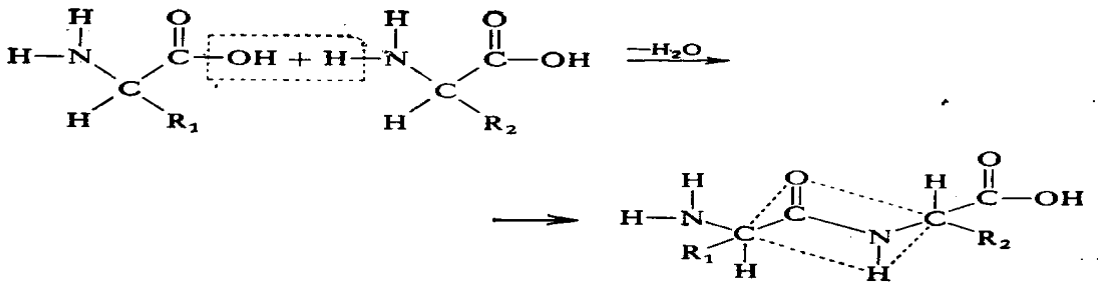
Структурные особенности пептидов и белков. Как известно, молекулярные массы белков могут меняться от 6000 до 1 млн и более дальтон. Белки имеют несколько типов структур, в зависимости от которых огни могут фибриллярными и глобулярными (рис. 3.12).

Как уже упоминалось ранее, белки вместе с липидами являются структурными элементами клеточных мембран, а ряд белков выполняет двигательные функции. У многих одноклеточных организмов имеются небольшие образования, по форме напоминающие волоски, которые называются *жгутиками*. Эти жгутики движутся под действием белков, способных сокращаться, и тем самым обеспечивают перемещение всей клетке. Другие нитевидные и трубчатые придатки, называемые *фимбриями*, участвуют в инициировании связывания патогенных бактерий с чувствительными к ним тканями.

Пептиды, по сравнению с белками, являются более удобными объектами для физико-химического изучения, поскольку имеют небольшую молекулярную массу (менее 6000 Да). Названия пептидов строятся путем последовательного перечисления аминокислотных остатков, начиная с N-конца, с добавлением суффикса –**ил**, кроме последней С- кольцевой аминокислоты, для которой сохраняется ее полное название.

Другими словами, названия α-аминокислот, вступивших в образование пептидной связи своей СООН – группой, оканчиваются в названии пептида на -**ил**: алан**ил**, вал**ил** и т.д., причем для остатка аспарагиновой кислоты используется название аспарт**ил**. Например, для трипептида, содержащего все три вышеперечисленные аминокислоты, название будет звучать следующим образом: аспартил – аланил – валин, или в сокращенной форме: Asp – Ala – Val.

Пептидная связь, как это видно из нижерасположенной схемы, частично имеет характер двойной связи, поэтому шесть атомов (на схеме они лежат внутри прямоугольника, ограниченного штриховыми линиями) расположены в одной плоскости.



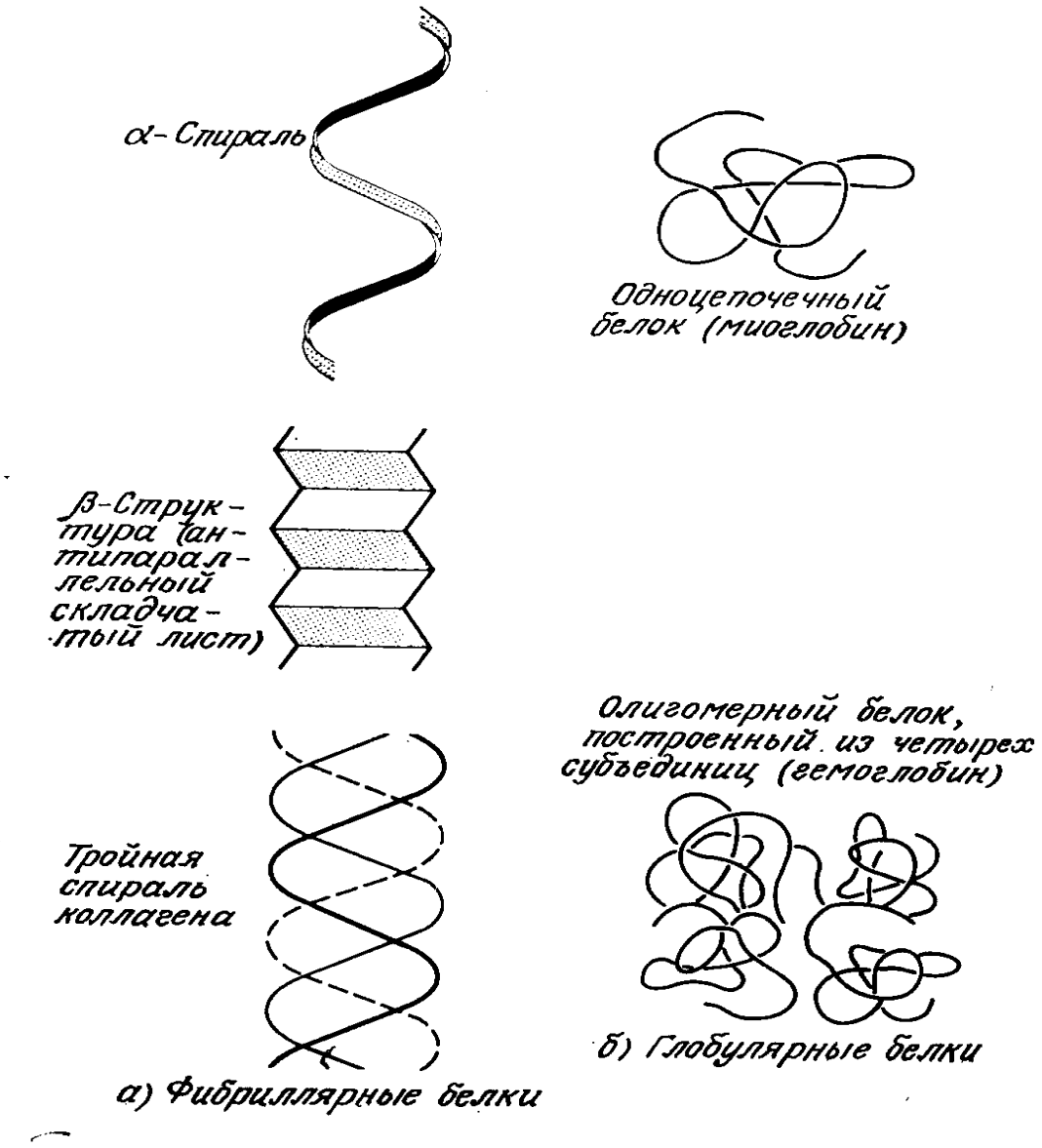


Рис. 3.12. Два основных типа структур белков и их варианты : а – фибриллярные; б – глобулярные

Полипептиды представляют собой сравнительно короткие цепи, построенные так же, как и белки, из аминокислотных остатков. По мере увеличения длины цепи физико-химические свойства полимера все в большей степени будут определяться природой групп R аминокислотных остатков, а роль концевых аминной и карбоксильной групп будет все менее и менее важной. Полипептидами принято называть относительно небольшие полиаминокислотные цепи, Многие полипептиды имеют большое биологическое значение, в частности, к числу полипептидов относится ряд гормонов, например инсулин, гормон роста соматотропин и соматостатин, хотя некоторые из этих гормонов принято считать белками (инсулин). Как видно из представленного примера граница между

полипептидами и белками весьма условна, обычно принято считать, что она лежит в пределах 50–100 аминокислотных остатков. Считая, что средняя молекулярная масса аминокислотного остатка составляет около 120 дальтон, можно условно сказать, что молекулярная масса белков должна превышать 10 000 дальтон.

Белки бывают *простыми и сложными. Простые белки* представляют собой полимеры, образующиеся путем конденсации одних только аминокислот. *Сложные белки* содержат в своей молекуле другие органические и даже неорганические группировки, называемые *простетическими группами*. Широко известным примером сложных белков является *гемоглобин*, переносчик кислорода в красных кровяных тельцах, в состав молекулы которого входят четыре группировки *гема,* представляющие собой железосодержащие металлорганические комплексы. В близком по структуре, но меньшим по молекулярной массе, *миоглобине* содержится один гем.

Способность белков выполнять множество специфических функций (см. табл. 3.3), большей частью обусловлена тем обстоятельством, что белки могут существовать в самых различных конформациях.

В целях облегчения анализа строения белков принято подразделять их структуру на три уровня, а при наличии нескольких полипепептидных цепей обычно рассматривают еще и четвертый уровень. Приведенные в табл. 3.3 данные показывают, что каждый структурный уровень определяется различными факторами, которые в сумме обеспечивают все разнообразие структур и функций белков.

Первичная структура белка подразумевает свойственную ему последовательность аминокислотных остатков. Первым белком (или полипептидом), у которого английскому биохимику Ф. Сенгеру (Нобелевский лауреат F. Sanger) удалось выяснить полную первичную структуру, был инсулин. Теперь можно считать доказанным, что для любого белка характерен не только определенный аминокислотный состав, но и *специфическая аминокислотная последовательность*, которая определяется нуклеотидной последовательностью ДНК.

В настоящее время известна аминокислотная последовательность многих полипептидов и белков, которая может быть получена в Интернете по адресу http://www.rcsb.org/pdb. В качестве примера на рис. 3.13 приведена аминокислотная последовательность фермента из яичного белка, называемого *лизоцимом*. Как уже ранее упоминалось, нумерация аминокислотных остатков начинается с N-конца, в данном случае с лизина, и завершается С-концевым остатком, которым в этом ферменте является лейцин.

Таблица 3.3

Структурные уровни организации белков

Уровень структуры	Анализ строения
1. Первичная	Последовательность аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями.
2. Вторичная	Способ расположения полимерной цепи в пространстве, обусловленный водородными связями между сравнительно близко расположенными аминокислотными остатками.
3. Третичная	Складывание и сгибание полипептидной цепи, обусловленное водородными, ионными и ковалентными (дисульфидными) связями, а также гидрофобным и гидрофильным взаимодействиями.
4. Четвертичная	Характер упаковки полипептидных цепей (субъединиц); стабилизируется теми же силами, что и третичная.

Боковые цепи аминокислотных остатков взаимодействуют друг с другом и с непосредственным окружением белка, тем самым, определяя геометрическую конфигурацию белковой молекулы. Складывание полипетидной цепи в строго определенную трехмерную структуру приводит к белковой молекуле сложной, запутанной формы типа изображенной на рис. 3.13, б для лизоцима. Такое сложное пространственное строение белка определяется в первую очередь его первичной структурой.

Значимость первичной структуры белков становится особенно очевидной, если учесть, что она в свою очередь определяется клеточной системой кодирования, как это будет показано в последующих разделах.

Таким образом, аминокислотная последовательность белков является как бы тем звеном, которое соединяет главный командный центр клетки, ДНК, со сложными, высокоспецифичными молекулами белков, осуществляющими и регулирующими разнообразные биохимические процессы, необходимые для роста и выживания клетки.

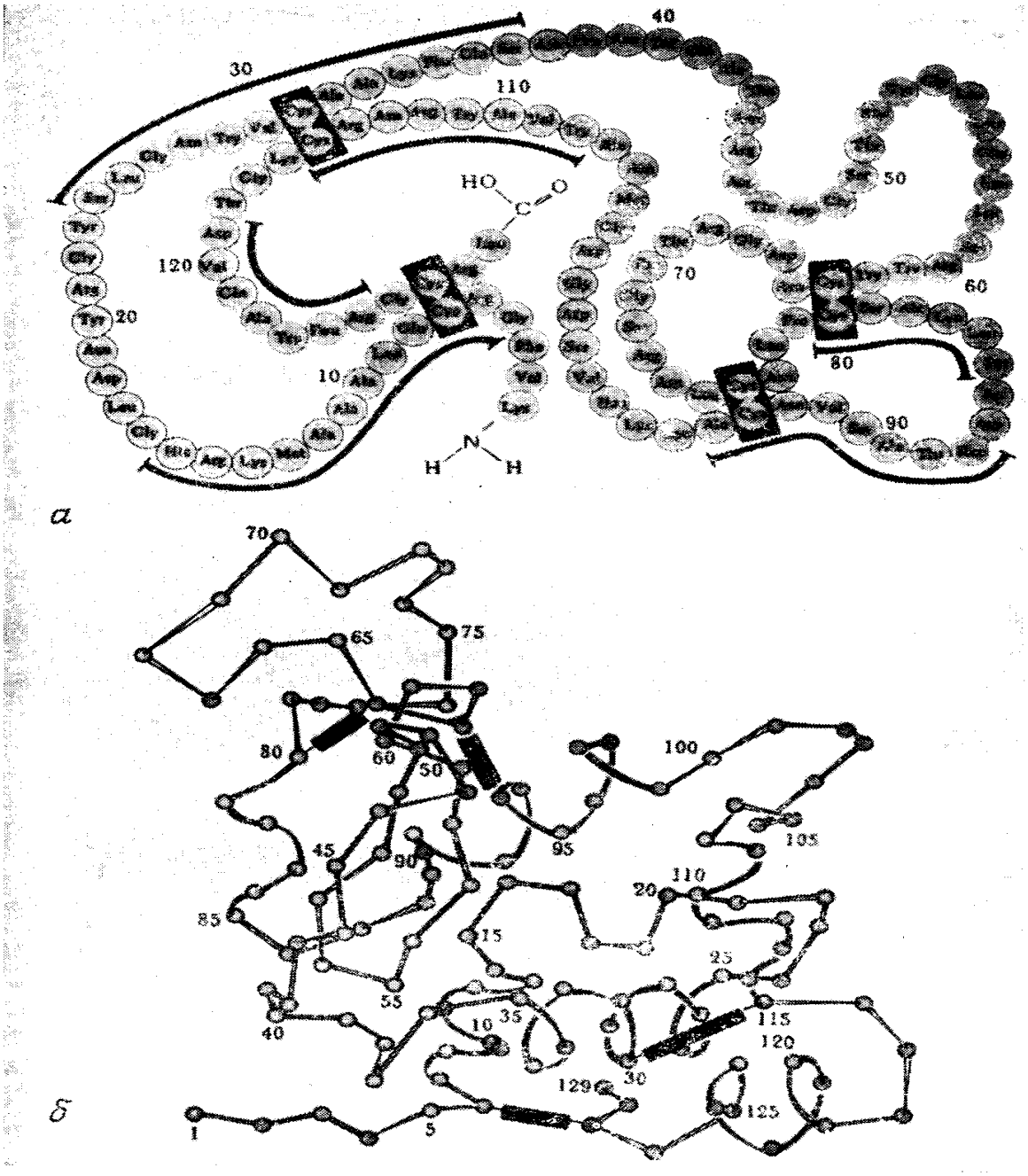


Рис. 3. 13. Лизоцим: а – аминокислотная последовательность или первичная структура фермента яичного белка лизоцима, б – трёхмерная (третичная) структура молекулы кристаллического лизоцима

Вторичная и третичная структуры. Под *вторичной структурой белков* понимают относительное расположение в пространстве аминокислотных остатков, занимающих соседние положения в аминокислотной последовательности. Напомним, что частичная двоесвязанность амидной связи обуславливает её планарность. По этой причине вращение возможно только вокруг двух из каждых трёх связей

пептидной цепи, что ограничивает число конформаций, которые может принимать короткий участок цепи, как это видно из рис. 3.14.

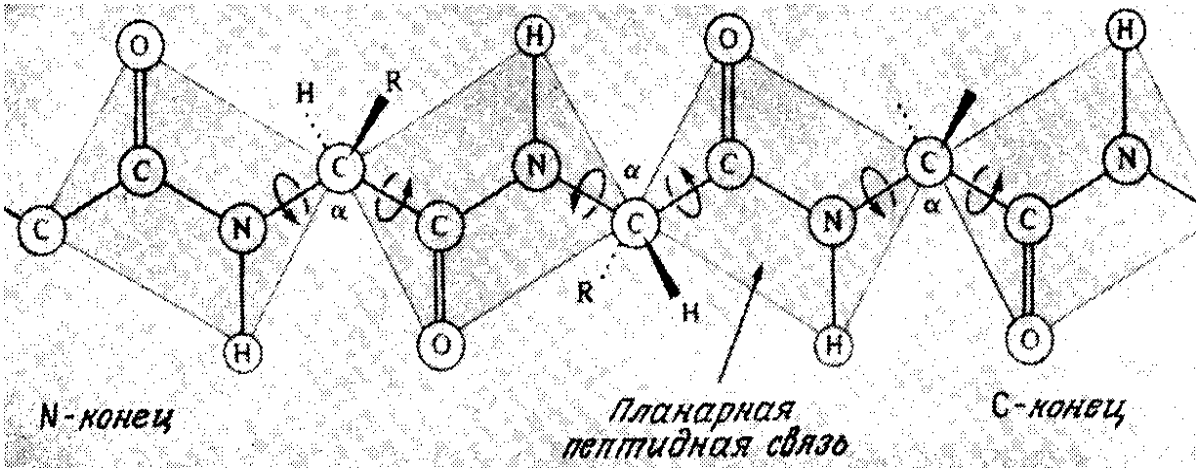


Рис. 3.14. Планарная природа пептидной цепи ограничивает вращение вокруг связей пептидной цепи

Существуют две основные формы вторичной структуры белков: *α-спираль* и *β-структура (β-слой)*. Считается, что конформация фибриллярных белков волос, шерсти и ряда других объектов стабилизируется водородными связями между атомами соседних аминокислотных остатков. При свертывании белковой цепи в спираль возможно образование таких связей между группой –C=O одного остатка и группой –NH– другого, отделенного от первого тремя аминокислотными остатками. Такое связывание без существенной деформации связей и углов полипептидной цепи возможно только при одной конформации, называемой α-спиралью. Предполагается, что в молекуле коллагена, самого распространенного белка высших животных, имеется три α-спиральных участка, объединенных в одну суперспираль. Жесткие и относительно малоэластичные молекулы коллагена выполняют механическую (опорную) функцию.

Коллаген обнаружен в коже, сухожилиях, роговице глаза и многих других органах. В последнее время фракции коллагена стали широко использоваться в пищевой промышленности в качестве частичной замены мясных белков (до 3%), в медицине как составная часть биосовместимых материалов и протезов, а так же в качестве матрицы для иммобилизации ферментов и клеток (биокатализаторы).

Водородные связи не отличаются высокой прочностью, поэтому α-спиральные структуры легко разрушаются. Так, например, белки могут

терять спиральную структуру в водных растворах в результате конкурентного образования водородных связей с молекулами воды. Если волокна шерсти обработать паром и растянуть, то белки шерсти принимают иную конформацию, называемую *β-структурой (β-слоем, складчатым слоем)*. Последняя характерна для нативных белков волокна шелка.

β-Структура также стабилизирована водородными связями, однако в этом случае они возникают между соседними параллельными цепями. Для этой структуры характерна гибкость и в то же время высокая устойчивость к растяжению.

Свойства вторичной структуры фибриллярных белков широко используются в пищевой промышленности. Некоторые пищевые продукты растительного происхождения, например, соевые бобы, являются ценными источниками незаменимых аминокислот; в то же время они не обладают консистенцией и текстурой мясных продуктов. Для придания им этих качеств растворенные глобулярные белки перерабатывают в так называемый «текстурированный белок» путем их трансформации в структуры, более близкие к линейным.

В результате трудоемких и сложных экспериментов удалось определить полное пространственное строение нескольких белков. Для этой цели выращивали кристаллы чистого белка, которые затем изучали методом рентгеноструктурного анализа. Этот метод собственно и позволил определить так называемую *третичную структуру белков*.

Как видно из рис. 3. 13, б и рис. 3. 15, третичная структура белков, особенно глобулярных, чрезвычайно сложна. На указанных рисунках можно найти области со спиральной вторичной структурой, а в молекуле лизоцима, кроме того, имеются участки с β-структурой.

Как показали многочисленные экспериментальные исследования, третичная структура стабилизируется несколькими типами связей. Так, взаимодействие между боковыми группами R, удаленными друг от друга в аминокислотной последовательности белков, определяют характер складывания или изгиба белковой цепи с образованием компактных конфигураций, типичных для глобулярных белков. Следовательно, в формировании трехмерной структуры участвуют ионные, водородные связи, а также гидрофобные взаимодействия между неполярными группами R, как это показано на рис. 3.15.

Подобно ранее рассмотренным мицеллам, образующимся из липидов, у многих глобулярных белков гидрофобные остатки сконцентрированы во внутренней части молекулы, а более гидрофильные группировки расположены на ее поверхности. Такая конформация, часто называемая *моделью масляной капли*, вероятно, наиболее устойчива в естественной для нативных белков водной среде.

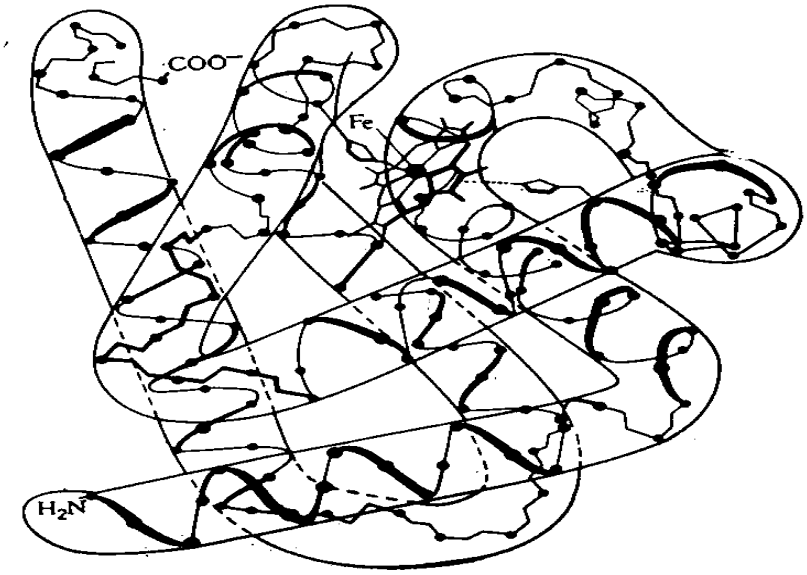


Рис. 3.15. Трёхмерная структура миоглобина. Точками указаны положения α-углеродных атомов 121 аминокислотного остатка в этом белке, выполняющим функцию переносчика кислорода. В середине верхней части молекулы более крупным кружком выделен атом железа, расположенный в центре единственного гема белка

Все эти слабые взаимодействия легко нарушаются при различных изменениях окружающей среды. В биологических системах энергия водородной связи составляет от 12 до 30 кДж/моль, а энергия ионной связи обычно равна 20–21 кДж/моль, поэтому уже умеренное нагревание может нарушить некоторые из этих связей. Изменение pH, ионной силы, физические воздействия и добавление к водным растворам органических растворителей, очевидно, могут привести к нарушению третичной структуры белков, свойственной им в нативной форме.

Как уже отмечалось ранее, в создании устойчивых конформаций белков важную роль играют также ковалентные связи, особенно часто образующиеся между двумя остатками цистеина. Дисульфидные мостики играют роль поперечных связей в полипептидной цепи, а иногда они связывают две различные цепи. Молекула инсулина, например, представляет собой две цепи, содержащие 21 и 30 аминокислотных остатков, соединенных между собой двумя дисульфидными связями. Третий дисульфидный мостик образует внутреннюю поперечную связь в более короткой цепи А, как это показано на рис. 3.16. По сравнению с указанными выше слабыми связями, дисульфидные ковалентные мостики более устойчивы к термическому воздействию. В то же время дисульфидные связи легко восстанавливаются избытком сульфгидрильных соединений, например β-меркаптоэтанолом.

Конформация белка в существенной степени определяет его биологическую активность. Многочисленные эксперименты

свидетельствуют о том, что во многих случаях белок способен выполнять свойственную ему функцию, только находясь в определенной трехмерной структуре. Этот принцип положен, в частности, в основу так называемой *модели «замка и ключа»,* достаточно наглядно объясняющей высокую специфичность белковых ферментов, катализирующих биохимические превращения.

Известно, что любой фермент способен катализировать превращения только определенных органических соединений, называемых обычно *субстратами.* Согласно модели замка и ключа, как это видно из рис. 3.17, фермент обладает специфическим участком «замком», который по своей структуре комплементарен (т.е. родственен) молекуле субстрата – «ключу». В связи с этим с ферментом могут связываться и подвергаться дальнейшим каталитическим превращениям только субстраты, обладающие необходимой пространственной структурой.

Полученные в ходе изучения третичной структуры белков экспериментальные данные не только подтвердили эту гипотезу, но и помогли глубже понять механизм каталитического действия ферментов.

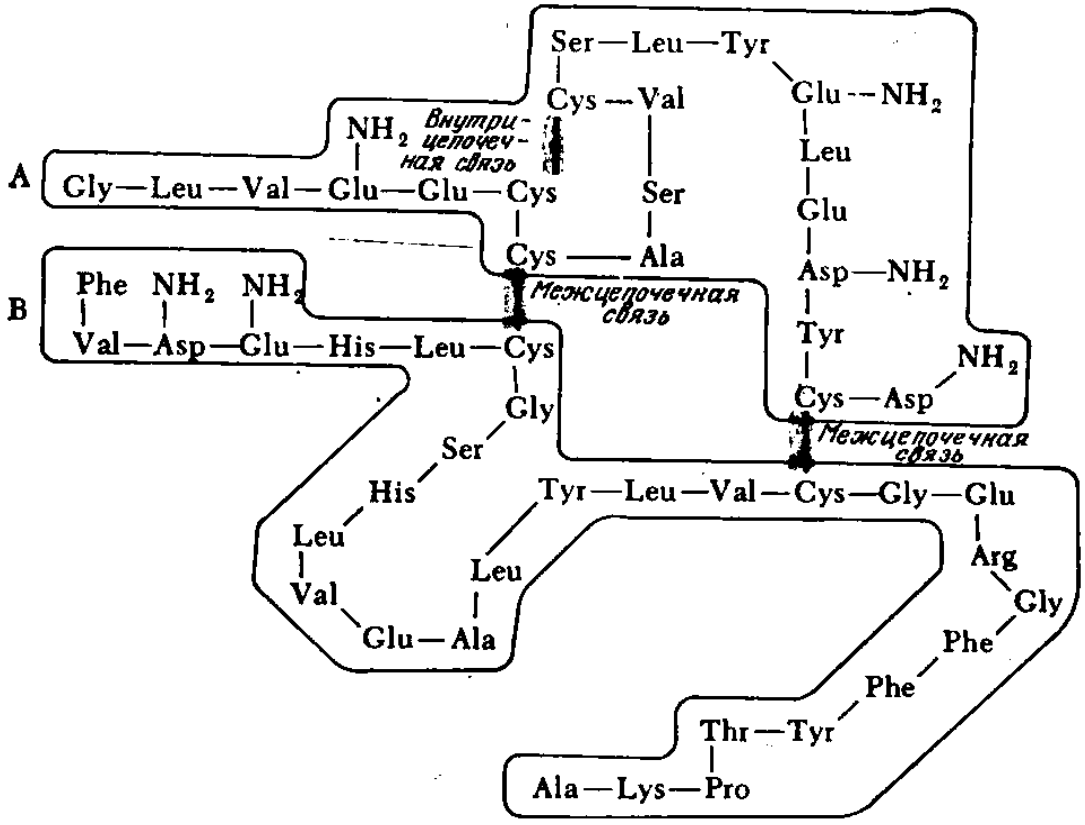


Рис. 3.16. Дисульфидные мостики связывают две пептидные цепи, называемые цепью А (21 аминокислотный остаток) и цепью В (30 остатков), в изображенной здесь молекуле бычьего инсулина; инсулины других видов животных построены аналогичным образом. Обратите внимание на третью внутрицепочечную дисульфидную связь между двумя остатками малой цепи А

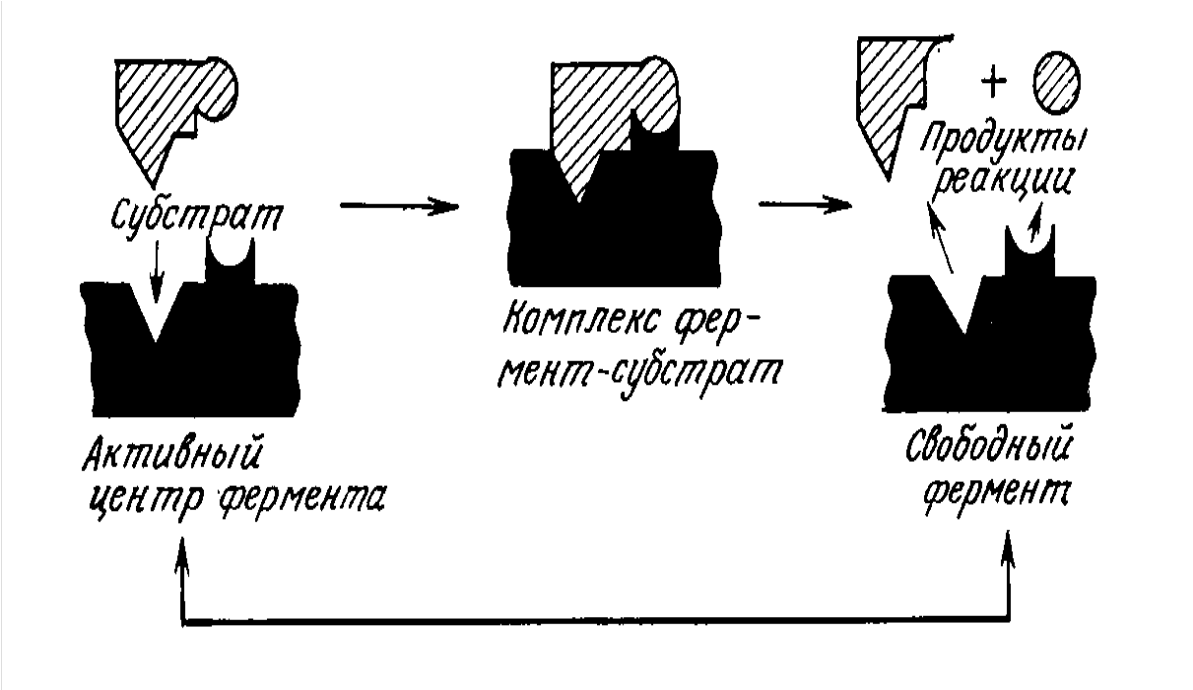


Рис. 3.17. Упрощенная схема модели ферментативного катализа типа «замок и ключ». Здесь форма каталитически активного центра фермента (замка) комплементарна форме субстрата (ключа)

Неоднократно показано, что непосредственная связь между пространственным строением белков и их высоко специфическими взаимодействиями с другими веществами характерна также для пермеаз, гормонов, антител и других белков.

Если белок находится в условиях, отличающихся от его обычного биологического окружения, он может подвергаться структурным изменениям, которые обычно сопровождаются потерей его функциональных свойств. Этот процесс обычно называют *денатурацией белка.* Денатурация может быть вызвана, например, относительно небольшими изменениями pH и температуры раствора. В этом случае, как правило, она не сопровождается разрушением ковалентных связей. При медленном охлаждении разбавленного раствора денатурированного белка до свойственной ему в природных условиях температуры может происходить обратный процесс, называемый *ренатурацией*, сопровождающийся восстановлением третичной структуры и, следовательно, функциональной деятельности белка, как это продемонстрировано на рис. 3.18.

Это явление объясняется тем, что как и в случае многих других превращений, повышение температуры способствует росту энтропии (разупорядоченности) системы и, следовательно, разрушению глобулярных структур белков. Охлаждение благоприятствует

осуществлению взаимодействий, обеспечивающих компактную структуру белка и его ренатурацию.

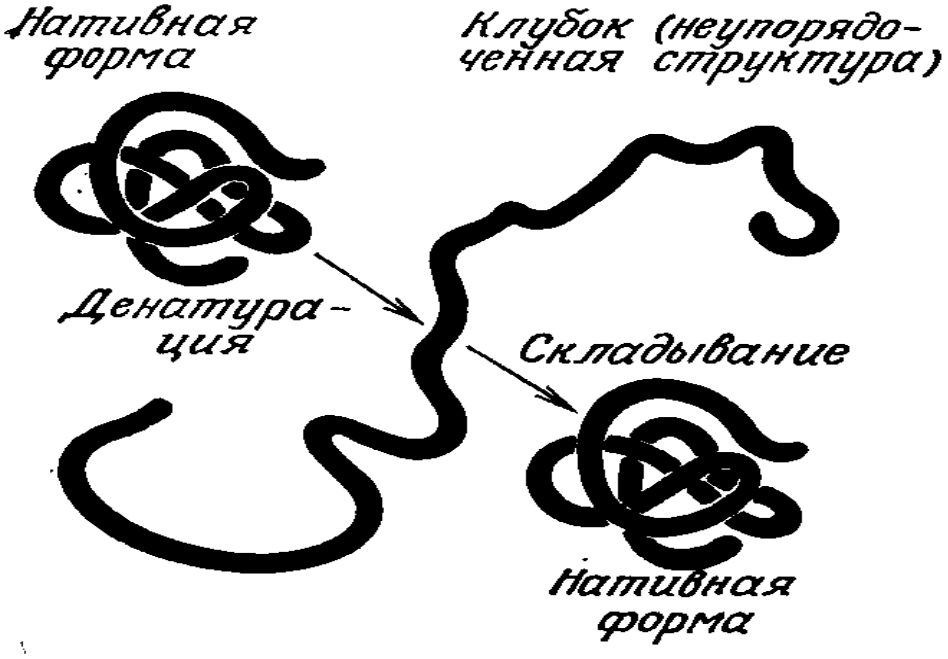


Рис. 3.18. Денатурированный под влиянием тех или иных факторов белок часто может вновь принять нативную биологически активную конформацию, как только действие этих факторов прекращается. Такого рода эксперименты показывают, что первичная структура белка определяет его вторичную и третичную структуры

Принимаемая белком и определяющая его свойства конформация характеризуется минимумом свободной энергии молекулы. Однако пока что эту концепцию нельзя использовать для предсказания структуры и функции белка, если известна только его аминокислотная последовательность, но она может оказаться полезной в тех случаях, когда требуется высказать обоснования предположения об изменении свойств белка в условиях конкретного технологического процесса. В частности, эта концепция помогает понять, почему связанный с твердой поверхностью фермент менее активен, чем тот же фермент в растворе.

Белки могут быть построены из нескольких полипептидных цепей, так называемых *субъедениц*. Из таких белков наиболее широко известен белок гемоглобин, который имеет *четвертичную структуру*. Следовательно, под *четвертичной структурой* белка понимают способ упаковки субъединиц. В настоящее время множество белков, в

особенности ферментов, представляют собой олигомеры и поэтому должны обладать четвертичной структурой.

Считается, что четвертичная структура стабилизируется теми же силами и связями, что и третичная, а иногда в ее стабилизации участвуют дисульфидные связи, как это было показано на рис. 3.16. Известно, что многие олигомерные белки способны к *самоконденсации*. Так, например, разделенные α- и β-цепи гемоглобина в растворе быстро ассоциируют с образованием молекул интактного гемоглобина. Это свойство белков особенно показательно в том смысле, что оно свидетельствует об определяющей роли биохимического одномерного кода ДНК, который характеризует не только первичную структуру белков, а следовательно, и их специфические биологические функции.

Имеющиеся в настоящее время данные показывают, что построение молекул некоторых белков из нескольких субъединиц обеспечивает выполнение по меньшей мере двух важных биологических функций: во-первых, регулирует каталитическую активность ферментов и, во-вторых, создает широкие возможности для построения родственных, но не идентичных молекул из одного и того же набора субъедениц.

Иллюстрацией последней функции могут служить белки, называемые *изоферментами* или *изозимами*. Изоферменты представляют собой различные молекулярные формы фермента, катализирующие одну и ту же реакцию в организмах одного вида. Существование изоферментов само по себе может показаться ненужным, однако на самом деле доступность параллельных, но различных каталитических процессов является важным элементом ряда систем биохимической регуляции.

Известно, что некоторые изоферменты представляют собой олигомерные белки, построенные иногда даже из пяти субъедениц. Подобная конструкция достаточно выгодна и целесообразна с биологической точки зрения, так как она позволяет синтезировать несколько различных белков всего лишь из двух полипептидных цепей.

3.16. Биохимические соединения смешанного строения

Существует много веществ биологического происхождения, представляющих интерес с научной или практической точки зрения, которые трудно отнести к одному из рассмотренных в предыдущих главах классов соединений. Эти вещества имеют смешанное строение и сформированы из остатков липидов, сахаров и аминокислот в различных сочетаниях. Как указано в табл. 3.4, соединения смешанного строения выполняют ряд важных биологических функций.

Клеточные стенки; пептидогликаны и липополисахариды. Ранее уже говорилось о том, что клеточные мембраны играют жизненно важную роль

в регуляции транспорта веществ в клетку и из клетки. В этом отношении не менее важны и другие структурные элементы наружных поверхностей клеток микроорганизмов и тканей. Совершенно очевидно, что условия существования микроорганизмов и тканей высших животных отличаются друг от друга. Например бактерии, живут в гораздо более изменчивом и менее контролируемом окружении, чем клетки печени, поэтому микроорганизмы должны обладать гораздо большей жесткостью, устойчивостью к физическим нагрузкам и резким изменениям осмотического давления. Отсюда следует, что по структуре наружные бактерии должны сильно отличаться от клеток микроорганизмов и тканей к физическим нагрузкам и резким изменениям осмотического давления.

Таблица 3.4

Некоторые примеры биохимически важных соединений смешанного строения, их основных элементов структуры и биологических функций

Название	Элементы структуры	Локализация в клетке, функция
Пептидогликаны	Связанные поперечными связями дисахариды и пептиды	Стенки клеток бактерий
Протеогликаны	Углеводы (95%) и белки (5%)	Соединительные ткани
Гликопротеины	Углеводы (1–30%), остальное – белки	Находятся в различных объектах, в том числе в антителах; являются компонентами наружных оболочек эукариот
Гликолипиды	Липиды, содержащие от 1 до 7 остатков сахаров	Компоненты мембран
Липопротеины	В липопротеинах плазмы от 1 до 50% белков, остальное – липиды	Мембраны, компоненты плазмы крови
Липополисахариды	Липид и в высшей степени вариабельная олиго-сахаридная цепь	Наружные оболочки грамотрицательных бактерий

В процессах биохимической технологии оболочки клеток представляют интерес в нескольких аспектах. Во-первых, свойства наружных поверхностей клеток определяет их способность к адгезии друг с другом, а также со стенками реакторов, трубопроводов и сепараторов. Химические и механические характеристики оболочек определяют также устойчивость клетки к воздействию физических, ферментативных и химических факторов, что существенно в процессах выделения компонентов клетки.

Как уже упоминалось выше при обсуждении реакции Грама, структуры грамположительных и грамотрицательных клеток сильно отличаются друг от друга. Как видно из рис. 3.19, у тех и у других оболочки состоят из нескольких слоев, но их положение, толщина и состав далеко не идентичны. На представленном рисунке не показаны различные белки, находящиеся внутри клеточной мембраны или закрепленные на ее поверхности, но тем не менее видно, что грамположительные бактерии имеют одну мембрану, а грамотрицательные – две аналогичные мембраны.

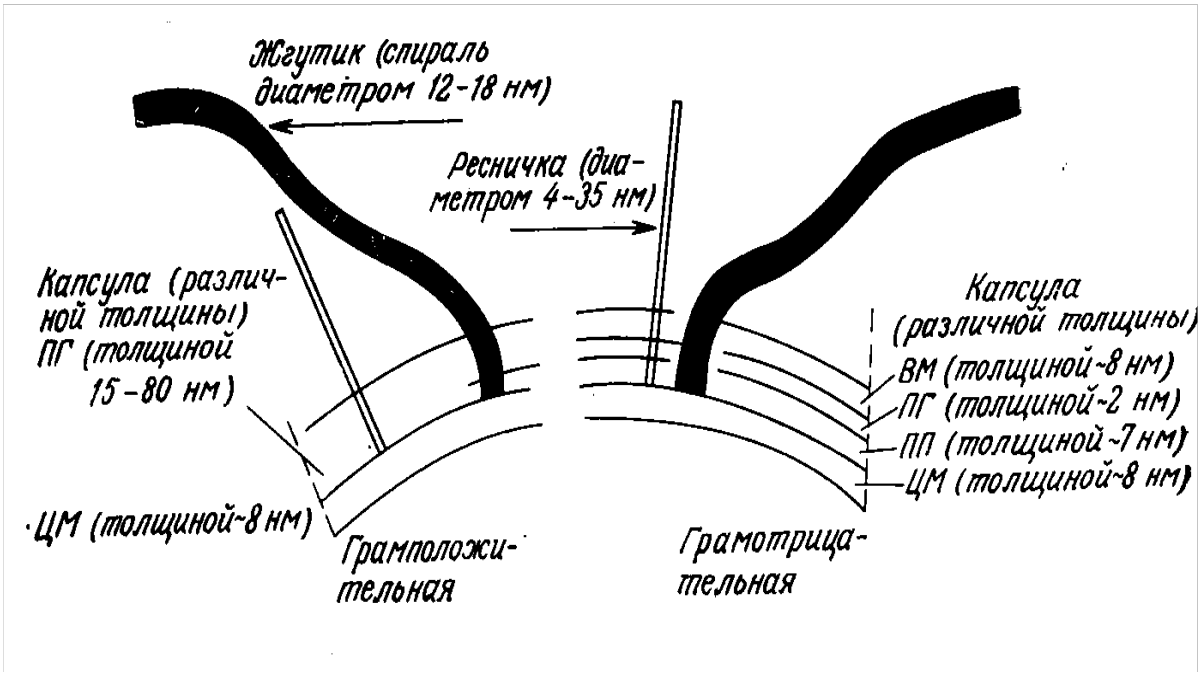


Рис. 3.19. Схематическое изображение структуры стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий. Обозначения: ЦМ – цитоплазматическая мембрана, ПГ – пептидогликан, ПП –периплазматическое пространство, ВМ – внешняя мембрана

Между наружной и цитоплазматической мембранами в грамотрицательных бактериях находится область, называемая *периплазматическим пространством* или *периплазмой*. В периплазматическом пространстве, включающем от 20 до 40% общей

массы клетки, находится ряд ферментов, а также белков, связывающих сахара и аминокислоты.

Из рисунка видно, что в грамположительных и в грамотрицательных бактериях непосредственно к внешней поверхности цитоплазматической мембраны примыкает *пептидогликановый слой* (ПГ). Пептидогликаны построены из остатков дисахарида, состоящего из N-ацетилмурамовой кислоты (NAM) и N-ацетилгюкозамина (NAG), связанных β-1,4-гликозидной связью, а также мостикового пентапептида, состоящего только из остатков глицина, и тетрапептида. Строение последнего зависит от вида микроорганизма. В *Staphylococcus aureus*, например, этот тетрапептид содержит остатки L-аланина, D-глутамина, L-лизина и D-аланина, как это показано на рис. 3.20.

Из рисунка видно, что в грамположительных и в грамотрицательных бактериях непосредственно к внешней поверхности цитоплазматической мембраны примыкает *пептидогликановый слой* (ПГ). Пептидогликаны построены из остатков дисахарида, состоящего из N-ацетилмурамовой кислоты (NAM) и N-ацетилгюкозамина (NAG), связанных β-1,4-гликозидной связью, а также мостикового пентапептида, состоящего только из остатков глицина, и тетрапептида. Строение последнего зависит от вида микроорганизма. В *Staphylococcus aureus*, например, этот тетрапептид содержит остатки L-аланина, D-глутамина, L-лизина и D-аланина, как это показано на рис. 3.20. Все перечисленные элементы структуры пептидогликанов связаны множеством поперечных связей, образуя как бы одну гигантскую макромолекулу, окружающую всю клетку.

Фермент лизоцим, структура которого была приведена ранее на рис.3.13, является эффективным антибактериальным агентом. В основу его бактерицидного действия лежит гидролиз β-1,4-гликозидных связей между остатками NAM и NAG пептидогликана, приводящий к разрушению и удалению пептидогликановой оболочки бактерий и таким путем к разрыву *(лизису)* клетки в гипотонических растворах (т.е. в растворах с низкой концентрацией NaCI). В лабораторных условиях в изотонической среде удается получить живые клетки, не содержащие пептидогликановых оболочек. После обработки лизоцимом в таких условиях образуются клетки, которые теряют свойственные им очертания и принимают сферическую форму; их называют *сферопластами*. В том случае, если клеточная стенка полностью удалена, то такие клетки называют *протопластами.*

Важными компонентами внешней части наружных мембран грамотрицательных бактерий являются *липополисахариды.* Некоторые липополисахариды называют *эндотоксинами,* поскольку они в высшей степени токсичны для млекопитающих. Токсичность липополисахаридов – одна из причин того, почему заражение крови

бактериями *E.coli* может быть чрезвычайно опасным. По этой причине при очистке белков, синтезируемых генетически трансформированной *E.coli*, необходимо тщательное удаление эндотоксинов.

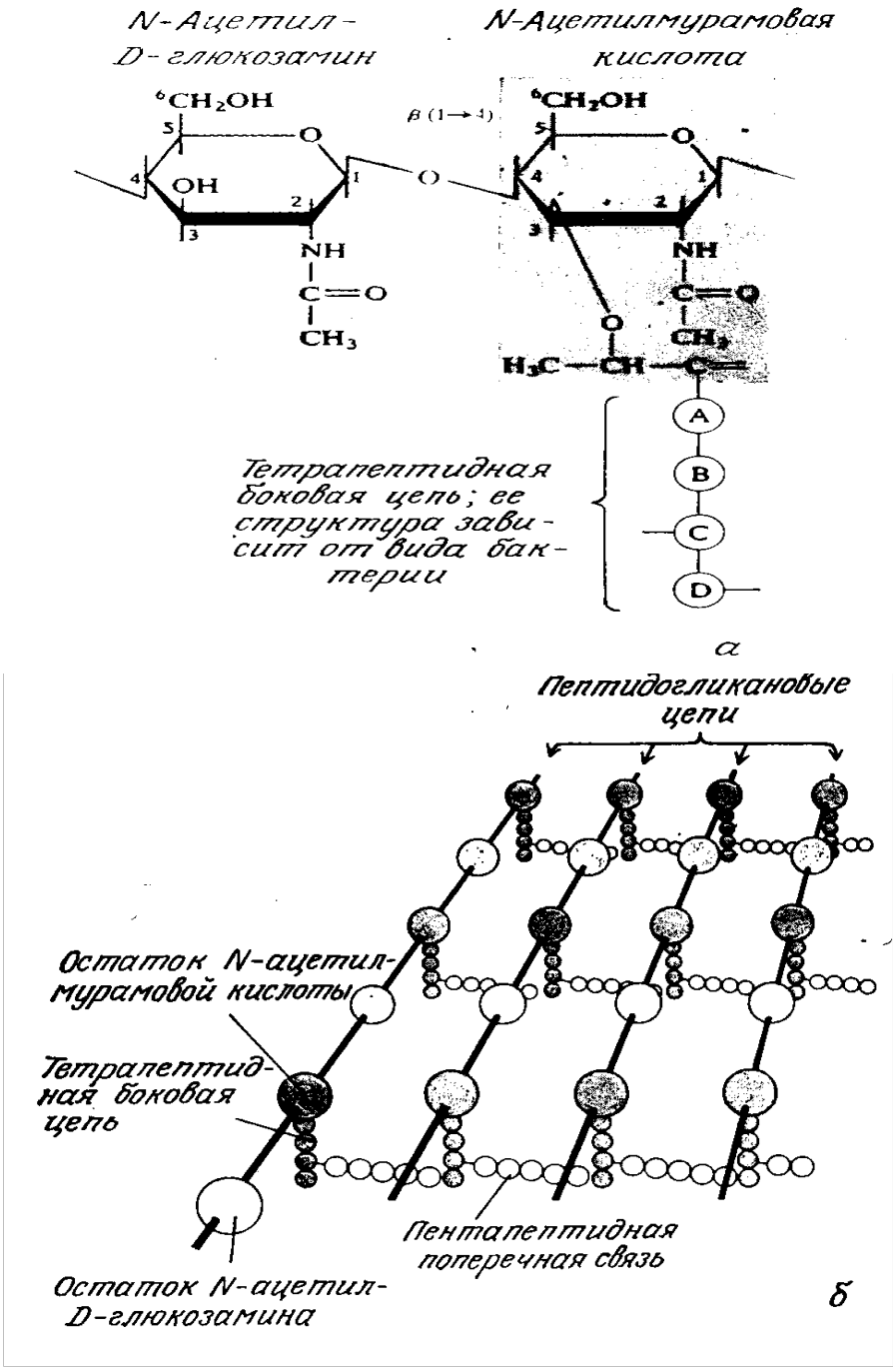


Рис. 3.20. Пептидогликаны: *а* – строение основных структурных элементов пептидогликанов; *б* – схематическое изображение пептидогликана клеточной стенки грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus,* содержащего большое количество поперечных связей

Молекулы липополисахаридов внешней мембраны имеют три участка: а) липидный компонент А, состоящий из шести ненасыщенных жирных кислот, углеводородные цепи которых проходят в мембрану; они связаны с остатком диглюкозамина; б) центральную олигосахаридную область, построенную из остатков десяти моносахаридов, некоторые из них относятся к числу редких сахаров; в) боковую О – цепь, состоящую из множества повторяющихся тетрасахаридных остатков. Центральная область и О-цепь направлены от клетки в среду. Таким образом, именно наружные боковые О-цепи взаимодействуют с иммунной системой зараженного животного. Путем мутаций бактерии могут достаточно быстро менять структуру О–цепей, что является частью системы их антиимунной защиты.

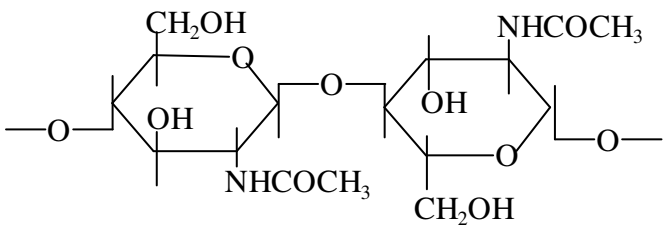
У многих видов микроорганизмов внешняя мембрана окружена *капсулой* или *слизистым слоем*, по химической природе являющимся полисахаридом.

Капсула одного из штаммов пневмококков (бактерий, вызывающих пневмонию) построена из чередующихся остатков глюкозы и глюкуроновой кислоты. Мутанты, не имеющие такой полисахаридной капсулы, не обладают патогенными свойствами.

Производство внеклеточных полисахаридов является важным промышленным процессом, например, как уже отмеченное выше производство декстрана. Слизистые слои, кроме того, принимают участие при флокуляции бактерий, являющейся важным этапом процессов обработки сточных вод методом активного ила.

Цитоплазматическая мембрана дрожжевых клеток состоит из липидов, белков и полисахаридов, содержащих остатки маннозы. За внешней стороной оболочки клетки сразу за цитоплазматической мембраной расположено периплазматическое пространство, окруженное в свою очередь клеточной стенкой. В пекарских дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* клеточная стенка содержит от 6 до 8 % белков, в том числе и несколько ферментов, а также приблизительно по 30% масс. *глюкана* – полисахарида, построенного из остатков D-глюкозы, соединенных β-1,6-связями, а также поперечными β-1,3-связями, и *маннана* – полиманнозы с α-1,6-связями и α-1,2-боковыми цепями. При обработке *S. cerivisiae* ферментом, гидролизующим глюкан, например 1,3-глюканазой, можно получать соответствующие протопласты, Такую обработку обычно проводят при введении рекомбинантных молекул ДНК в дрожжевые клетки.

Клеточные стенки дрожжей и многих плесеней содержат *хитин,* макромолекула которого построена из остатков N-ацетилглюкозамина, соединенных гликозидными β-1,4-связями, как это приведено на нижеследующей схеме.



Хитин

Животные клетки, существующие в строго контролируемом изотоническом окружении, не имеют клеточных стенок. Помимо фосфолипидов и белков в их плазматических мембранах содержится от 2 до 10 % углеводов. Последние обнаружены на внешней поверхности всех клеток млекопитающих, изученных до настоящего времени.

Как показали исследования, обнаруженные углеводы связаны с липидами и белками в виде гликолипидов и гликопротеинов соответственно.

Антитела и другие гликопротеины. Белки, содержащие ковалентно связанные остатки моносахаридов или коротких олигосахаридных цепей, называют *гликопротеинами.* Гликопротеины самых различных типов обнаружены в эукариотах и окружающей их среде. К числу гликопротеинов относится ряд ферментов, например глюкозооксидаза, продуцируемая *Aspergillus niger*. Так, вышеупомянутый коллаген – биологический опорный элемент – также представляет собой гликозилированный белок. Гликопротеинами являются и некоторые интерфероны, мощные противовирусные агенты. По сути дела, большая часть белков эукариот, контактирующих с окружением клетки или выделяемых ею в среду, представляет собой гликопротеины. Некоторые гликопротеины уже стали или, по всей вероятности, в ближайшее время станут ценными промышленными продуктами.

К гликопротеинам относятся и антитела – важнейшее оружие иммунной защиты позвоночных. Как показывают исследования, с помощью методов слияния клеток можно получать в значительных количествах гомогенные антитела в организмах животных или в биологических реакторах, что позволяет уже сейчас применять их для диагностических целей, введения лекарственных препаратов и разделения биологически важных веществ, например очистки человеческого инсулина, полученного генно-инженерным путем. Совершенно очевидно, что в будущем сферы использования этих белково – углеводных структур будут увеличиваться.

Известно, что в состав иммунной системы позвоночных входят *β-клетки,* принадлежащие к одному из двух типов обнаруженных в организме лимфоцитов. В присутствии чужеродного вещества (вируса или клетки), обычно называемого *антигеном,* β-клетки дифференцируются и

образуют плазматические клетки, которые выделяют антитела. Последние специфически связывают антигены. Образующийся комплекс антиген – антитело осаждается и выводится из организма.

Антитела представляют собой особый класс белков, называемых *иммуноглобулинами.* Свойственные иммуноглобулинам общие детали структуры изображены на рис. 3.21.

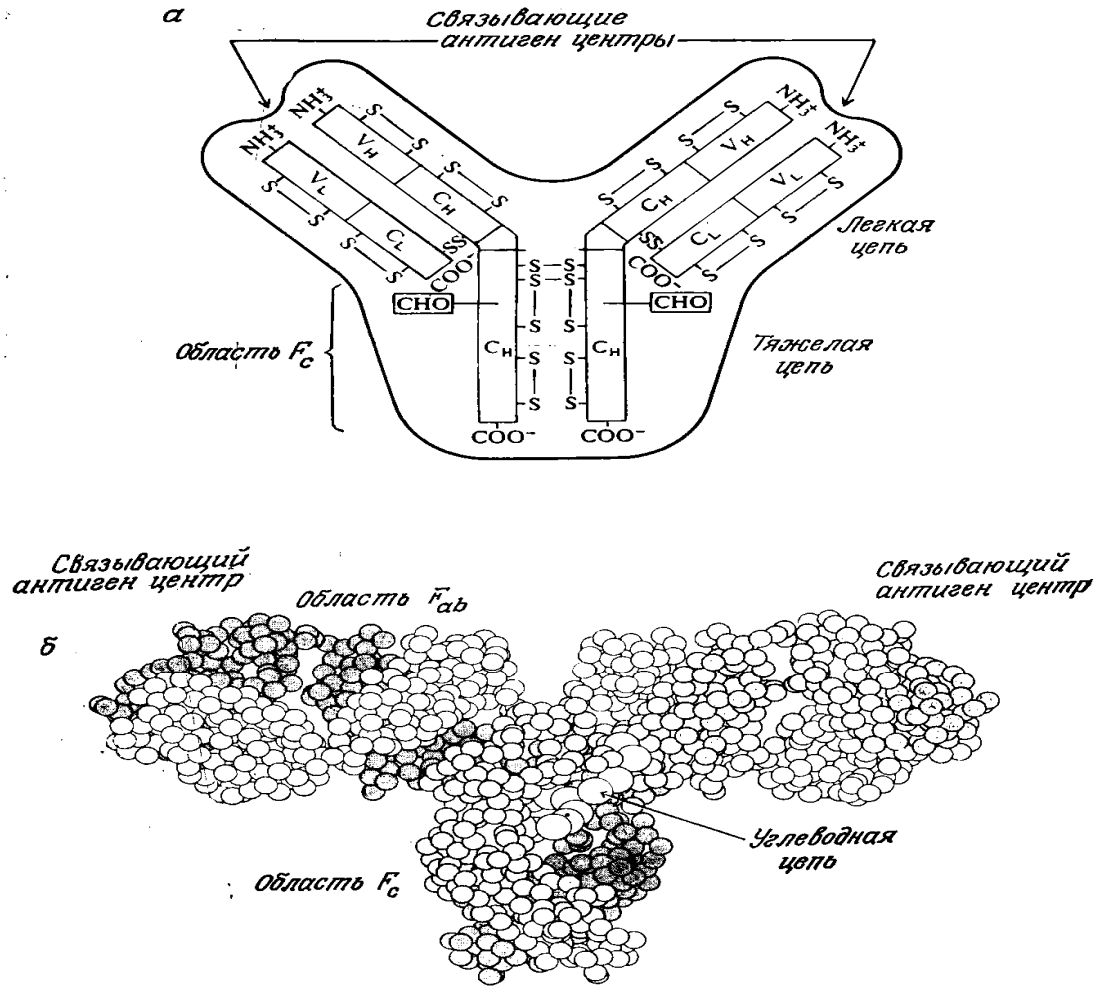


Рис. 3.21. Иммуноглобулины: *а* – схематическое изображение структуры иммуноглобулина. Символами C и V обозначены постоянные и вариабельные части цепей соответственно, а индексами H и L- тяжелые и легкие цепи соответственно. Показаны дисульфидные связи, а также место присоединения углеводного остатка (CHO) к тяжелым цепям. Область ствола (F_c) и центр, связывающий антиген, расположены на карбоксильном и аминном концах тяжелых цепей соответственно. Специфичность связывания антигена и сродство к нему определяется вариабельными частями как тяжелых, так и легких цепей; *б*-молекулярная структура антитела IgG, иммуноглобулина G

Молекула иммуноглобулина состоит из двух идентичных, более длинных «тяжелых» цепей, связанных друг с другом дисульфидными связями, а нековалентными связями с двумя другими, также идентичными,

но более короткими «легкими» цепями. В наиболее широко распространенном классе иммуноглобулинов, обозначаемом IgG, легкие и тяжелые цепи имеют молекулярные массы 23000 и 53000 дальтон соответственно. С-Концевые участки как легких, так и тяжелых цепей, практически не отличающиеся по структуре в иммуноглобулинах одного типа, называют *постоянными участками*. Область F_c, представляющая собой ствол молекулы антитела, построена из С-концевых последовательностей постоянных участков тяжелых цепей.

Дифференциация антител в пределах одного типа осуществляется прежде всего в N-концевых участках цепей, называемых *вариабельными.* Связывающий антиген активный центр антитела – *паратоп* – формируется из вариабельных участков легких и тяжелых цепей. Как и в случае ферментов, центры, связывающие антиген, в различных антителах могут существенно различаться по своей специфичности и сродству к антигенам.

3.17. Иерархия клеточной структуры

По мере роста живой клетки в ней должен постоянно осуществляться синтез всех рассмотренных выше биологически активных веществ и биополимеров. Обычно питательная среда клетки состоит из сахаров, диоксида углерода, некоторых аминокислот, воды и ряда неорганических ионов, а биополимеры и ряд необходимых для их построения мономеров, как правило, отсутствуют. Таким образом, клетка должна синтезировать все другие необходимые ей аминокислоты, нуклеиновые кислоты, липиды, белки и другие вещества из имеющихся простейших предшественников.

В клетке существует множество *надмолекулярных структур* таких, как клеточная мембрана, которая, как уже говорилось ранее, представляет собой сложное сочетание молекул многих типов, рибосомы, являющиеся специфическим комплексом нескольких различных белков и нуклеиновых кислот.

Во многих случаях ферменты, катализирующие несколько последовательных химических реакций, объединены в одном ферментном комплексе, в котором, по-видимому, обеспечивается максимальная эффективность использования различных промежуточных соединений. Последний по сложности уровень организации, непосредственно предшествующий самой клетке, занимают органоиды типа митохондрий и хлоропластов. Различные уровни сложности всех этих биологически активных соединений от простейших химических веществ до клетки схематически изображены на рис. 3. 22.

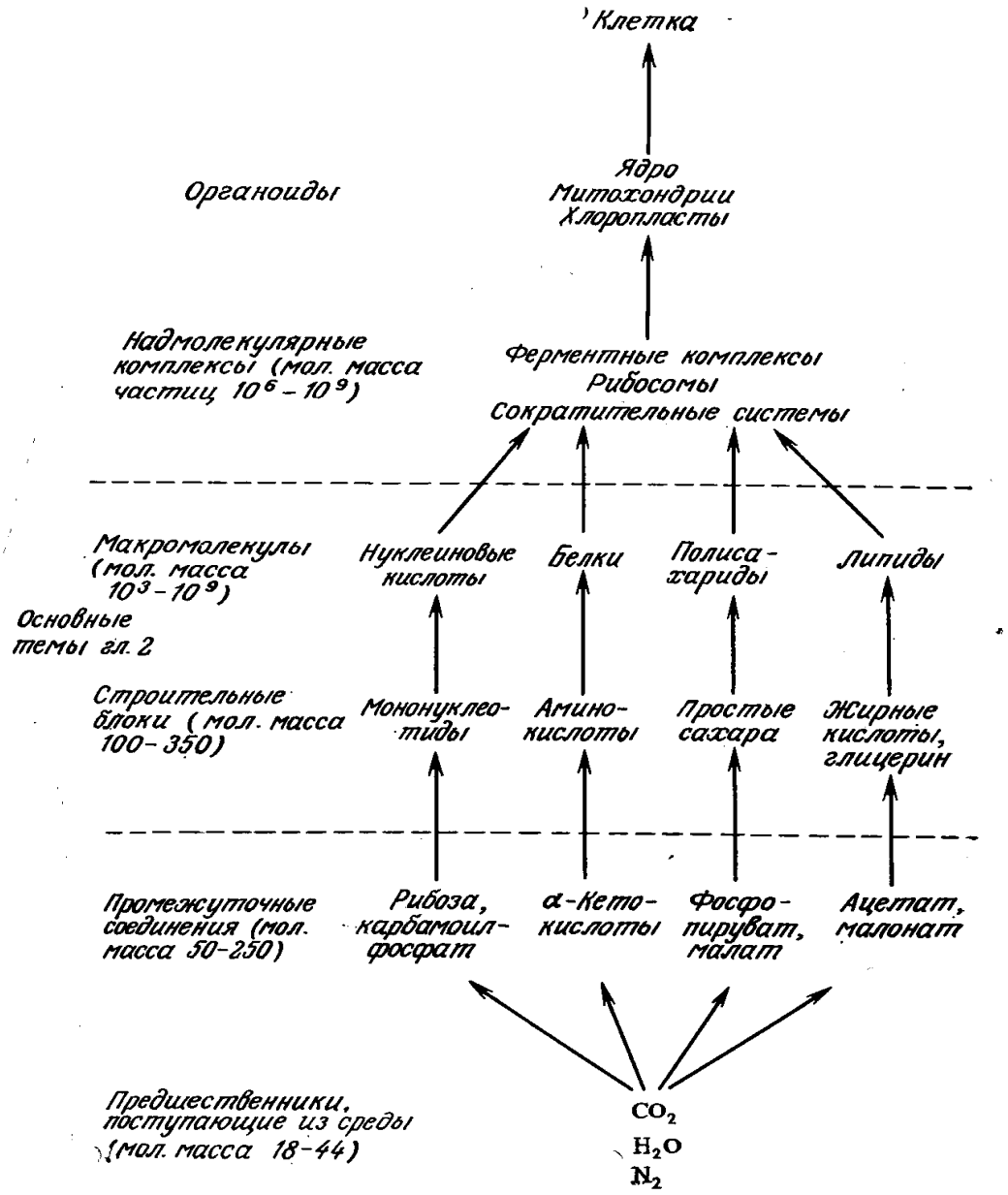


Рис. 3.22. Распределение биологически важных веществ в порядке усложнения их структуры и повышения степени организации

Общая схема локализации различных биологически важных соединений, рассмотренных в данной главе, в наиболее простой клетке микроорганизма – прокариоты приведена на рис. 3.23. Небольшие молекулы типа аминокислот и простых сахаров, а также некоторые, значительно большие молекулы, например ряд ферментов и т-РНК, равномерно распределены по всему объему цитоплазмы. Другие биополимеры локализованы в определенных участках внутри клетки или на ее поверхности, например на клеточной мембране.

Связь между различными ионами, питательными веществами, промежуточными соединениями и другими составными частями клетки

обычно осуществляется с помощью разветвленной сети химических реакций, некоторые из которых будут рассмотрены в последующих главах.

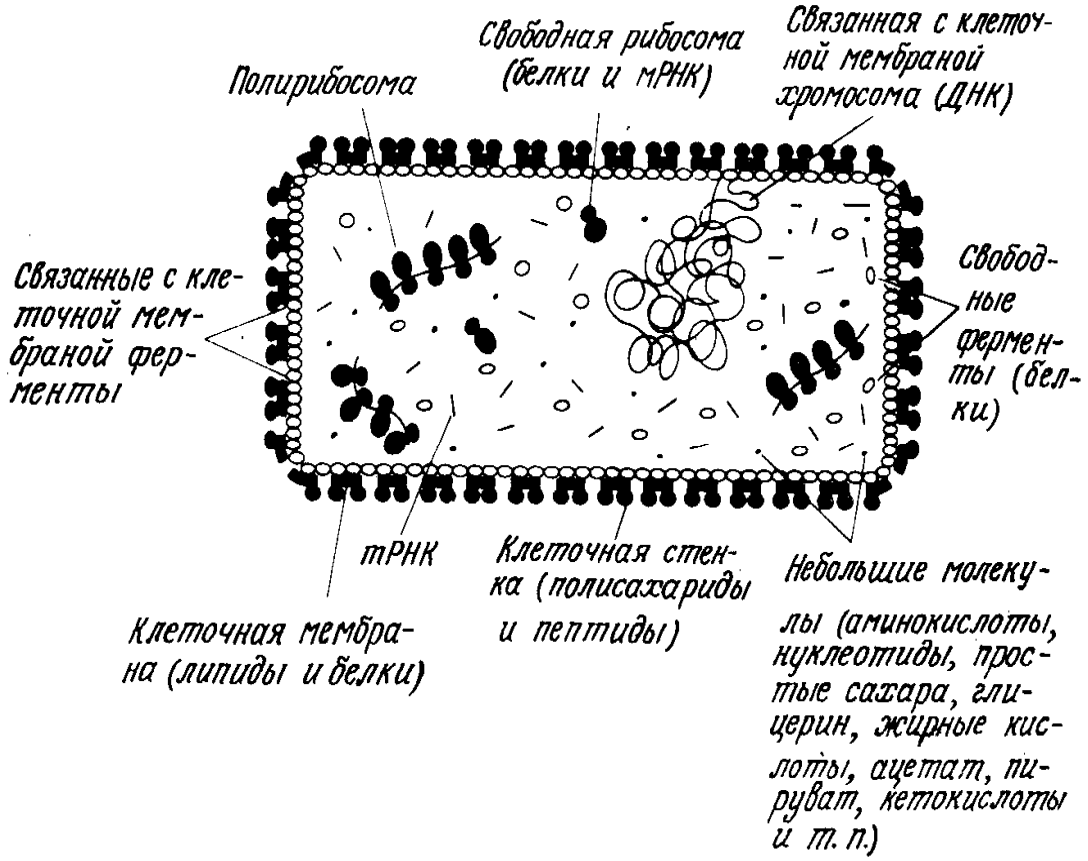


Рис. 3.23. Схема компартментализации биологически важных молекул в клетке кишечной палочки *E. coli*

Большинство из всех этих химических реакций катализируется ферментами, которые обеспечивают их осуществление в мягких условиях, способствующих сохранению конформации и конфигурации белков. Рассмотрению свойств этих биологических катализаторов и будут посвящены следующие главы.

Глава 4

ФЕРМЕТЫ, ИХ СВОЙСТВА, КИНЕТИКА КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ИМИ РЕАКЦИЙ

Ранее мы уже неоднократно упоминали, что ферменты (энзимы) занимают одно из ключевых мест в биотехнологии. Первым, кто выделил активные ферменты из живых клеток в 1897 г. был немецкий биохимик Э. Бухнер.

Его работы имели большое значение с двух точек зрения. Во-первых, было показано, что работающие в живом организме катализаторы могут функционировать независимо от любого другого клеточного процесса, во-вторых, открытие Э. Бухнера стимулировало работы по выделению и очистке индивидуальных ферментов. В чистом виде один из таких ферментов – *уре**аза*** был впервые выделен американским биохимиком Дж. Самнером в 1926 г. Кропотливые и скрупулезные исследования этого фермента показали, что он является белком. Сейчас известно, что все ферменты представляют собой белки.

В настоящее время число выделенных и охарактеризованных ферментов достигло уже 1500, но на самом деле их существенно больше, так как, например, единственная молекула ДНК, составляющая хромосому *E.coli*, несет в себе информацию, достаточную для кодирования структур от 3000 до 4500 различных белков.

К сожалению, не существует общих правил номенклатуры, применимых ко всем ферментам. В большинстве случаев в названии фермента отражается его *функция,* а не *строение.* Обычно к названию субстрата добавляется суффикс **–аза.** Например, уре**азой** называют фермент, катализирующий разложение мочевины. Иногда тот же суффикс добавляется к названию реакции, которую катализирует данный фермент. Так, фермент, который катализирует окислительное дегидрирование спирта, носит название *алкогольдегидроген**аза***. Исключения из этого правила представляют исторически сложившиеся названия ферментов. Сюда относятся *пепсин* и *трипсин*, выделенные из пищеварительного тракта человека, используемый в сыроделии *реннин* и некоторые другие ферменты.

Ферменты катализируют реакции шести основных типов, которые лежат в основе системы классификации и условного цифрового обозначения этой группы веществ, рекомендованной Комиссией по ферментам (КФ) (см. табл. 4.1). Эта «официальная» система позволяет выразить в табличной форме и классифицировать выполняемые ферментами разнообразные функции, хотя наряду с ней до сих пор используется и прежняя более традиционная номенклатура ферментов.

Во избежание недоразумений следует вспомнить, что такое вообще катализатор. Как известно, катализатором называют вещество, которое повышает скорость химической реакции, не претерпевая при этом необратимых химических изменений. Повышая скорость химической реакции, катализатор в то же время не нарушает равновесия реакции.

Для изучения какой-либо реакции и разработки соответствующего технологического процесса необходимо располагать математическим выражением, определяющим *скорость реакции*, т.е. число молей вещества, реагирующих в единицу времени в единице объема, в зависимости от состава, температуры, давления и других параметров реакционной смеси.

Аналогия между синтетическими катализаторами и ферментами не заканчивается на принципах моделирования кинетики реакций. Математические выражения, определяющие скорости реакций, катализируемых этими двумя типами катализаторов очень близки, а иногда даже идентичны. Это объясняется тем, что в обоих случаях, как известно, в качестве промежуточного соединения образуется тот или иной комплекс реагирующего вещества (субстрата) с катализатором. Общий механизм каталитических процессов, естественно, приводит к одинаковым выражениям для их скоростей реакции.

Т а б л и ц а 4.1

Классификация ферментов в соответствии с рекомендациями Международной комиссии по ферментам

1. **Оксидоредуктазы**
(окислительно-восстановительные реакции)

1.1. Действуют на группу —CH(|)—OH

1.2. Действуют на группу —C(|)=O

1.3. Действуют на группу —CH=CH—

1.4. Действуют на группу —CH(|)—NH_2

1.5. Действуют на группу —CH(|)—NH—

1.6. Действуют на группу NADH, NADPH

2. **Трансферазы**
(перенос функциональных групп)

2.1. Переносят одноуглеродные остатки
2.2. Переносят альдегидные и кетонные группы
2.3. Переносят ацильные группы
2.4. Переносят гликозильные группы
. . . . . .
2.7. Переносят фосфатные группы
2.8. Переносят группы, содержащие серу

Продолжение табл. 4.1

3. **Гидролазы**
(реакции гидролиза)
3.1. Действуют на сложноэфирные связи
3.2. Действуют на гликозидные связи

. . . .

3.4. Действуют на пептидные связи
3.5. Действуют на C—N-связи, отличающиеся от пептидных связей
3.6. Действуют на кислотно-ангидридные связи

4. **Лиазы**
(присоединение по двойным связям)

```
           |   |
4.1.  —C=C—
                   |  |
4.2.           —C=C—

            |
4.3.  —C=N—
```

5. **Изомеразы**
(реакции изомеризации)
5.1. Рацемазы

6. **Лигазы**
(образование связей, сопровождающихся расщеплением ATP)
6.1. Образуют C—O-связи
6.2. Образуют C—S-связи
6.3. Образуют C—N-связи
6.4. Образуют C—C-связи

В то же время нельзя забывать и о существенных различиях между синтетическими катализаторами и ферментами: подавляющее большинство синтетических катализаторов *неспецифично* в том смысле, что они могут катализировать аналогичные реакции с участием самых разнообразных реагентов.

Некоторые ферменты также не отличаются высокой специфичностью, но многие катализируют только одно превращение весьма ограниченного числа субстратов. Обычно степень *специфичности* фермента соответствует его биологической функции. Высокая специфичность нежелательна, например, для фермента, основная задача

которого заключается в гидролизе белков до небольших пептидов и аминокислот. Однако фермент, катализирующий трансформацию одного конкретного соединения, должен быть в высшей степени специфичным. Как уже упоминалось ранее, специфичность фермента обусловлена его сложной объемной структурой, позволяющей создать в молекуле фермента «замок», т.е. *активный центр,* ответственный за каталитические свойства фермента.

Еще одним отличительным свойством многих ферментов является наличие в их молекуле *кофакторов*, необходимых для проявления ферментативной активности. Ранее уже говорилось о том, что кофактором могут быть как органические, так и неорганические соединения, т.е. соединения небелковой природы, которые, связываясь с неактивным белком – *апоферментом*, приводят к образованию активного комплекса. Последний биохимики часто называют *галоферментом* или просто ферментом. Как уже отмечалось, существуют два вида кофакторов: ионы металлов и сложные органические соединения, например, витамины, нуклеозиды и др, которые получили название *коферментов*. В том случае, если кофакторы связаны с ферментом слабыми нековалентными связями, то существует определенное равновесие между ферментом, апоферментом и кофактором. Некоторые небелковые структуры, прочно связанные с ферментом, также являются коферментами (например, гем в гемоглобине, миоглобине и цитохроме С). Они обычно носят название простетических групп.

Как синтетические, так и биологические катализаторы в ходе выполнения своей каталитической функции постепенно утрачивают активность, но ферменты, как правило, гораздо менее долговечны. Сложная пространственная структура ферментов, обуславливающая их необычайно высокие специфичность и активность, легко нарушается, что приводит к потере ферментом его каталитических свойств.

Часто утверждают, что ферменты более активны и существенно сильнее увеличивают скорость реакции, чем синтетические катализаторы. Однако следует помнить, что это утверждение относится к условиям, наиболее благоприятным для действия фермента, например оптимальная температура и pH среды. При более высоких температурах или существенном изменении pH среды структура белка обычно нарушается и фермент может вообще утратить свою активность, тогда как синтетический катализатор будет действовать еще в течение долгого времени.

4.1. Выделение ферментов

Ферменты встречаются в природе в виде сложных многокомпонентных комплексов с другими моно- и биополимерами, что

существенно осложняет их изучение. Поэтому желательно иметь дело если и не с индивидуальными, то, по крайней мере, с наиболее чистыми образцами, содержащими минимальное количество примесей. Можно, конечно, в некоторых случаях, пользуясь достаточно специфическими методами определения активности, исследовать и неочищенные ферменты, что достаточно часто практикуется в действительности. Однако в большинстве случаев примеси других белков и, прежде всего, других ферментов мешают глубокому изучению выделяемого фермента. Иногда эти примеси действуют на субстрат, и тогда появляются продукты побочных реакций, а иногда – на продукт реакции, который превращается в какое-либо другое вещество. Они могут также действовать и на кофермент и даже на сам фермент, поэтому до тех пор, пока фермент не получен в достаточно чистом виде, трудно с уверенностью сказать, какую именно реакцию он катализирует.

Часто после очистки ферментов обнаруживают, что реакции, казавшиеся простыми, на самом деле включают несколько отдельных этапов, причем каждый из этапов катализируется своим особым ферментом. Примером может служить цикл лимонной кислоты, механизм которого стал ясен только тогда, когда удалось выделить фермент, катализирующий образование цитрата.

Для наиболее эффективного выделения ферментов прежде всего следует найти источник, наиболее богатый этими ферментами. Обычно такой источник находят по определению ферментативной активности исследуемого материала, которая выражается по количеству субстрата превращенного в продукт в единицу времени или по количеству продукта, образующегося из субстрата в единицу времени, например, моль/час или ммоль/сек. При определении ферментативной активности обязательно нужно быть знакомым и с методом определения белка в препарате, например, с методом Кьельдаля, с методом Фолина или с другими методами, каждый из которых применяется в том или в ином случае.

Когда источник богатый данным ферментом найден, фермент необходимо перевести в раствор; для этого обычно приходится разрушать оболочку клетки. Как правило, ферменты легче выделять из тканей животных, чем из биомассы микроорганизмов. Часто для извлечения фермента из измельченной ткани печени или мышцы достаточна простая экстракция образца водой. При работе с тканью, для которой характерен интенсивный гликолиз, должны быть приняты меры, предупреждающие подкисление, иначе может быть поврежден фермент. В таких случаях образец ткани лучше всего экстрагировать буферным раствором.

В целях наиболее полного извлечения фермента и разрушения клеточной оболочки или клеточных стенок может быть использована гомогенизация клеток, осуществляемая различными методами. Часто

используется ультразвуковая обработка клеток, их автолиз в водной среде в присутствии толуола, хлороформа, этилацетата или Na_2S.

Возможно также добиться эффективного разрушения клеток их предварительной обработкой ацетоном с последующим удалением растворителя. В последнее время стал широко использоваться лизис клеток с помощью других ферментных препаратов, например, лизоцима.

Для последующей экстракции ферментов обычно используют водный ацетон, водный бутиловый спирт, водные растворы детергентов, таких как твин, тритон и другие поверхностно-активные вещества (ПАВ). Следует по возможности избегать контакта выделяемого фермента с протеиназами, которые могут гидролизовать фермент и тем самым привести к потере активности. При обработке бутанолом, дающим при выделении некоторых ферментов очень хорошие результаты, по-видимому, разрушается липопротеидный комплекс, в результате чего фермент переходит в водную фазу. Обработка детергентами, о которой уже было упомянуто, по мнению исследователей, приводит иногда к истинному растворению фермента, который и после удаления детергента остается в виде прозрачного раствора.

Методы фракционирования. В получаемом экстракте помимо фермента присутствуют и ряд других веществ различной молекулярной массы. Малые молекулы могут быть удалены диализом или другими методами, после чего в экстракте остаются крупные молекулы – преимущественно молекулы белков с примесями полисахаридов.

Последующая очистка фермента состоит в основном из серии фракционирований, при которых фермент отделяют от других белков, присутствующих в растворе. В настоящее время пользуются относительно небольшим числом стандартных приемов, которые оказались особенно эффективными и удобными. При всех методах фракционирования следует уделять особое внимание двум факторам, которые сильно влияют на результаты, а именно значению pH и концентрации электролитов.

На каждом этапе фракционирования суммарный белок делится на ряд фракций (6 – 12 в предварительных опытах) путем постепенного увеличения количества соли в растворе, количества добавленного адсорбента, концентрации органического растворителя, значения pH и других факторов. Исследователи пытаются достигнуть такого состояния, чтобы большая часть фермента оказалась в одной фракции. Иногда для удаления балластных белков применяют дробную денатурацию при нагревании или изменении кислотности раствора.

Считается неправильным прием, когда пытаются использовать несколько порций фермента и добавлять к каждой из них разное количество соли или осадителя. При таком фракционировании любой полученный осадок будет содержать все белки, осажденные солью при данной концентрации; другими словами, он будет содержать все

компоненты предыдущих фракций. С другой стороны, правильно работая с одной порцией раствора фермента, удается удалить каждую предыдущую фракцию до осаждения следующей. При таком способе каждая фракция содержит только те белки, которые осаждаются при малых изменениях концентрации соли. Иными словами, таким путем достигается истинное фракционирование.

При работе с большими объемами белковых растворов их обычно не делят на такое же большое количество фракций, как в пробном опыте. Как правило, стараются получить не более трех фракций, две из которых обычно отбрасывают. Если, например, пробное фракционирование показало, что осаждение изучаемого фермента начинается только после того, как концентрация осадителя, обычно сульфата аммония, достигнет 66% насыщения, и что большая часть осаждается при 69 %-ном насыщении, то концентрацию $(NH_4)_2SO_4$ в растворе нужно сразу же довести до 65%, осадок отбросить, затем довести концентрацию $(NH_4)_2SO_4$ до 70%, осадок, содержащий фермент, сохранить и оставшийся раствор отбросить. Однако такое фракционирование без контрольных измерений активности фермента небезопасно, так как условия осаждения белков в больших объемах не полностью совпадают с условиями их осаждения при пробном фракционировании в малых объемах. На осаждение фермента может, например, влиять присутствие белков, которые в пробном фракционировании удаляются на предыдущих стадиях, но которые при работе с большими объемами могут вызвать осаждение фермента уже при 63 % насыщения раствора сульфатом аммония. По этой причине целесообразно провести еще одно пробное разделение – на этот раз только на три фракции – до того как приступить к фракционированию в большом объеме. Это позволит убедиться в том, что границы концентраций определены правильно.

В данном разделе мы не будем подробно останавливаться на различных методах фракционирования белков с целью получения наиболее чистого ферментного препарата с максимальной активностью, однако приведенный пример показывает насколько сложен и длителен этот процесс. Обычно в основе подобных процессов фракционирования солями лежит хорошо известное уравнение $\lg S = \beta' - K'_s \cdot \Gamma / 2$, где s – растворимость фермента, выраженная в г/л раствора, $\Gamma / 2$ – ионная сила раствора в моль/л, β' и K'_s – константы. Весь этот процесс основан на факте, что при увеличении концентрации соли в растворе наступает момент, когда растворимость фермента соответствует его концентрации и фермент выпадает в осадок. Вместо сульфата аммония в качестве осадителя, как уже упоминалось ранее, могут быть использованы этанол, бутанол, ацетон и другие смешивающиеся с водой растворители.

Для последующей очистки выпавшего осадка, содержащего фермент, применяют самые разные приемы. Из них наиболее эффективны гель-

фильтрация или пропускание раствора, содержащего фермент, через какой-либо сорбент. Обычно ферменты хорошо сорбируются на выбранном сорбенте, после чего их элюируют либо раствором NaCI, либо каким либо буферным раствором. В качестве адсорбентов могут быть использованы фосфат кальция, оксиды кремния или алюминия, $Al(OH)_3$, ионообменные смолы, производные целлюлозы и другие вещества. Наиболее эффективна для этих целей колоночная хроматография.

В последнее время для обессоливания водных растворов, содержащих фермент, а также для целей фракционирования белков с различной молекулярной массой стала широко использоваться *ультрафильтрация*, суть которой заключается в фильтрации растворов через пористые фильтрующие пластины, выполненные из различных материалов. В зависимости от размера пор, пластины пропускают только соли и низкомолекулярные побочные продукты или белки с большей молекулярной массой. В результате проделанной операции происходит не только очистка фермента, но и его концентрирование. В конце удается получать достаточно чистые ферментные препараты, использующиеся в различных отраслях промышленности.

Кислые протеиназы желудочно-кишечного тракта. Эту группу протеиназ составляют ферменты, обладающие максимальной активностью в кислой области pH. Одним из первых представителей этой группы явился *пепсин*, выделенный в 1929 – 1930 гг. американским биохимиком Дж. Нортропом.

Поскольку содержание пепсина в желудочном соке невелико и составляет около 10 мг/л, для получения этого фермента в кристаллическом виде приходится использовать большие количества желудочного сока, из которого осаждением сульфатом магния в кислой среде, растворением осадка в воде при добавлении щелочи (pH < 4) и повторным осаждением подкисленнного раствора до pH 2,5 удалось выделить пепсин в кристаллическом виде. В дальнейшем оказалось, что пепсин приобретает свою активность при его модификации из предшественника – *пепсиногена*, который превращается в *пепсин* по следующей схеме:

$$\underset{\text{м.м. 42 кД}}{\text{пепсиноген}} \xrightarrow{H^+,\ \text{пепсин}} \underset{\text{м.м. 33 кД}}{\text{пепсин}} + X\ (\text{м.м. 4 кД})$$

Полипептид, выделенный в процессе активации пепсиногена, обладает способностью обратимо соединяться с пепсином при pH 5,6. При более кислых значениях pH происходит диссоциация комплекса и переваривание ингибитора свободным пепсином. Максимальная скорость разрушения ингибитора пепсина наблюдалась при pH 4,0. Сравнение N- и

С-концевых аминокислотных последовательностей пепсина и пепсиногена позволило сделать вывод, что пепсин образуется из С-концевой части молекулы зимогена в присутствии микроколичеств пепсина. Изучение свойств этого фермента показало, что обработка фермента ацетилимидазолом вызывает угнетение протеолитической активности пепсина, тогда как его пептидазная и эстеразная активности, напротив, сильно возрастают, достигая 180 – 200 % от активности не модифицированного пепсина. По данным многих исследователей пепсин гидролизует белки в широком диапозоне pH от < 2 до pH > 4 с положением оптимума pH, равном 1,8. В настоящее время пепсин широко применяется в пищевой промышленности и медицине.

Гастриксин также содержится в желудочном соке, имея pH оптимум 3,2. По своим ферментативным свойствам гастриксин напоминает пепсин, его молекулярная масса равна 32,5 кД. Высказано предположение, что оба фермента образуются в желудке человека из одного общего предшественника.

Реннин обычно присутствует в четвертом желудке (сычуге) молодых жвачных животных. Этот фермент известен под различными названиями – сычужный фермент, лаб-фермент, химаза, химозин, реннин. Фермент умеренно стабилен при pH 2 и устойчив в интервале pH 5,3 – 6,3. Оптимум действия реннина находится в интервалах pH 3,4 – 4,0. Также как и пепсин, реннин образуется из прореннина в кислой среде при pH < 5,0. В ходе активации прореннина 10 – 15 % белкового материала отщепляется в виде пептидов.

Наряду с большим сходством механизмов активации пепсиногена и прореннина между ними имеются определенные различия. Эти различия проявляются, во-первых, в том, что реакция активации прореннина не подчиняется кинетическим законам автокаталитической реакции, во-вторых, в том, что пептиды, освобождающиеся в процессе активации, не оказывают ингибирующего действия на фермент.

Реннин широко используется в сыроделии; первичным объектом атаки реннина на белки молока, по-видимому, является χ-казеин, который в результате ферментативного воздействия теряет способность выполнять функцию стабилизатора казеиновых мицелл.

Превращение χ-казеина в присутствии реннина напоминает ограниченный протеолиз и сопровождается отщеплением от молекулы белка так называемого казеин-гликопептида с молекулярной массой 6 000 – 8 000. Имеются основания для предположения, что гликопептид освобождается в результате разрыва связи Phe – Met, расположенной в С-концевой части молекулы χ-казеина.

Ферменты поджелудочной железы. Секрет поджелудочной железы содержит сложный и довольно многочисленный набор гидролаз, действующий на различные классы веществ – белки, жиры, нуклеиновые

кислоты, углеводы. Некоторые ферменты (нуклеазы, амилазы) секретируются в поджелудочный сок сразу в активном состоянии, тогда как другие ферменты – различные протеазы, фосфолипаза – синтезируются тканью железы в виде неактивных предшественников – зимогенов и превращаются в активные ферменты уже в самом поджелудочном соке.

Согласно имеющимся данным, синтез ферментов в поджелудочной железе идет с большой скоростью. Опыты с инъекцией S^{35}-цистеина показали, что время, необходимое для полного обновления «пула» трипсиногена и химотрипсиногена А в поджелудочной железе быка, равно 155 мин. При этом оба белка синтезировались приблизительно с одинаковыми скоростями. Местом синтеза гидролаз панкреатического сока являются рибосомы эндоплазматического ретикулума ацинарных клеток поджелудочной железы.

Синтезированные гидролазы в виде зимогенов накапливаются в виде специфических внутриклеточных образований, получивших название зимогенных гранул. Зимогенные гранулы, занимающие значительную часть цитоплазмы клеток у голодающих животных, исчезают после приема пищи, и через некоторое время на их месте возникают новые образования. Исчезновение зимогенных гранул совпадает по времени с появлением протеолитической активности в поджелудочном соке.

Локализация синтезируемых гидролаз внутри специальных образований, окруженных мембраной, по-видимому, представляет собой важное приспособление, обеспечивающее защиту клеточного содержимого от разрушения. В этом же заключается, скорее всего, биологическое значение синтеза важнейших гидролаз, действующих на белки и липиды в форме неактивных предшественников. Наконец, дополнительный защитный механизм может заключаться в наличии специфических белков, обладаюших свойствами ингибиторов протеолитических ферментов. Один из этих ингибиторов – специфический ингибитор трипсина – содержится в небольших количествах как в зимогенных гранулах, так и в секрете поджелудочной железы. Значение этого ингибитора, по-видимому, заключается в блокировании следов активного трипсина, возникающих в результате спонтанной активации трипсиногена, и в предотвращении преждевременной активации основной массы зимогенов поджелудочной железы.

Основные ферменты, содержащиеся в соке поджелудочной железы – это протеазы: трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза, амилазы: α- и β, нуклеазы и липазы, позволяющие успешно гидролизовать пищевые продукты, поступающие в наш организм. Кроме того, в незначительных количествах содержатся эластаза и коллагеназа, позволяющие частично переваривать коллаген и соединительные ткани, содержащиеся в мясных и рыбных продуктах.

Так же, как и пепсин, протеолитические ферменты поджелудочной железы синтезируются в виде неактивных предшественников – зимогенов. Процесс активации зимогенов носит характер ограниченного протеолиза и сводится к расщеплению строго определенных «стратегических» пептидных связей в молекуле зимогена, в результате чего белок приобретает ферментативную активность.

Ключевое положение в системе активации зимогенов занимает трипсин, который осуществляет не только автокаталитическую активацию трипсиногена, но и активирует все без исключения зимогены поджелудочной железы – химотрипсиногены А, В и С, прокарбоксипептидазы А и В, а также зимоген фосфорилазы А.

Превращение трипсиногена в активный фермент может осуществляться как автокаталитически под действием трипсина, так и при участии некоторых других протеаз. Естественным активатором трипсиногена является фермент энтерокиназа, осуществляющая активацию трипсиногена поджелудочного сока при его поступлении в двенадцатиперстную кишку. Активация трипсиногена может осуществляться также в присутствии ферментов микробного происхождения, таких как аспергиллопептидаза А из *Aspergillus saitoi*, пептидаза А из *Penicillium janthinellum* и некоторые другие. Как показали результаты исследований химические превращения в процессе активации бычьего трипсиногена сводятся к гидролизу одной пептидной связи в молекуле зимогена (Lys 6- Ile 7) и освобождению N-концевого гексапептида Val-$(Asp)_4$-Lys. Сходный механизм имеет место и при активации других трипсиногенов. Общая схема активации для трипсина, очевидно, имеет следующий вид:

$$\text{трипсиноген М.м. 25 кД} \xrightarrow{OH^-,\ \text{трипсин}} \text{трипсин (24 кД)} + \text{гексапептид}$$

Карбоксипептидазы представляют собой группу протеаз, отщепляющих С-концевые аминокислотные остатки от молекул белков и пептидов. Как уже указывалось, в неактивированном панкреатическом соке животных содержатся зимогены двух карбоксипептидаз А и В. Эти ферменты различаются по относительной скорости, с которой они гидролизуют связи различных аминокислотных остатков. В то время как карбоксипептидаза А с наибольшей скоростью освобождает аминокислоты с ароматическими или большими алифатическими боковыми цепями, карбоксипептидаза В освобождает остатки основных аминокислот лизина и аргинина с большей скоростью, чем остатки всех других аминокислот.

Оба фермента в силу своей высокой субстратной специфичности нашли широкое применение в белковой химии как для определения С-концевых последовательностей в белках и пептидах, так и для практического применения при получении полусинтетического и генно-инженерного инсулинов. Следует отметить тот факт, что карбоксипептидазы являются металлосодержащими ферментами, требующими для проявления своей активности наличие в молекуле ионов двухвалентного цинка. Молекулярная масса карбоксипептидаз после их активации из зимогенов находится в пределах 34 –36 кДа.

Помимо вышеперечисленных ферментов в организме животных содержатся еще целый ряд протеаз, выполняющих те или иные функции, таких, как внутриклеточные протеазы – катепсины A, B, C и D, а также пептид-гидролазы, активные в нейтральной и щелочной областях, например, калликреины, аминопептидазы A и B, лейцинаминопептидаза, аминотрипептидаза, дипептидазы, а также ферменты, обеспечивающие свертываемость крови – тромбин и плазмин.

Ферменты микроорганизмов. Растущее применение ферментов в различных отраслях промышленности и особенно в пищевой и легкой промышленности, а также в медицине, выдвигает важную задачу поисков удобных и экономичных источников для их получения. В этом отношении микроорганизмы представляют исключительно перспективный объект исследований.

Многие широко распространенные микроорганизмы выделяют значительные количества ферментов разнообразной субстратной специфичности в окружающую среду, что значительно облегчает задачу их выделения и очистки. Возможность управления образованием ферментов за счет подбора соответствующей питательной среды и условий культивирования позволяет не только увеличить выход ферментов, но и получать биокатализаторы с заданными свойствами. Большое внимание, уделяемое ферментам микроорганизмов, привело к выделению большого числа бактериальных и грибных гидролаз самой различной субстратной специфичности. Ниже мы коротко остановимся на некоторых условиях получения этих ферментов, методам их очистке и квалификации.

Индексами «Г» и «П» обычно обозначают методы культивирования микроорганизмов, из которых в последствии тем или иным способом получают ферментные препараты: «Г»-глубинное культивирование микроорганизмов, «П»-поверхностное культивирование. Индексами «ГХ» или «ПХ» обозначают уже не только метод культивирования, но и квалификацию, т.е. чистоту получаемых ферментных препаратов.

Таким образом, «ГХ» – это неочищенная культуральная жидкость, т.е. та среда, в которой выращивался продуцент фермента. Препараты с этим индексом используются преимущественно на месте получения

фермента, например, в спиртовом производстве применяют культуральную жидкость продуцентов амилолитических и целлюлолитических ферментов, получаемую в ферментных установках спиртовых заводов после добавления к ней консервантов (толуола, этанола, хлорформа). В пищевых производствах препараты «ГХ» пригодны лишь в тех технологических процессах, где исключено попадание препарата в готовый продукт, как это имеет место при производстве спирта, где все побочные продукты удаляются в процессе отгонки и ректификации.

Индекс «Г-3Х» имеют ферментные препараты, получаемые путем распылительной сушки концентрированной культуральной жидкости. Концентрирование обычно проводится методом вакуумирования при температурах, не вызывающих инактивации ферментов (обычно 40 – 50°С). При необходимости перед выпариванием в культуральную жидкость добавляют стабилизаторы и регулируют величину pH, поскольку в процессе концентрирования стабилизирующие компоненты могут переходить в нерастворимое состояние, а величина pH сдвигаться за счет изменения концентрации и соотношения растворенных компонентов. По окончании концентрирования в полученный концентрат вносят соли – наполнители в количестве не менее 100% к массе сухих веществ концентрата с целью снижения механических потерь при сушке. Сушку концентрата проводят при температуре на входе в распылительную сушилку 140°С, на выходе – около 70°С. Высушиваемый продукт подвергается воздействию высокой температуры в течение долей секунды, но этого, однако, достаточно для частичной термоинактивации входящих в него ферментов. Для снижения величины потерь ферментативной активности в концентрат обычно добавляют агенты, повышающие термостабильность ферментов, например таких, как соли кальция.

В качестве соли – наполнителя для ферментов с этим и другими индексами чаще всего используют поваренную соль – NaCI. Количество добавляемой соли рассчитывают, исходя из активности фермента в культуральной жидкости, стандартной активности препарата и средней величины потери активности, наблюдающейся при сушке.

Препараты с индексом «Г-3Х» являются неочищенными ферментными препаратами. Они имеют высокую степень микробной обсемененности, что ограничивает сферу их применения. Ферментативная активность таких препаратов, как правило, в 3 раза выше, чем средняя активность культуральной жидкости.

В пищевой промышленности препараты «Г-3Х» используют в тех же технологиях, что и «ГХ». В сельском хозяйстве препараты «Г-3Х» широко применяются для обработки кормов с целью повышения их усвояемости. В микробиологической промышленности препараты «Г-3Х» используют для гидролиза компонентов питательных сред, а также при получении белковых препаратов из биомассы микроорганизмов.

Индекс «Г-3Х-Ф» присваивают препаратам, которые получают путем распылительной сушки концентрированного фильтрата культуральной жидкости. Эти препараты являются частично очищенными, так как при фильтрации из культуральной жидкости удаляется биомасса и часть балластных веществ. Активность «Г-3Х-Ф» выше, чем «Г-3Х».

В пищевой промышленности препараты «Г-3Х-Ф» используются наряду с более чистыми препаратами «Г-10Х».

Индекс «Г-10Х» имеют препараты, которые получают путем распылительной сушки концентрированного фильтрата культуральной жидкости. Перед фильтрацией культуральную жидкость обрабатывают минеральными или органическими коагулянтами, что позволяет в процессе разделения фаз освободить фильтрат от биомассы микроорганизмов, балластных белков, полисахаридов, нуклеотидов и других примесей. Фильтрат концентрируют вакуум – выпариванием и добавляют к нему при необходимости стабилизаторы. Из фильтрата ферменты выделяют осаждением каким-либо органическим растворителем или их смесью, например, этанолом или пропанолом. Для этих целей можно также использовать $(NH_4)_2SO_4$. В этом случае распылительную сушилку можно заменить обычной фильтрацией.

В процессе осаждения фермента происходит фракционирование белков за счет их различия в молекулярной массе, изоэлектрической точке и гидрофобности. В осадок обычно не переходят низкомолекулярные органические вещества (олигосахариды, пептиды, аминокислоты). Ферментный осадок отделяют от жидкой фазы центрифугированием и высушивают в распылительной или вакуум-сушилке. Сухие препараты стандартизуют, добавляя к ним наполнители (соли, крахмал, муку и т.д.). Вид наполнителя зависит от последующего целевого назначения препарата.

Препараты «Г-10Х» имеют значительно большую чистоту, чем «Г-3Х», и как минимум в 10 раз большую активность, чем активность культуральной жидкости. Область применения «Г-10Х» охватывает различные пищевые производства, отрасли легкой и химической промышленности, кормопроизводство, ветеринарию.

Препараты с индексом «Г-20Х» получают с применением ультрафильтрации фильтрата культуральной жидкости. Ультрафильтрации подвергают предварительно очищенные растворы ферментов, свободных от клеток микроорганизмов и взвешенных частиц. Культуральную жидкость очищают и фильтруют так же, как и при получении препаратов с индексом «Г-10Х». Фильтрат дополнительно очищают с помощью стерилизующей фильтрации, после чего направляют на ультрафильтрацию. На стадии ультрафильтрации происходит обессоливание раствора и удаление из него низкомолекулярных примесей, а также концентрирование раствора.

Из ультрафильтратов получают жидкие и сухие формы ферментных препаратов. Жидкие формы стабилизируют консервантами, например, бензоатом натрия. Сухие формы получают путем распылительной сушки. Перед сушкой в концентрат вносят стабилизаторы и наполнители. Препараты «Г-20Х» применяют при производстве пищевых продуктов и напитков, в составе лекарственных средств, в кормопроизводстве.

Препараты с индексом «ПХ» обычно представляют собой высушенные культуры грибов – продуцентов ферментов, полученных при твердофазном культивировании. Препараты «ПХ» сохраняют полный ферментативный комплекс продуцентов. Они плохо очищены и имеют высокую микробную обсемененность. Обычно их применяют для тех же целей, что и препараты «ГХ».

Препараты с индексами «П-10Х» и «П-10х25» получают из свежих или высушенных твердофазных культур грибов по следующей схеме: водная экстракция ферментного и культурального гриба, отделение экстракта от нерастворимых остатков, осаждение ферментов из экстракта этанолом или изопропанолом, отделение ферментного осадка, суспендирование осадка в воде, добавление к суспензии стабилизаторов и наполнителей и, наконец, сушка суспензии на распылительной сушилке. Препараты «П-10Х» применяют в тех же отраслях промышленности, что и препараты с индексом «Г-10Х», препарат «Г-25Х» – аналогично препарату «Г-20Х».

Препараты с индексом «П-20Х» получают по схеме: экстракция ферментов из твердофазной культуры, стерилизующая фильтрация экстракта, ультрафильтрация, стандартизация, стабилизация ультрафильтрата и сушка его на распылительной сушилке. Эти препараты применяют в тех же отраслях промышленности, что и препараты с индексом «Г-20Х».

Остановимся несколько подробнее на эндо- и экзо-ферментах. Как правило, эндо-ферменты расщепляют связи внутри молекулы фермента, тогда как экзо-ферменты расщепляют связи у биополимеров, начиная с концевого остатка. Например, пепсин или трипсин – эндопептидазы, тогда как карбокси- или аминопептидазы являются типичными представителями экзопептидаз, расщепляя пептидные связи только с N- или С-конца полипептидной цепи.

Штаммы *Bac. subtilis*, наиболее широко применяющиеся при получении ферментов, пригодных для их последующего использования в пищевой и других отраслях промышленности, обычно продуцируют ферменты двух типов – щелочные с оптимумом действия в интервале pH 8,0 – 10,0 и нейтральные с оптимумом действия в интервале pH около 7,0. Оба этих вида ферментов являются эндо-протеиназами.

Различные виды бактерий, принадлежащих к роду *Pseudomonas*, характеризуются высокой гидролитической активностью, принадлежат к

классу эндо-ферментов и широко применяются в различных отраслях промышленности. Эти ферменты способны расщеплять белки, жиры, углеводы и другие органические соединения. Содержание внеклеточных и внутриклеточных ферментов у *Pseudomonas* доказано многими исследователями.

Еще одним высокоэффективным продуцентом ферментов являются актиномицеты. Так, детальное изучение протеаз, продуцируемых микроорганизмом *Streptomyces griseus* – продуцента антибиотика стрептомицина, позволило выделить целый комплекс ферментов, в частности, активную протеазу в кристаллическом виде. Частично очищенный препарат протеазы *Str. griseus* под названием «проназа» выпускается промышленностью в Японии и США. В нашей стране был разработан аналог проназы из других штаммов – микроорганизмов, получивший название «протелин». Препараты протелин и проназа состоят как минимум из одиннадцати различных протеолитически активных компонентов.

Препарат проназы содержит четыре нейтральных и три щелочных протеиназ. Активность нейтральных протеиназ подавляется ЭДТА, и они являются, по всей вероятности, металлоферментами, тогда как активность щелочных протеиназ подавляется диизопропилфторфосфатом. Один из ферментов группы щелочных протеиназ – протеиназа b – по своей субстратной специфичности напоминает трипсин. Фермент устойчив при pH выше 5,5 и его активность подавляется тозиллизинхлорметилкетоном, но не подавляется тозилфенилаланинхлорметилкетоном. Эти данные свидетельствуют о вероятном сходстве строения активных центров – «замков» - протеиназы b и трипсина.

Особый интерес среди протеаз, вырабатываемых *Str. fradiae,* представляет фермент кератиназа, способный гидролизовать нативный кератин в отсутствии каких-либо кофакторов или восстанавливающих веществ. Обычно фермент выделяется в среду, т.е. является внеклеточным ферментом, в виде конъюгата с кислым полимером, природа которого еще пока полностью не установлена. После отделения полимера сорбцией на ДЭАЭ-целлюлозе фермент был получен в кристаллическом виде. Очищенная кератиназа представляет собой белок основного характера с изоэлектрической точкой, соответствующей pH 8,9. Молекулярная масса фермента составляет около 27 000 дальтон. Кератиназа переводит в растворимое состояние до 1/3 нативных белков шерсти. Оптимум действия фермента на шерсть лежит в пределах pH = 9,0. Основными продуктами реакции являются пептиды, свободные аминокислоты не были обнаружены. Помимо кератина, фермент гидролизует обычные белки – казеин, гемоглобин. С гемоглобином в качестве субстрата протеолитическая активность кристаллической кератиназы превышает активность трипсина в 4,7 раза.

Очевидно, кератиназа продуцируется многими штаммами *Str. fradiae*, поскольку помимо вышеописанного фермента, ряду исследователей удалось выделить из других штаммов этого продуцента ферментный препарат, обладающий еще более высокой кератиназной активностью. Препарат характеризовался также высокой протеолитической и эластазной активностью. С помощью фракционирования на КМ-сефадексе удалось достигнуть частичного отделения эластазной активности от казеинолитической.

Многие протеиназы продуцируются также почвенными бактериями рода *Sorangium*, которые представляют из себя протеиназы с небольшой молекулярной массой и довольно ограниченной субстратной специфичностью. Протеиназы продуцируются также почвенными бактериями, принадлежащими к роду *Artrobacter,* при выращивании на среде, содержащей белки и пептиды.

В заключение следует упомянуть стафилокоагулазу – специфический фактор, вырабатываемый патогенными стафилококками. Хотя ее протеолитическая природа еще окончательно не установлена, этот фермент обладает уникальной способностью превращать фибриноген в фибрин в присутствии специфического фактора, что имеет большое значение в медицинской практике.

Продуцентами многочисленных ферментов различной субстратной специфичности являются также плесневые грибы. Протеиназы плесневых грибов характеризуются большим разнообразием свойств и подобно вышеописанным ферментам бактериального происхождения, подразделяются на кислые, нейтральные и щелочные ферменты.

Количество и характер продуцируемых ферментов зависят как от вида плесени, так и от условий культивирования. Например, кислая протеаза является основным протеолитическим ферментом у различных черных аспергиллов – *Aspergillus awamori, Asp. Saitoi, Asp.usamii*. Этот тип протеаз продуцируется в большом количестве также многими грибами родов *Rhizopus* и *Penicillium*. Однако основным протеолитическим ферментом при обычных условиях выращивания *Asp. oryzae* является щелочная протеаза. При культивировании гриба на среде, богатой углеводами, вырабатывается главным образом кислая протеаза.

Следует отметить, что способность к биосинтезу протеаз, обнаружена и у многих других представителей низших грибов. Препараты протеиназы были получены из *Asp. terricola.* Фермент, обладающий сычужным действием, выделяли из *Asp. candidus*; два различных протеолитических фермента обнаружены в культуральной среде гриба *Mortierella renispora.* Оба фермента гидролизовали гемоглобин с оптимальным значение pH 7,0 – 10,0. Протеолитические ферменты продуцирует также патогенный гриб *Fusarium vasinfectum*, вызывающий некоторые заболевания у хлопчатника. Комплекс протеаз содержится в

фильтрате культуральной жидкости другого фитопатогенного гриба – *Phymatotrium omnivorum.* Он состоит из ферментов типа аминопептидазы, карбоксипептидазы и эндопептидазы. Карбоксипептидаза из *Phymatotrium omnivorum* по свои ферментативным свойствам напоминает карбоксипептидазу А бычьего панкреаса, но значительно отличается от последней по аминокислотному составу.

4.2. Правила работы с ферментами

1. Ферментный препарат должен обладать способностью специфически катализировать реакцию превращения субстрата в продукт. Предпочтительны препараты, где основному ферменту не сопутствуют другие ферменты, вызывающие побочные реакции трансформации того же субстрата.
2. При выраженной способности основного фермента катализировать побочные реакции следует создать условия, при которых скорость побочных реакций становится минимальной.
3. Режим проведения биокаталитического процесса должен соответствовать физико-химическим характеристикам ферментативного препарата, таким как величина оптимального значения pH и температуры.
4. Использование активаторов, стабилизаторов и ингибиторов ферментов не должено снижать вкусовые качества и питательную ценность продуктов, получаемых из пищевого сырья. Не рекомендуется, например, применять щелочно-земельные металлы для активации фермента при получении различных напитков, вина и соков. При производстве пищевых продуктов и кормов не следует регулировать ферментативную активность с помощью солей тяжелых металлов, окислителей, антибиотиков и других агентов, влияющих на обменные процессы в организме.
5. При проведении биокаталитических процессов в закрытой системе важно определить оптимальные соотношения фермента к субстрату. Правильный выбор этого соотношения позволяет сократить продолжительность процесса ферментации. В большинстве процессов ферментативного гидролиза основные превращения субстрата могут быть завершены в течение 3 – 4-х часов.
6. Длительные ферментативные реакции в открытых системах требуют введения дополнительных количеств фермента в соответствии с динамикой его активации. Пример такого процесса: непрерывный гидролиз целлюлозы в мембранном биореакторе.
7. Степень очистки ферментного препарата должна соответствовать санитарным требованиям к качеству продуктов ферментации.

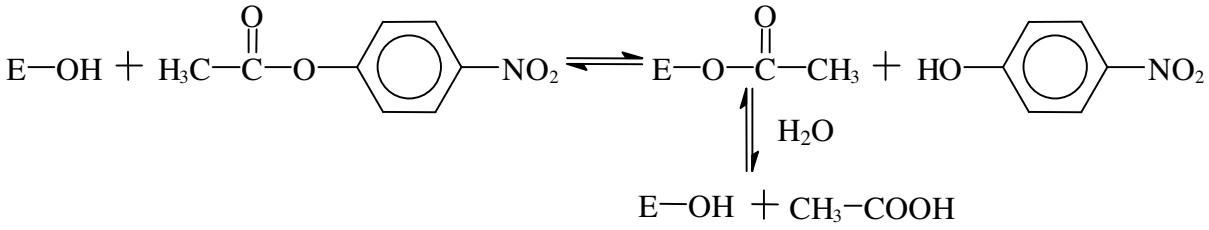
8. Водорастворимые ферментные препараты целесообразно использовать в виде растворов, которые готовят на дистиллированной или умягченной воде. Техническая вода содержит ионы тяжелых металлов и непригодна для работы с ферментами.
9. Трудно растворимые неактивные примеси рекомендуется отделять от раствора ферментного препарата. Присутствие этих примесей может исказить вкус целевого продукта и существенно снизить его качество.
10. Процессы биокатализа следует проводить в реакторах, выполненных из стекла, эмалированного металла и особых видов нержавеющей стали. Необходимо исключить попадание в реакционную среду продуктов коррозии металлов из коммуникационных линий.
11. Ферментацию субстратов, диспергированных в жидкой среде, проводят обычно при перемешивании. Это необходимо для интенсификации диффузии внутри и вблизи частиц сырья. Скорость диффузии лимитирует скорость ферментации диспергированных субстратов.
12. При регуляции температуры и pH среды в ходе ферментативного процесса следует избегать резких локальных изменений этих параметров, во избежания инактивации ферментов.
13. Для регуляции pH среды рекомендуется использовать слабые растворы кислот и щелочей, таких как уксусная, фосфорная кислоты, аммиак, известковая вода.
14. При проведении длительных ферментаций в реакционную среду следует вводить антисептики для предотвращения развития инфицирующей микрофлоры, например, такие, как этанол, толуол, хлороформ.

4.3. Фермент-субстратные комплексы и механизм действия ферментов

В настоящее время не существует единой теории, объясняющей необычайно высокую специфичность и активность биокатализаторов. В то же время в отношении небольшого числа ферментов был выдвинут ряд вполне вероятных гипотез, пытающихся подтвердить имеющиеся экспериментальные данные. Поскольку все предлагаемые гипотезы только частично объясняют механизм действия ферментов, исследователи до настоящего времени не могли создать единой теории, объясняющей наличие ферментативной активности к тем или иным субстратам.

Существование фермент-субстратных комплексов было доказано с помощью различных экспериментальных методов, в том числе ренгеноструктурного анализа, спектроскопических методов и электронного парамагнитного резонанса. Субстрат связывается с ферментом в определенной области молекулы фермента, так называемым

«активным центром» или «замком» по предыдущей классификации, где осуществляется катализируемая ферментом реакция и образуются ее продукты. В связывании субстрата с ферментом и образовании комплекса иногда принимают участие слабые взаимодействия, а иногда – ковалентные связи. Как это схематически показано на рис. 3.17 комплекс образуется тогда, когда субстратный «ключ» входит в ферментный «замок». На рис. 3.17 особенно отчетливо видно, что фермент-субстратный комплекс образуется с помощью водородных связей между субстратом и группами, расположенными в самых различных участках аминокислотной последовательности фермента. С другой стороны, реакция гидролиза *п*-нитрофенилового эфира уксусной кислотой проходит с образованием между ферментом и субстратом ковалентной связи. Реакция протекает по следующей схеме



Обычно α-химотрипсин ацилируется по гидроксильной группе реакционно-способного остатка серина, входящего в активный центр фермента. Эта реакция протекает быстро, тогда как следующая стадия – гидролиз ацетилхимотрипсина и образование уксусной кислоты и свободного фермента происходит медленно, поэтому в процессе реакции происходит накопление ацетил-α-химотрипсина, который можно обнаружить по изменению УФ-спектра. В том случае, если заменить нитрофенолацетат на трифторацетилнитрофенол, то образуется столь прочный фермент-субстратный комплекс, что его можно выделить в кристаллическом виде.

Кроме серина в состав активного центра ферментов входят остатки аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, гистидина, лизина, метионина и треонина. У ферментов с большой молекулярной массой может быть несколько активных центров. Как показывают данные многочисленных исследований, в конструировании активного центра принимают участие 7–8 аминокислотных остатков, остальные аминокислотные остатки, не входящие в активный центр, определяют характер складывания полипептидной цепи, т.е. вторичную структуру и пространственное расположение одной части цепи относительно другой,

т.е. третичную структуру фермента. В результате возникновения всех этих связей и создается конформация активного центра, напоминающего «замок».

Считается, что ферменты так связывают молекулы субстратов, что последние занимают положение наиболее благоприятное для осуществления реакции, т.е. создается *эффект ориентации* субстрата, который и обеспечивает ускорение реакции. Известно также, что связывание субстрата сопровождается небольшим пространственным изменением структуры фермента. Такое *индуцированное* соответствие фермента и субстрата вносит свой вклад в процесс ферментативного катализа.

На рис. 4.1 представлено схематическое изображение активного центра уже хорошо нам известного лизоцима. В отличие от химотрипсина, в данном случае фермент-субстратный комплекс образуется с помощью водородных связей между субстратом и группами, расположенными в самых разных участках аминокислотной последовательности фермента.

Прежде чем приступить к краткому обзору химии ферментативного катализа, нельзя не упомянуть еще об одной гипотезе, связанной с геометрией фермента. Известно, что связывание субстрата сопровождается небольшим изменением пространственной структуры некоторых ферментов. В частности, изучением трехмерной структуры лизоцима и карбоксипептидазы *А* в виде комплексов с субстратами и без субстратов было показано, что конформация ферментов при связывании субстрата несколько изменяется. Такое *индуцированное соответствие фермента* и субстрата может вносить свой вклад в процесс ферментативного катализа. Постулируются также усложненные варианты модели индуцированного соответствия, в которых в ходе процесса последовательно образуется несколько промежуточных фермент-субстратных комплексов. Некоторая эластичность и гибкость молекулы фермента может способствовать тщательной пространственной подгонке его каталитических групп и тем самым ускорению превращений каждого из промежуточных соединений.

Возможно, что индуцирование субстратом изменений в конформации активного центра характерно для ферментативного катализа вообще, хотя экспериментальное обнаружение этого эффекта связано с рядом трудностей и поэтому это явление было показано только у некоторых ферментов.

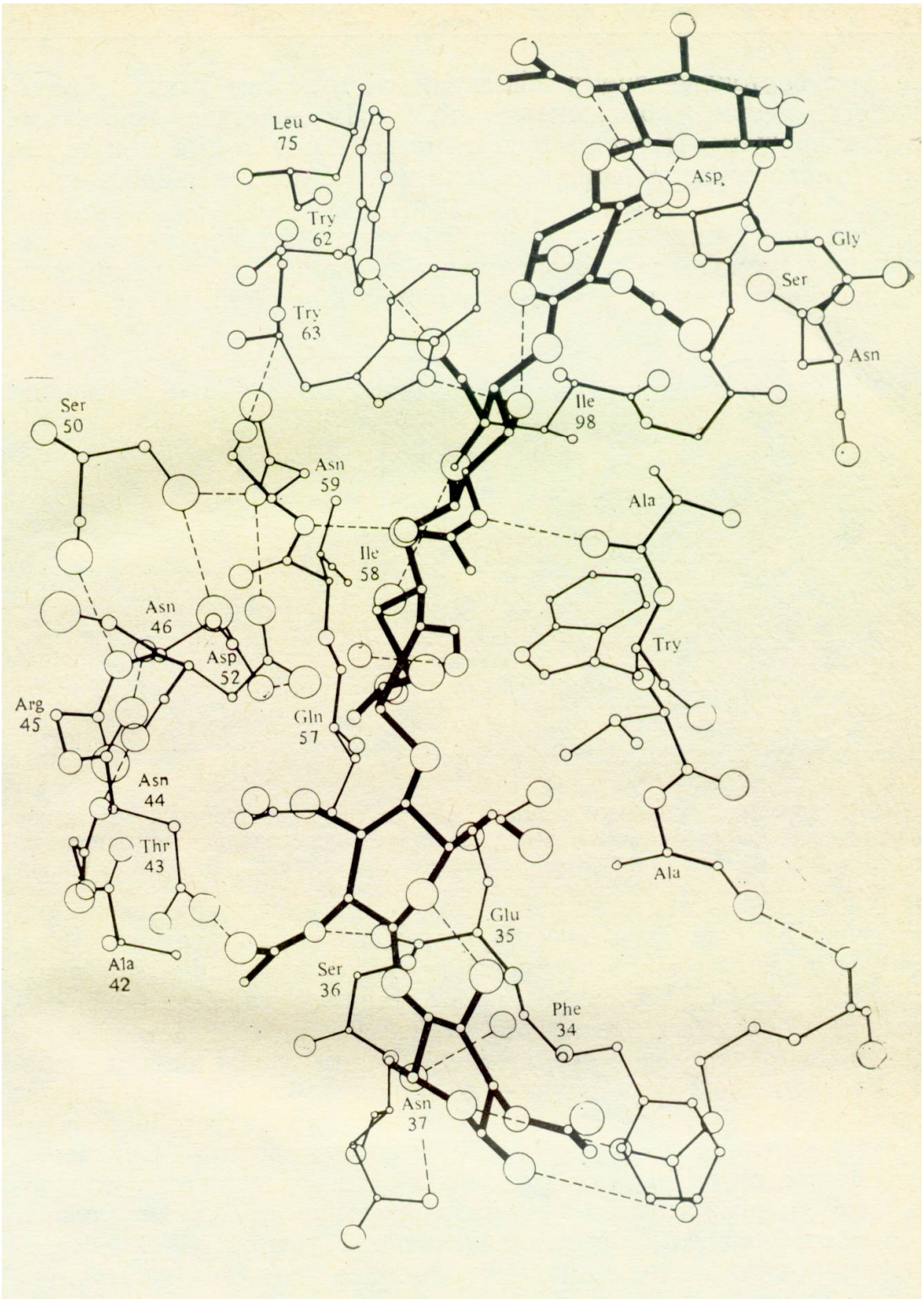


Рис. 4.1. Схематическое изображение активного центра лизоцима. Жирными линиями выделена молекула гексасахаридного субстрата, большими и маленькими кружками обозначены атомы кислорода и азота соответственно, а штриховыми линиями – водородные связи

Многие ферменты осуществляют реакции, хорошо известные химику-органику. Одной из таких реакций является *общий кислотно-основной катализ,* в котором катализатор на одной стадии процесса захватывает или отдает протон. Этот тип катализа, в частности, лежит в основе механизма действия одного из немногих ферментов, для которых предложена достаточно убедительная последовательность элементарных стадий каталитического процесса. Таким ферментом является уже известный нам химотрипсин. Считается, что в реакции химотрипсинового катализа как при отщеплении, так и при присоединении протонов роль переносчика последних играет вода.

В ферментативном катализе важную роль могут играть и другие факторы, например ковалентный катализ, деформация связей, электростатический катализ, многофункциональный катализ и эффекты растворителя, в частности, структура масляной капли. Поскольку в общем случае, реакции ферментативного катализа включают в себя множество эффектов, неудивительно, что пока еще не удалось разработать простую общую схему, которая позволила бы оценить их суммарное влияние и относительную значимость каждого из них. Математические выражения для скоростей катализируемых ферментами реакций можно вывести, опираясь лишь на концепцию о фермент-субстратном комплексе как основном промежуточном соединении.

4.4. Кинетика ферментативных реакций. Уравнение Михаэлиса-Ментен

Обычно зависимость скорости ферментативной реакции (V) от концентрации субстрата (S) выражается кривой, напоминающей гиперболу (рис. 4.2).

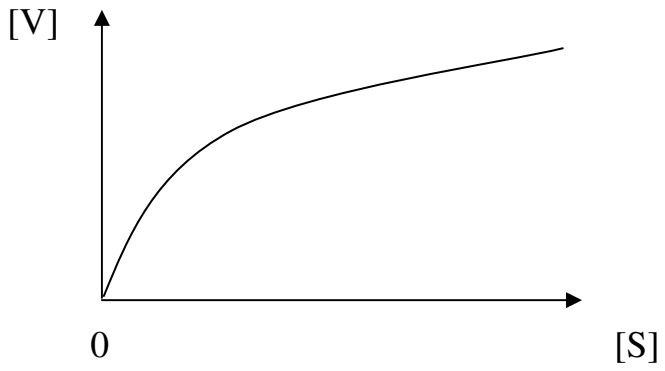


Рис. 4.2. Типичная кинетическая кривая ферментативной реакции

Для объяснения и расчета кинетических параметров этой кривой в 1913 г. два исследователя Л. Михаэлис и М. Ментен выдвинули свою гипотезу, в соответствии с которой уравнение ферментативной кинетики с одним субстратом можно записать следующим образом:

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [ES] \xrightarrow{k_3} E + P \qquad (4.1)$$

В этой схеме реакции учтены как образование фермент-субстратного комплекса, так и регенерация катализатора в исходной форме после завершения реакции.

При дальнейших исследованиях выяснилось, что кинетическое поведение большинства ферментов значительно сложнее, чем это вытекало из идеализированной схемы, лежащей в основе уравнения Михаэлиса – Ментен.

При выводе этого уравнения было высказано предположение, что существует только один фермент-субстратный комплекс. Между тем, как в большинстве ферментативных реакций образуются по меньшей мере два или три таких комплекса, возникающих в определенной последовательности.

$$E + S \longleftrightarrow [ES] \longleftrightarrow [EZ] \longleftrightarrow [EP] \longleftrightarrow E + P \qquad (4.2)$$

На данной кинетической схеме через [EZ] обозначен комплекс, соответствующий истинному переходному состоянию, а через [EP] – комплекс между ферментом и продуктом реакции. Кроме того, в большинстве ферментативных реакций участвуют более одного субстрата и образуется соответственно два или большее число продуктов. Энергетическая схема ферментативной реакции с одним субстратом выглядит так, как это показано на рис. 4.3.

В реакции с двумя субстратами, S_1 и S_2, может образоваться три фермент-субстратных комплекса, а именно ES_1, ES_2 и ES_1S_2. Если в результате реакции получатся два продукта, P_1 и P_2, то может существовать по меньшей мере еще три дополнительных комплекса EP_1, EP_2 и EP_1P_2. В таких реакциях имеется много промежуточных стадий, каждая из которых характеризуется своей константой скорости, и процесс

становится настолько сложным, что требует специальной математической обработки.

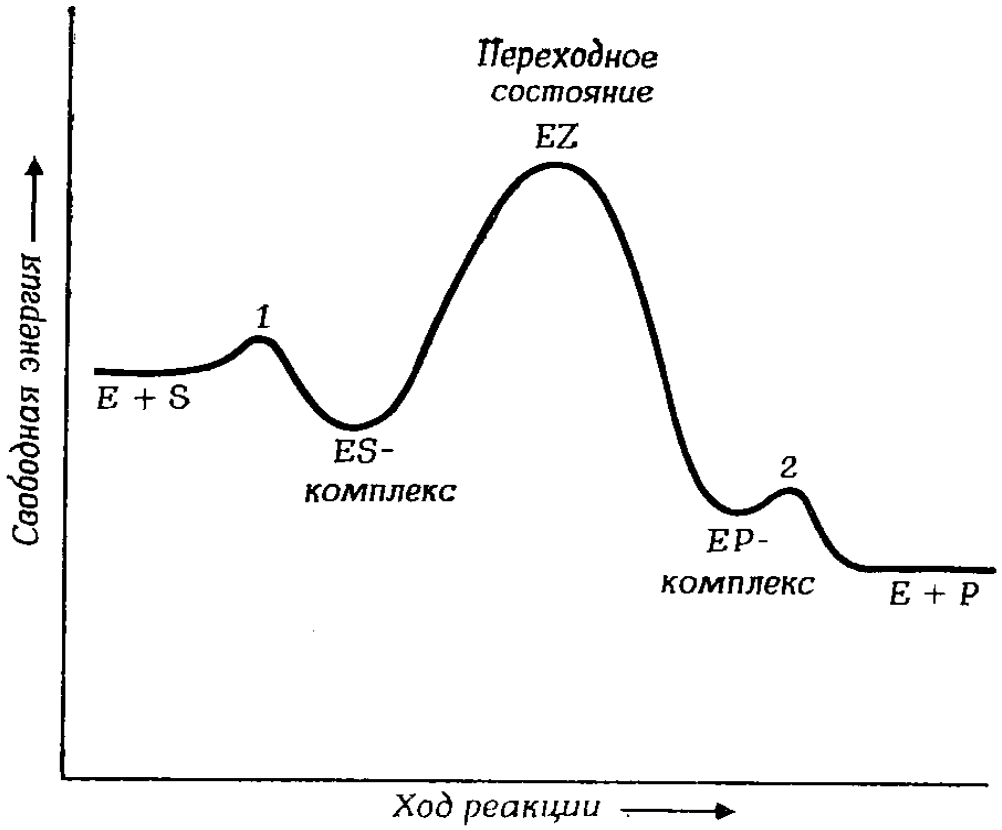


Рис. 4.3. Энергетическая схема ферментативной реакции

Остановимся на описании скорости ферментативной реакции с одним субстратом без учета всех промежуточных стадий, за исключением образования одного фермент-субстратного комплекса [ES]. В этом случае проведем анализ кинетики ферментативной реакции.

Пусть [E] означает общую концентрацию фермента (как в свободной, так и в связанной форме), [ES] – концентрацию фермент-субстратного комплекса, а разность [E] – [ES] концентрацию свободного, не связанного с субстратом фермента. Поскольку концентрация субстрата [S] обычно значительно превышает концентрацию фермента [E], число молекул S, связанных с ферментом в любой данный момент времени, пренебрежительно мало по сравнению с общим числом молекул субстрата. В этом случае скорость образования ES из E и S описывается уравнением

$$d[ES] / dt = k_1([E] - [ES]) [S]. \quad (4.3)$$

Скорость образования ES из E и P очень мала, и ею можно пренебречь.

Аналогично скорость распада ES описывается уравнением

$$-d[ES] / dt = k_2[ES] + k_3[ES]. \quad (4.4)$$

Если скорость образования ES равна скорости его распада, то это означает, что реакционная система находится в стационарном состоянии и концентрация ES поддерживается на постоянном уровне

$$k_1([E] - [ES]) [S] = k_2[ES] + k_3[ES]. \quad (4.5)$$

Преобразуя это выражение, получаем

$$[S]([E] - [ES]) / [ES] = (k_2 + k_3) / k_1 = K_m . \quad (4.6)$$

Объединенная константа K_m называется *константой Михаэлиса*. Из приведенного выше уравнения легко получить выражение для концентрации фермент-субстратного комплекса ES в стационарном состоянии

$$[ES] = ([E][S]) / (K_m + [S]) . \quad (4.7)$$

Поскольку начальная скорость v ферментативной реакции пропорциональна концентрации комплекса ES, можно написать

$$v = k_3[ES]. \quad (4.8)$$

Если концентрация субстрата настолько велика, что практически весь фермент в системе находится в виде фермент-субстратного комплекса ES, то скорость реакции достигает *максимального значения*, которое равно

$$V_{max} = k_3[E], \quad (4.9)$$

где [E] – общая концентрация фермента.

Теперь вместо [ES] можно подставить в выражение (4.8) его значение из уравнения (4.7)

$$v = (k_3[E] [S]) / (K_m + [S]). \quad (4.10)$$

Разделив уравнение (4.10) на уравнение (4.9), получим

$$v / V_{max} = \{(k_3 [E] [S]) / (K_m + [S]) / (k_3 [E]) . \qquad (4.11)$$

Решая это уравнение относительно *v,* имеем

$$V = (V_{max}[S]) / (K_m + [S]) . \qquad (4.12)$$

Это и есть *уравнение Михаэлиса – Ментен*, выражающее количественное соотношение между скоростью ферментативной реакции и концентрацией субстрата [S] при условии, если обе константы V_{max} и K_m известны.

В частном, довольно часто встречающемся случае, когда $v = 1/2V_{max}$

$$V_{max}/2 = (V_{max}[S]) / (K_m + [S]). \qquad (4.13)$$

Разделив обе части уравнения (5.13) на V_{max}, получаем

$$1/2 = [S] / (K_m + [S]) \qquad (4.14)$$

и после соответствующих преобразований имеем

$$K_m + [S] = 2 [S], \qquad (4.15)$$

$$K_m = [S]. \qquad (4.16)$$

Таким образом, легко видеть, что константа Михаэлиса K_m равна *концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину от максимальной.*

K_m имеет размерность моль/л. Обычно значение K_m мало и составляет величину $10^{-2} – 10^{-5}$.

Преобразование уравнения Михаэлиса–Ментен. Уравнение Михаэлиса – Ментен можно алгебраически преобразовать в другие формы, более удобные для графического представления экспериментальных данных.

Одно из наиболее распространенных преобразований сводится к тому, что приравнивают друг другу величины, обратные левой и правой части уравнения (4.12)

$$1 / v = 1 / [(V_{max}[S] / (K_m + [S])] = (K_m + [S]) / V_{max} [S] , \qquad (4.17)$$

то есть имеем

$$1 / v = K_m / V_{max} [S] + [S] / V_{max} [S]. \qquad (4.18)$$

В результате преобразования получаем выражение

$$1 / v = K_m / V_{max} [S] + 1 / V_{max} , \qquad (4.19)$$

которое носит название *уравнения Лайнуивера-Берка.* Согласно этому уравнению, график, построенный в координатах 1 / [S] и 1 / *v,* представляет собой прямую, тангенс угла наклона которой равен K_m/V_{max} (рис.4.4).

Такой график, построенный по *методу двойных обратных величин,* имеет то преимущество, что он дает возможность более точно определить V_{max}.

На кривой, построенной в координатах [S] и *v*, V_{max} является асимптотической величиной и определяется значительно менее точно. Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, на графике Лайнуивера-Берка равен-$1/K_m$. Как мы увидим ниже, из этого графика можно также извлечь ценную информацию, касающуюся ингибирования фермента.

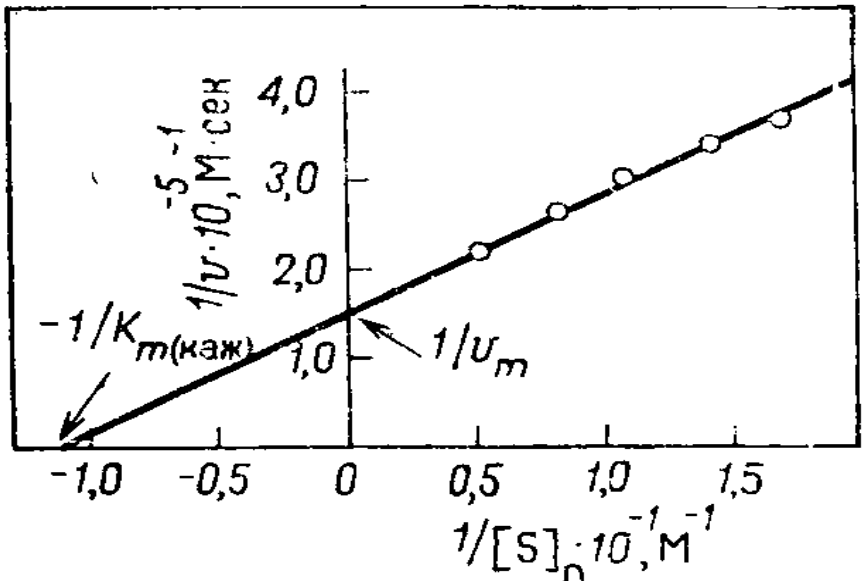


Рис. 4.4. Определение максимальной скорости и кажущейся константы Михаэлиса для гидролиза метилового эфира N-ацетил-L-валина, катализируемого α-химотрипсином в координатах Лайнуивера-Берка

Другое преобразование уравнения Михаэлиса-Ментен состоит в том, что обе части уравнения (4.13) умножают на $V_{max} \cdot v$ и после некоторых дополнительных преобразований получают

$$V = -K_m(v / [S]) + V_{max}. \qquad (4.20)$$

Соответствующий график в координатах v и v / $[S]_0$ представляет собой прямую (рис. 4.5). Такой график, называемый как *график Эди-Хофсти,* не только дает возможность очень просто определить величины V_{max} и K_m, но и позволяет выявить возможные отклонения от линейности, не обнаруживаемые на графике Лайнуивера-Бэрка.

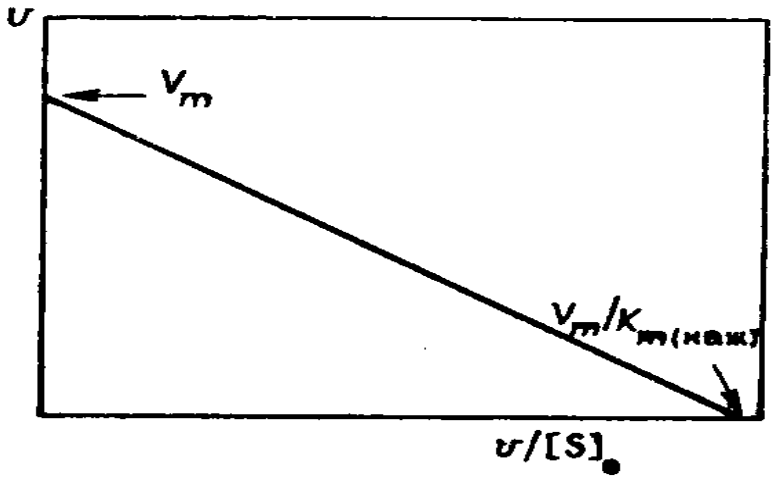


Рис. 4.5. Линеаризация зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в координатах Эди-Ховсти

Существует еще один способ линеаризации уравнения Михаэлиса – Ментен в виде следующей зависимости:

$$[S] / v = K_m / V_{max} + [S] / V_{max} , \qquad (4.21)$$

но оно используется крайне редко, поэтому мы не будем на нем останавливаться.

В большинстве случаев исследователь имеет дело не с одним, а с несколькими субстратами и несколькими ферментами, каждый из которых имеет свой механизм действия. В этом случае речь может идти только об определении некоторых, так называемых «эффективных» константах, которые впрочем, по сложившимся традициям, также называют константами Михаэлиса. Чаще всего при определении таких констант приходится определять не убыль субстрата, а прирост продукта, причем зависимость выхода продукта от времени имеет S-образный характер.

Примером такого гидролиза, как правило, служит гидролиз биополимеров: белков, полисахаридов и полинуклеотидов. В этом случае для определения «эффективных» констант гидролиза можно с определенной долей вероятности использовать следующую систему уравнений

$$P / t = V_{max} - kt ; \quad (4.22)$$

$$\ln v = \ln V_{max} - K_i t ; \quad (4.23)$$

$$K_m = V_{max} / K_i , \quad (4.24)$$

где P – количество освобождающихся в процессе гидролиза концевых групп биополимера, мэкв/мл,
t – время гидролиза, мин,
V_{max} – максимальная скорость гидролиза, мэкв/мин·мл,
k – константа «гашения» процесса гидролиза, мэкв/мл.мин^2,
K_i – константа интенсивности процесса гидролиза, мин$^{-1}$,
K_m – «эффективная» константа Михаэлиса, мэкв/мл.

В графическом выражении определение этих констант будет иметь следующий вид (рис. 4.6):

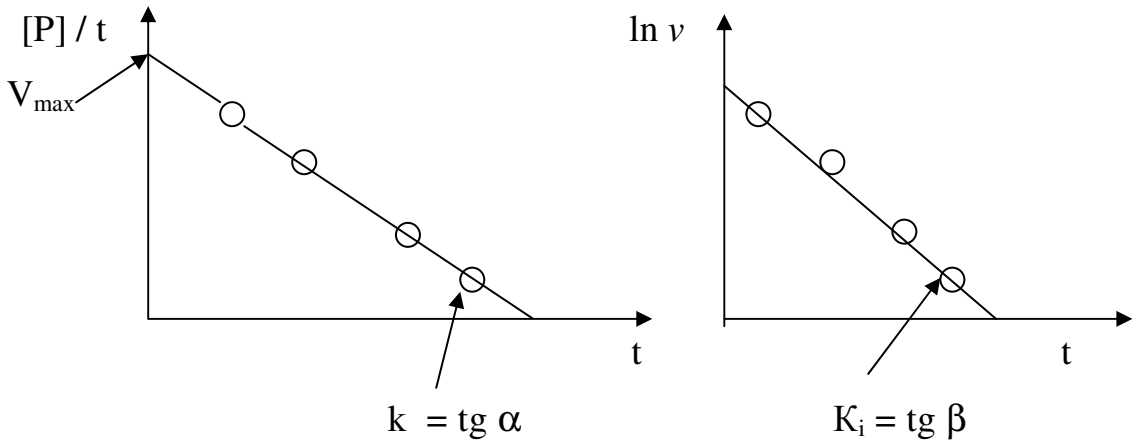


Рис. 4.6. Графическое определение «эффективных» констант Михаэлиса из уравнений (4.22 – 4.24)

Регуляция активности ферментов. Регулировать ферментативную активность могут не только субстраты и образовавшиеся продукты, но и другие вещества, которые называют *модуляторами* или *эффекторами*.

Эффекторы могут быть обычными компонентами клетки, но могут и проникать в клетку из реакционной среды и действовать как на изолированные ферменты, так и на ферментные комплексы. Модуляторы могут быть *ингибиторами* или *активаторами* химической реакции. Обычно ингибитор уменьшает активность ферментов, тогда как активатор

будет ее усиливать. Ингибиторы могут быть полностью обратимыми, частично обратимыми или практически необратимыми.

К числу известных необратимых ингибиторов принадлежат яды, например цианидный ион, полностью инактивирующий фермент *ксантиноксидазу*, а также группа соединений, называемых нервно-паралитическими ядами. Последние необратимо инактивируют *холинэстеразу* – фермент, участвующий в передаче нервных импульсов, и, таким образом, регулирующий двигательную функцию организмов.

Важно четко уяснить себе разницу между неконкурентным и необратимым ингибированием. Количественный анализ конкурентного и неконкурентного ингибирования на основе уравнения Михаэлиса – Ментен строится в предположении, что присоединение ингибитора к ферменту носит обратимый характер. В отличие от этих видов ингибирования при необратимом ингибировании, кинетика инактивации ферментов вообще не подчиняется уравнению Михаэлиса – Ментен.

Необратимый ингибитор, взятый в концентрации, превышающей эквимолярную (по отношению к ферменту), может вначале не давать полного ингибирования, но со временем степень ингибирования будет нарастать, так как действию ингибитора будет подвергаться все большее и большее число молекул фермента. Остальные молекулы фермента, не успевшие прореагировать с ингибитором, будут, однако, сохранять при этом полную активность. Возможен и другой вариант, при котором необратимый ингибитор «портит» молекулу фермента, несколько модифицируя его химическую структуру. В этом случае модифицированный фермент сохраняет способность функционировать, но активность его оказывается пониженной.

Один из широко известных типов необратимого ингибирования – это действие алкилирующих агентов (например, йодацетамида), необратимо реагирующего с активными –SH– группами фермента. Необратимость действия связана с тем, что в реакции

$$E - SH + ICH_2CONH_2 \rightarrow E{-}S{-}CH_2CONH_2 + HI$$

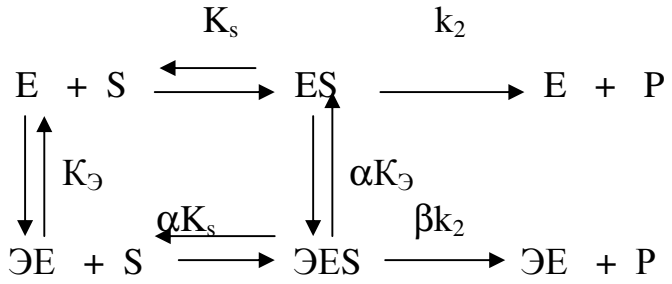
равновесие сильно смещено вправо, т.е. в сторону образования ковалентного производного фермента.

Необратимым ингибитором является также диизопропилфторфосфат (ДФФ). Этот ингибитор относится к классу токсичных фосфорорганических соединений, которые, как уже упоминалось ранее, входят в группу *нервных ядов,* инактивируя ацетилхолинэстеразу.

Помимо ацетилхолинэстеразы, ДФФ ингибирует и ряд ферментов, у которых в активном центре имеется важный для ферментативной активность остаток серина. Ингибитор присоединяется к гидроксильной группе этого остатка серина, в результате чего образуется неактивное

ДФФ-производное фермента, которое достаточно устойчиво и лишь с трудом поддается гидролизу. К ферментам, для которых ДФФ является необратимым ингибитором, относятся уже известные нам химотрипсин, трипсин, тромбин, эластаза, фосфоглюкомутаза и фосфорилаза.

Для того чтобы быть знакомым с другими случаями ингибирования или активации ферментов, рассмотрим следующую схему, учитывающую случаи, когда ферментативная кинетика подчиняется уравнению Михаэлиса – Ментен.



В представленной схеме предусмотрено взаимодействие эффекторов (модуляторов) как со свободной формой фермента, так и с фермент – субстратным комплексом

$$v = \frac{k_2 \dfrac{\alpha K_Э + \beta[Э]}{\alpha K_Э + [Э]}[E]_0[S]_0}{\alpha K_S \dfrac{K_Э + [Э]}{\alpha K_Э + [Э]} + [S]_0} \quad . \qquad (4.25)$$

В зависимости от численных множителей α и β эффектор Э может выступать в роли либо ингибитора, либо активатора ферментативной реакции. Разберем некоторые частные случаи представленного уравнения (4.25).

1. *Полное конкурентное ингибирование* ($\alpha \to \infty$, β не имеет определенного смысла). В случае полного конкурентного ингибирования начальная скорость ферментативной реакции определяется выражением

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S(1 + \dfrac{[I]}{K_1}) + [S]_0} \qquad (4.26)$$

и зависимость в координатах Лайнуивера – Берка будет иметь вид пучка прямых, пересекающихся на оси ординат, как это показано на рис. 4.7.

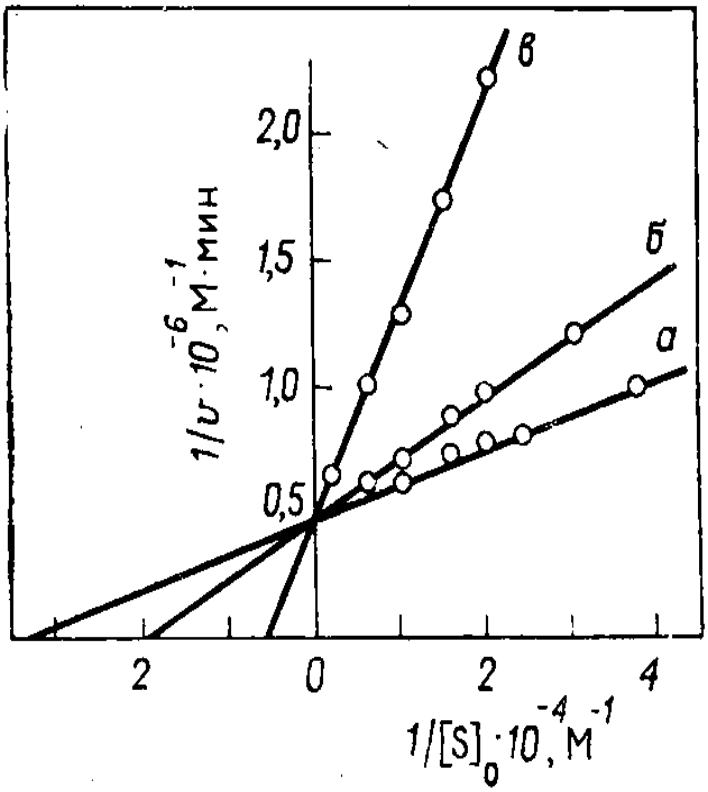


Рис. 4.7. Конкурентное ингибирование α-кетоглутаратом реакции окисления, катализируемой N-метилглутамат-дегидрогеназой. Концентрации ингибитора: а – 0, б – $6\cdot10^{-4}$ М, в – $3\cdot10^{-3}$ М

Константу конкурентного ингибирования K_i можно определить с помощью выражения (4.27), откладывая экспериментальные данные в координатах ($K_{m(каж)}$, [I])

$$K_{m(каж)} = K_s\,(1 + [\,I\,] / K_i\,). \qquad (4.27)$$

Для определения константы ингибирования распространен так же так называемый метод Диксона, согласно которому экспериментальные данные откладывают в координатах (1/v , [I]), так, как это показано на рис. 4.8.

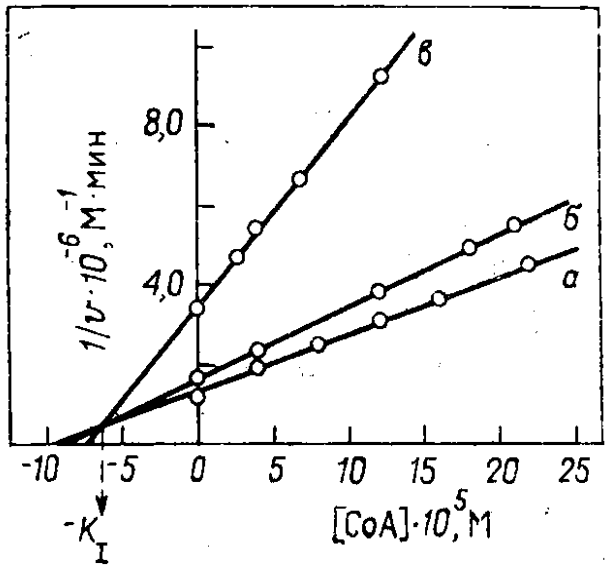
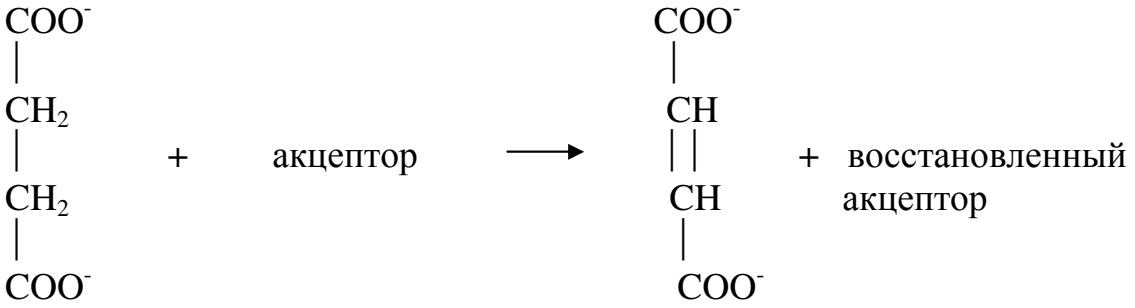


Рис. 4.8. Применение координат Диксона для определения константы конкурентного ингибирования коферментом *А* реакции фосфотрансацетилирования, катализируемое фосфатацетилтрансферазой. Концентрация нуклеотидного субстрата (ацетил- CoA): а – $1{,}25\cdot10^{-4}$М; б – $8{,}5\cdot10^{-5}$ М; в – $3{,}5\cdot10^{-5}$ М

Классическим примером конкурентного ингибирования служит ингибировние сукцинатдегидрогеназы малонатом и другими дикарбоновыми кислотами.



Сукцинатдегидрогеназа относится к группе ферментов, катализирующих реакции цикла трикарбоновых кислот, так называемого цикла Кребса, обеспечивающего многие реакции организма энергией и необходимыми химическими компонентами. Этот фермент катализирует отщепление двух атомов водорода от двух метиленовых углеродов сукцината. Сукциндегидрогеназа ингибируется малонатом, который напоминает сукцинат тем, что при pH 7,0 он также имеет две ионизированные карбоксильные группы

$$^{-}OOC—CH_2—COO^{-}$$

Однако от малоната сукцинатдегидрогеназа не может отщеплять водород. Иначе говоря, «ключ» войдя в «замочную скважину» – активный центр фермента, не способен открыть «замок», в результате чего реакция не происходит. В данном случае ингибирование является конкурентным, так как сукцинат и малонат конкурируют за один и тот же *активный центр* фермента за счет их близкого химического сродства. Конкурентное ингибирование можно устранить дополнительным количеством субстрата, добавленного в реакционный раствор.

Характерной чертой *полного конкурентного ингибирования*, как это видно из представленного рис. 4.8 является то, что в данном случае изменяются только константы Михаэлиса, тогда как максимальная скорость реакции $V_{мах}$ остается неизменной. Конкурентным ингибитором другого фермента может быть α-кетоглутарат, константу ингибирования которого можно определить графическим путем, как это показано на рис. 4.8.

2. *Полное неконкурентное ингибирование* ($\alpha = 1$, $\beta = 0$). В случае полного неконкурентного ингибирования выражение для начальной скорости ферментативной реакции имеет вид

$$v = \frac{\dfrac{k_2}{1+[I]/K_I}[E]_0[S]_o}{K_S + [S]_0} \quad . \qquad (4.28)$$

Зависимость в координатах Лайнуивера – Берка имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси абсцисс, как это показано на рис. 4.9, из которого видно, что в отличие от *полного конкурентного ингибирования*, при *полном неконкурентном ингибировании* константа Михаэлиса остается неизменной, а изменяется только максимальная скорость реакции, уменьшаясь при увеличении концентрации ингибитора, которое не удается устранить даже при повышении концентрации субстрата.

Константу неконкурентного ингибирования можно определить с помощью выражения

$$k_{кат} = k_2 / (1 + [\,I\,] / K_I)\,, \qquad (4.29)$$

построением экспериментальных данных в координатах ($1 / k_{кат.}$, [I]), или с помощью метода Диксона, так, как это показано на рис. 4.10.

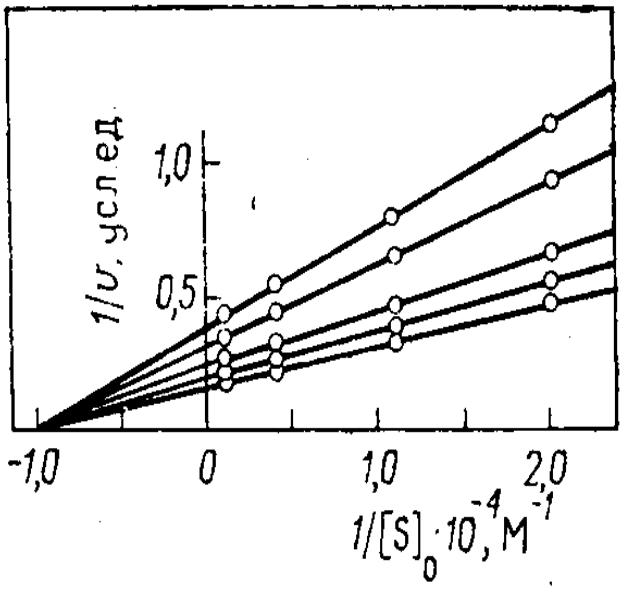


Рис. 4.9. Неконкурентное ингибирование бензоатом 1,2,5 - триметилпипередола-4 реакции гидролиза бутирилхолина, катализируемое холинэстеразой

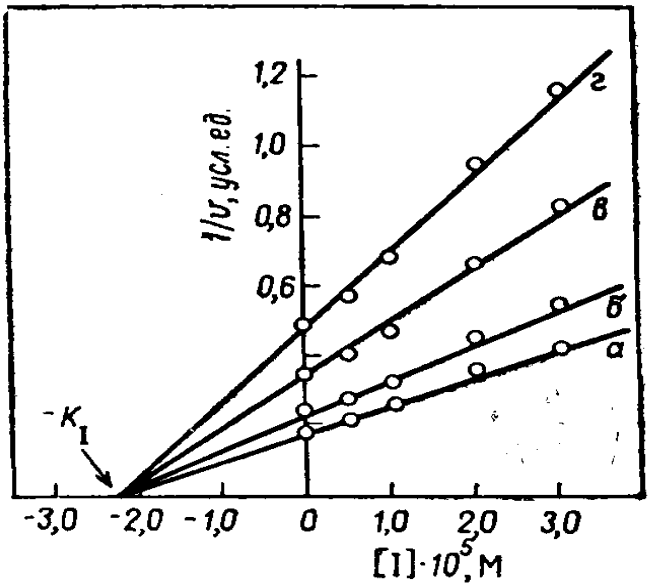


Рис. 4.10. Определение в координатах Диксона константы неконкурентного ингибирования гидролиза бутирилхолина, катализируемого холинэстеразой. Концентрация субстрата: а – $1 \cdot 10^{-3}$ М; б – $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ М; в – $9{,}1 \cdot 10^{-5}$ М; г – $5 \cdot 10^{-5}$ М

Наиболее общий тип неконкурентного ингибирования имеет место при действии реагентов, обратимо связывающихся с –SH группами

остатков цистеина. Эти остатки цистеина, как уже отмечалось ранее, играют важную роль в каталитической активности ряда ферментов. Ионы тяжелых металлов (Cu^{2+}, Hg^{2+} и Ag^{+}) или их производные ингибируют такие ферменты, реагируя с –SH группами, в результате чего образуются меркаптиды. Количество фермента, переходящего в меркаптидную форму, определяется быстро устанавливающимся равновесием с ионами свободного металла

$$E\text{–}SH + Ag^{+} = E\text{–}S\text{–}Ag + H^{+}.$$

Эти –SH группы могут оказать существенное влияние на активность фермента не только в тех случаях, когда они локализованы непосредственно в активном центре, но и тогда, когда они расположены на некотором расстоянии от него. В этом случае их роль заключается в поддержании стабильности пространственной структуры молекулы фермента. Другим неконкурентным ингибитором может быть 1,2,3-триметилпипередол-4 (β-изомер) в реакции гидролиза бутирилхолина, катализируемого холинэстеразой, (см. рис. 4.10), позволяющим сравнительно легко определить константу ингибирования – K_I этой реакции.

Еще одним примером неконкурентного ингибирования может служить действие на некоторые ферменты этилендиаминтетрацетата (ЭДТА), обратимо связывающего ионы Mg^{2+} и другие двухвалентные катионы, которые являются коферментами для ферментов.

3. *Бесконкурентное или антиконкурентное ингибирование*. ($\alpha = \beta < 1$). В случае бесконкурентного типа ингибирования константы $k_{кат}$ и $K_{m(каж)}$ ферментативной реакции уменьшаются в одинаковой степени, как это видно из уравнения (4.30)

$$v = \frac{\alpha k_2 \dfrac{K_I + [I]}{\alpha K_I + [I]} [E]_0 [S]_0}{\alpha K_S \dfrac{K_I + [I]}{\alpha K_I + [I]} + [S]_0} \quad . \qquad (4.30)$$

График соответствующей зависимости в координатах Лайнуивера – Берка имеет вид семейства параллельных прямых (см. рис. 4.11).

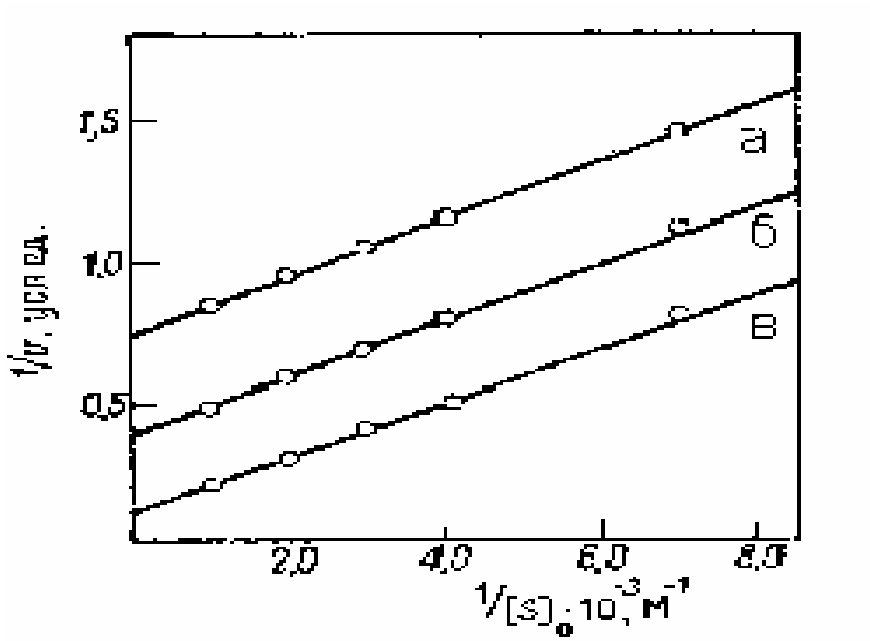


Рис. 4.11. Бесконкурентное или антиконкурентное влияние метйодида на кинетику гидролиза 1-нафтилацетата, катализируемого ацетилхолинэстеразой. Концентрация ингибитора: а – 0; б – $1{,}04\cdot10^{-7}$ М; в – $2{,}56\cdot10^{-7}$ М

$$k_{кат} = \alpha k_2 \frac{K_1 + [I]}{\alpha K_I + [I]} \qquad (4.31)$$

можно преобразовать к виду

$$1 / (k_{кат} / k_2 - 1) = 1 / \alpha - 1 + (\alpha K_1 / \alpha - 1) \cdot (1 / [\,I\,]), \qquad (4.32)$$

из которого видно, что линеаризация экспериментальных данных в координатах ($1/v$, $1 / [\,I\,]$) позволяет раздельно найти значения α и K_I.

Как уже отмечалось выше, параллельность прямых в координатах Лайнуивера – Берка может указывать на бесконкурентный ($\alpha = \beta < 1$) или антиконкурентный ($\beta = 0$, $K_э = \infty$) характер ингибирования, различить которые можно построением в координатах Диксона ($1/v$, $[\,I\,]$). При бесконкурентном ингибировании линеаризация в координатах Диксона не должна наблюдаться. В случае антиконкурентного ингибирования прямые в координатах Диксона, соответствующие различным концентрациям субстрата, должны быть параллельными (см. рис. 4.12).

Из тангенса угла наклона в координатах Диксона, равного $1/ K \cdot Vmax$, можно найти константу ингибирования фермент-субстратного комплекса K_i.

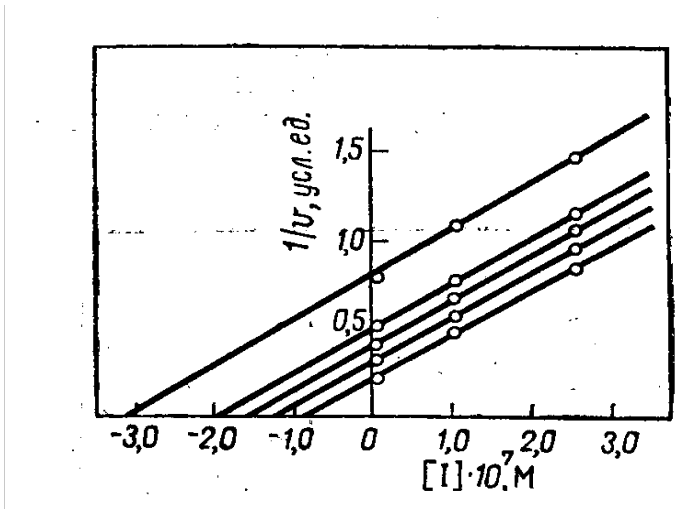
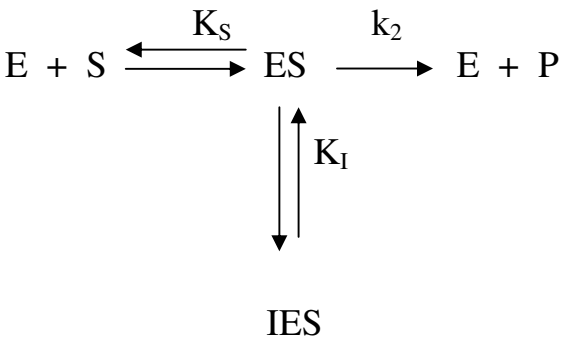


Рис. 4.12. Обработка кинетических данных, соответствующих антиконкурентному типу ингибирования в координатах Диксона

В этом случае ингибитор связывается только с фермент-субстратным комплексом и не связывается со свободным ферментом



4. *Неконкурентная активация* ($\alpha = 1$, $\beta > 1$). В случае неконкурентной активации субстрат и активатор связываются независимо с активным центром, образуя тройной комплекс (фермент – субстрат – активатор) и приводя к увеличению скорости образования продукта, так что начальная скорость ферментативной реакции определяется выражением

$$v = \frac{k_2 \dfrac{K_A + \beta[A]}{K_A + [A]} [E]_0 [S]_0}{K_S + [S]_0}, \qquad (4.33)$$

и зависимость в координатах Лайнуивера – Берка имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси абсцисс (рис. 4.13). Анализ уравнения (4.33) можно проводить с помощью выражения

$$k_{кат} = k_2 \frac{K_A + \beta[A]}{K_A + [A]}, \qquad (4.34)$$

преобразованного в виде

$$\frac{1}{\frac{k_{кат}}{k_2} - 1} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{K_A}{\beta - 1} \bullet \frac{1}{[A]}, \qquad (4.35)$$

Из выражения (4.35) видно, что построение графика в координатах ($1 / \frac{k_{кат}}{k_2} - 1$, 1 / [A]) позволяет провести раздельное определение констант β и K_A.

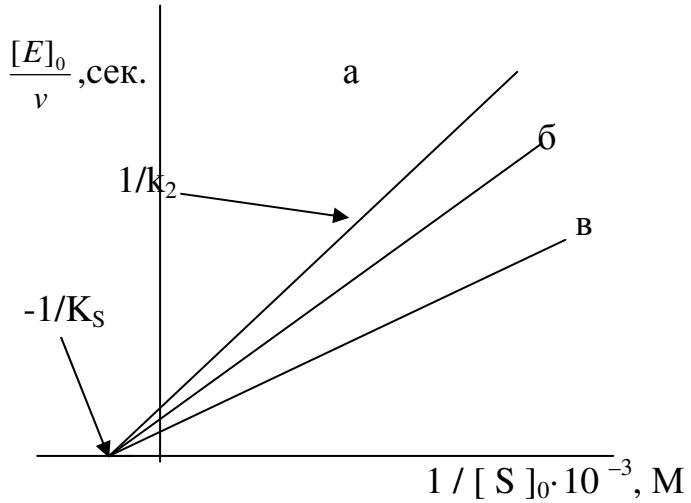


Рис. 4.13. Неконкурентная активация катионами Mg^{2+} реакции гидролиза *n*-нитроанилида-L-лейцина, катализируемая лейцинамино-пептидазой. Концентрации активатора : а – 0; б – $1 \cdot 10^{-4}$ M; в – $5 \cdot 10^{-4}$ M

5. *Смешанные типы ингибирования и активации* (α ≠ 1, β ≠ 1). В случае смешанных типов ингибирования или активации графики в координатах Лайнуивера–Берка имеют вид пучка прямых, соответствующих различным концентрациям эффектора и пересекающихся в общей точке в правом верхнем, левом верхнем или левом нижнем квадрате (в зависимости от числовых значений α и β и соотношения между ними). Координаты точки пересечения во всех случаях являются следующими:

$$\frac{1}{[S]_0} = \frac{1}{K_S} \cdot \frac{\beta - 1}{\alpha - \beta}\ ; \qquad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_M} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha - \beta}. \qquad (4.36)$$

Из выражений (4.36) видно, что положение точки, в которой происходит пересечение пучка прямых зависимости $1/v$ от $1/[S]_0$ при различных концентрациях эффектора, определяется лишь значениями констант α и β и не зависит от величины концентрации эффектора, т.е. $K_э$.

Таким образом, вид графика в координатах Лайнуивера – Берка может быть использован для определения типа влияния эффектора на ферментативную реакцию и для оценки интервалов значений α и β.

4.5. Влияние pH на кинетику ферментативных реакций

Известно, что аминокислоты могут быть основными (лизин, аргинин, гистидин, орнитин), кислыми (аспарагиновая и глутаминовая кислоты) и нейтральными (все остальные аминокислоты). Поэтому фермент, в молекулу которого входят все эти аминокислоты, при любом заданном значении может содержать как положительно, так и отрицательно заряженные группы. В том случае, когда положительные и отрицательные заряды фермента уравновешены, считается что фермент находится в *изоэлектрической точке.*

Заряженные группировки часто входят в состав активного центра ферментов, так как в основе целого ряда механизмов ферментативного катализа лежит катализ кислотного или основного типов. Необходимым условием для осуществления кислотного или основного катализа может быть наличие определенного заряда на ионизируемых группах активного центра. Отсюда следует, что каталитически активная форма фермента существует только в *одном, строго определенном, состоянии ионизации.* В зависимости от pH окружающей среды в это состояние может превращаться большая или меньшая часть всего имеющегося в смеси фермента.

Для большинства ферментов имеется определенное значение pH, при котором их активность максимальна; выше и ниже этого значения pH активность этих ферментов может быть меньше. Однако не во всех случаях кривые, описывающие зависимость активности фермента от pH, имеют колоколообразную форму; иногда эта зависимость может выражаться и прямой, как это видно из рис. 4.14. Форма зависимости активности какого-либо фермента от pH определяется: 1) величинами pK′ ионизируемых групп активного центра фермента, участвующих в связывании субстрата; 2) величинами pK′ функциональных групп молекулы субстрата, участвующих в связывании субстрата с ферментом;

3) величинами pK′ функциональных групп молекулы фермента, ответственных за каталитизируемую реакцию и 4) величинами pK′ других групп фермента, состояние ионизации которых может определить специфическую, каталитически активную, конформацию молекулы фермента.

Обычно при построении кривых, описывающих зависимость активности фермента от pH, измерение при всех значениях pH обычно проводят в условиях насыщения фермента субстратом, поскольку величина K_m для многих ферментов меняется с изменением величины pH.

Кривая, характеризующая зависимость активности фермента от pH, может иметь особенно простую форму в тех случаях, когда фермент действует на электрически нейтральные субстраты или субстраты, у которых заряженные группы не играют существенной роли в каталитическом акте. Примером таких ферментов служит папаин (см. рис. 4.14), а также инвертаза, катализирующая гидролиз нейтральных молекул сахарозы и сохраняющая постоянную активность в интервале pH 3,0 – 7,5.

Значение pH, соответствующее максимальной активности фермента, не обязательно совпадает со значением pH, характерным для нормального внутриклеточного окружения этого фермента, оно может быть как выше, так и ниже оптимума pH. Это позволяет предположить, что влияние pH на активность фермента может быть одним из факторов, ответственных за регулирование ферментативной активности внутри клетки. Поскольку в клетке содержатся сотни ферментов, и каждый из них по-разному реагирует на изменения pH, значение pH внутри клетки является, возможно, одним из важных элементов в сложной системе регуляции клеточного механизма.

Математическое выражение, связывающее активность фермента с pH, можно получить с помощью следующей модели ионизации активного центра

$$E \underset{+H^-}{\overset{-H^+}{\rightleftarrows}} E^- \underset{+H^-}{\overset{-H^+}{\rightleftarrows}} E^{2-},$$

где K_1 и K_2 – константы равновесия первой и второй стадии ионизации соответственно.

В кислотно-основных реакциях E^- обозначает активную форму фермента, а E и E^{2-} неактивные формы, образующиеся соответственно при протонировании и депротонировании активного центра. Очевидно, что условия равновесия для двух ступеней ионизации будут иметь следующий вид

$$\frac{[H]^{+}[E]^{-}}{[E]} = K_1 \; ; \qquad \frac{[H]^{+}[E]^{2-}}{[E]^{-}} = K_2 . \qquad (4.37)$$

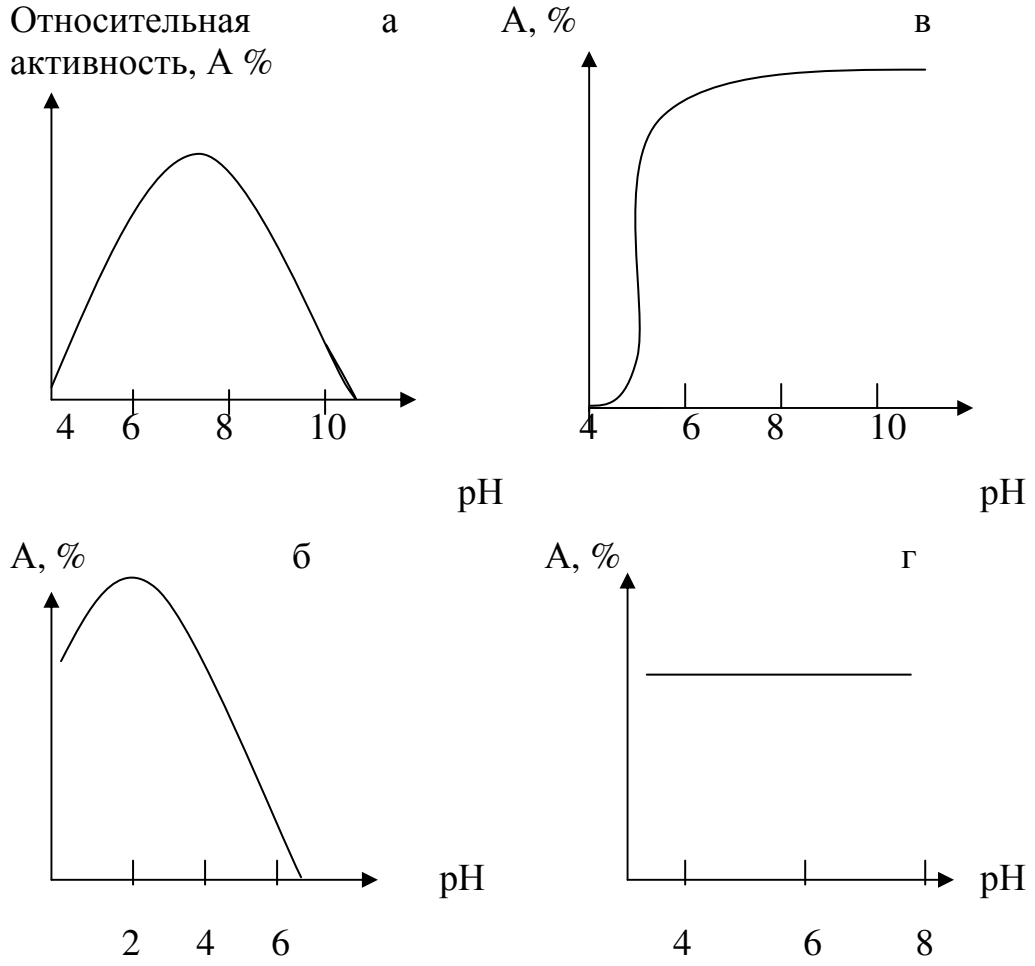


Рис. 4. 14. Кривые, характеризующие зависимость активности некоторых ферментов от pH: а – трипсин, б – пепсин, в – холинэстераза, г –папаин (субстрат — бензоиларгининамид)

Из выражения (4.37) определим относительное количество фермента, находящегося в активной форме, обозначив общее количество фермента в виде $[E]_0$, тогда

$$[E]_0 = [E] + [E]^{-} + [E]^{2-}.$$

Т а б л и ц а 4.2

Оптимум pH некоторых ферментов, катализирующих превращение отдельных субстратов

Фермент и субстрат	Оптимум pH	Фермент и субстрат	Оптимум pH
Пепсин		Трипсин	
Яичный альбумин	1,5	Бензоиларгининамид	7,7
Гемоглобин	2,2	Этиловый эфир бензоиларгининамида	7,0
Пируваткиназа		Щелочная фосфотаза	
Пируват	4,8	Глицеро-3-фосфат	9,5
Фумараза		Аргиназа	
Фумарат	6,5	Аргинин	9,7
Малат	8,0		
Каталаза			
H_2O_2	7,6		

Обозначим активную фракцию фермента как y^-, которая будет равна $\frac{[E]^-}{[E]_0}$ и определяется по уравнению (4.38)

$$y^- = \frac{1}{1+[H]/K_1 + K_2[H]^+}. \qquad (4.38)$$

Это уравнение представляет собой одну из pH-функций Михаэлиса. Две другие y и y^{2-} определяют отношение количества фермента, находящегося в кислой и основной формах соответственно. Функция y^- имеет один максимум при следующем значении pH

$$[H]^+_{opt.} = \sqrt{K_1.K_2} \quad \text{или} \quad pH_{opt} = 1/2\ (pK_1 + pK_2),$$

где

$$pK_i = -\lg K_i. \qquad (4.39)$$

Выражение для максимальной скорости реакции можно получить, взяв вместо общей концентрации фермента $[E]_0$ общую концентрацию его активной формы $[E]_0 y^-$, тогда

$$V_{max} = k\,[E]_0\, y^- = \frac{k[E]_0}{1+[H]^+/K_1 + K_2[H]^+}. \qquad (4.40)$$

Имея данные по активности фермента при различных значениях pH, можно с помощью последнего уравнения определить величины K_1 и K_2. Действительно, pH максимальной активности фермента связан с K_1 и K_2 уравнением (4.39). Определяя экспериментальным путем зависимость ферментативной активности от pH устанавливают независимую взаимосвязь между K_1 и K_2, позволяя таким образом определить оба этих параметра. Константа Михаэлиса, как правило, не зависит от значения pH и поэтому ее значение достаточно мало при экспериментальном определении.

.

4.6. Влияние температуры на скорость ферментативных реакций

Известно, что скорость любой химической реакции при повышении температуры увеличивается, если при этом не происходит вторичных изменений реагентов и катализатора. Исключением из этого правила является уменьшение скорости ферментативной реакции при температурах, вызывающих денатурацию фермента.

Хорошо известно правило, называемое законом голландского ученого Я.Х. Вант-Гоффа – при повышении температуры на 10° скорость реакции удваивается. Отношение константы скорости при двух температурах, различающихся на десять градусов, обозначают символом Q_{10}. Величина $Q_{10} = 2$ характерна для многих реакций, поскольку все они имеют приблизительно одинаковую энергию активации. Энергия активации – это фундаментальное понятие, фигурирующее в уравнении Аррениуса.

Пытаясь установить математическое соотношение между температурами, при которых протекает реакция, и константами равновесия, Вант-Гофф вывел уравнение, носящее его имя

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H^0 (T_2 - T_1)}{R(T_2 T_1)}. \qquad (4.41)$$

Эта интегральная форма уравнения получена из дифференциальной, которая выражает скорость изменения величины ln К в зависимости от температуры

$$\frac{d(\ln K)}{dT} = \frac{\Delta H^0}{R}\frac{1}{T^2}. \qquad (4.42)$$

Поскольку константа равновесия реакции представляет собой отношение констант скорости прямой и обратной реакций, Аррениус предположил, что аналогичная математическая форма, по-видимому, должна описывать также влияние температуры на константу скорости реакции

$$\frac{d(\ln k)}{dT} = a\frac{1}{T^2}. \qquad (4.43)$$

Полагают, что постоянный член *a* аналогичен члену ΔH / R, в котором ΔH замещен на E_a – энергию активации. После интегрирования уравнение (4.43) принимает вид

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln A, \qquad (4.44)$$

или в экспоненциальной форме

$$k = Ae^{-Ea/RT}. \qquad (4.45)$$

Можно записать его и в форме, соответствующей форме уравнения (4.41)

$$ln\frac{k_{T_2}}{k_{T_1}} = \frac{E_a(T_2 - T_1)}{RT_2T_1}. \qquad (4.46)$$

Чтобы различить две константы скорости во избежание ошибок вместо простых подстрочных индексов 2 и 1 лучше использовать индексы T_2 и T_1. Уравнения (4.44) и (4.45) известны как различные формы уравнения Аррениуса. Уравнение (4.45) очень удобно для графического выражения данных. Если вдоль одной оси координат откладывать lnk, а вдоль другой 1/T, то наклон кривой будет равен $-E_a/R$, откуда легко определить энергию активации.

Как правило, до температуры денатурации белков, т.е. до температуры 45 – 60^0C большинство ферментов подчиняется уравнению Аррениуса и ускоряет реакции при повышении температуры от 20 до 50^0C.

На рис. 4.15 приведен пример определения энергии активации одного из ферментов – катехолазы. В экспериментах с котехолазой скорость реакции при определенной температуре зависит от концентрации фермента и субстрата

$$\text{скорость} = k\,[E]\,[S]. \qquad (4.47)$$

Если концентрации компонентов постоянны, то

$$\frac{\textit{Скорость при } T_2}{\textit{Скорость при } T_1} = \frac{k_{T_2}}{k_{T_1}}. \qquad (4.48)$$

Данные, приведенные на рис. 4.15, довольно интересны в том отношении, что вычисленная из них величина E_a, равная 12,5 кДж/моль гораздо ниже, чем у обычных значений энергий активаций, и характерна для реакций, катализируемых ферментами.

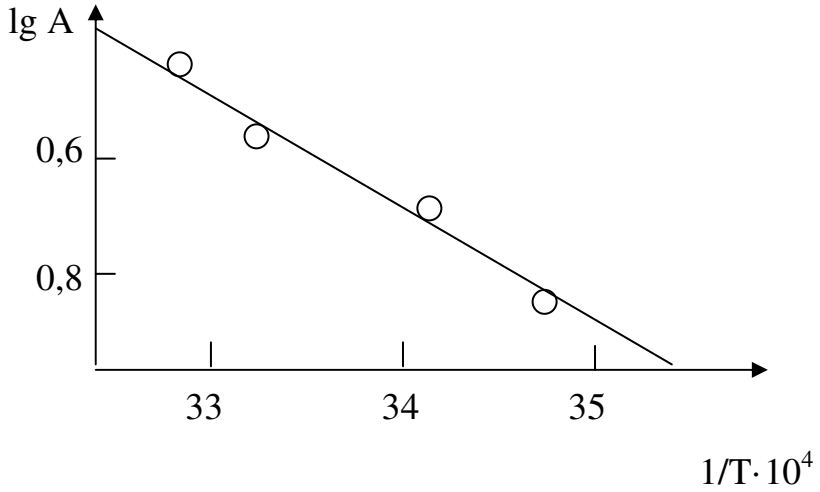


Рис. 4.15. Зависимость логарифма активности катехолазы от 1/T

Вместо активности фермента на оси ординат можно откладывать значения максимальной скорости реакции (V_{max}) или значения каталитических констант ($k_{кат}$), результат будет один и тот же.

Энергия активации в отличии от ΔH всегда имеет положительный знак и равна *молярному увеличению энергии, которое необходимо сообщить реагирующим молекулам для образования продуктов.* Если построить диаграмму экзотермической реакции, отложив вдоль оси ординат энергию, а вдоль оси абсцисс путь реакции, то получится кривая потенциальной энергии, показанная на рис. 4.16.

Реакция является экзотермической потому, что продукты реакции расположены на более низком энергетическом уровне, чем реагенты, что характерно для катализируемых и некатализируемых реакций. В том случае, если реакция происходит в присутствии ферментов, энергетический уровень реагентов и продуктов при их взаимодействии с

катализатором изменяется и, кроме того, происходит понижение энергетического барьера реакции. Это обстоятельство позволяет ферментативным реакциям, как уже отмечалось ранее, протекать при умеренных температурах и при нейтральных значениях pH. На рис.4.17 показана кривая потенциальной энергии для ферментативной системы

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} \text{переходное состояние } EZ \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} \text{комплекс } EP \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\rightleftarrows}} E + P$$

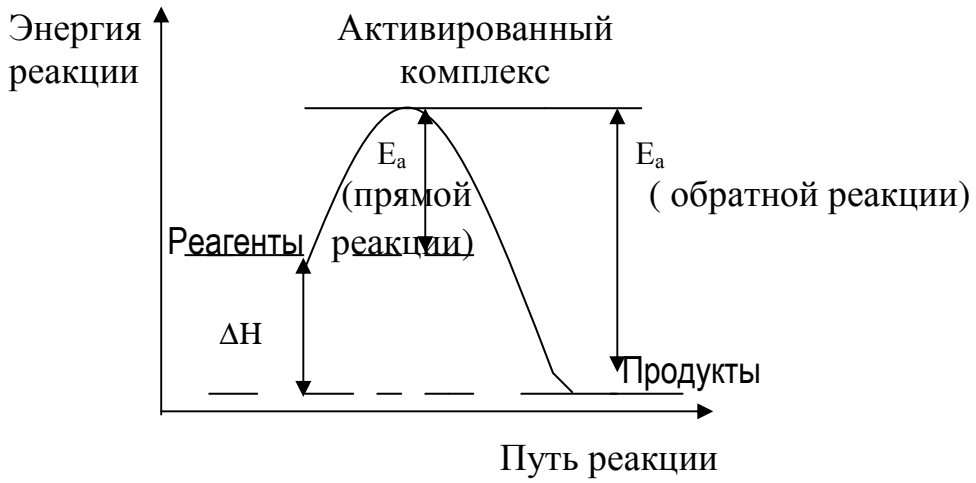


Рис. 4.16. Кривая потенциальной энергии для экзотермической некатализируемой реакции

Энтальпия реакции ΔH рассчитывается из уравнения Вант-Гоффа (4.41) или непосредственно измеряется методом калориметрии. Рис. 4.17 может быть использован для выявления связи между различными понятиями ферментативной кинетики и общей кинетической теории. Если принять, что константа Михаэлиса K_M ($K_M = k_{-1}/k_1$) представляет собой, как это иногда бывает, константу диссоциации комплекса ES, то можно рассчитать разницу между энергиями состояний E + S и ES. При образовании комплекса ES справедливо соотношение $1/K_M = K_{eq}$. Подставив в уравнение Вант-Гоффа $1/K_M$ при T_1 и T_2 можно найти ΔH_{ES}. Аналогичный подход можно использовать и для обратной реакции, чтобы определить разницу между энергиями состояний E + P и EP.

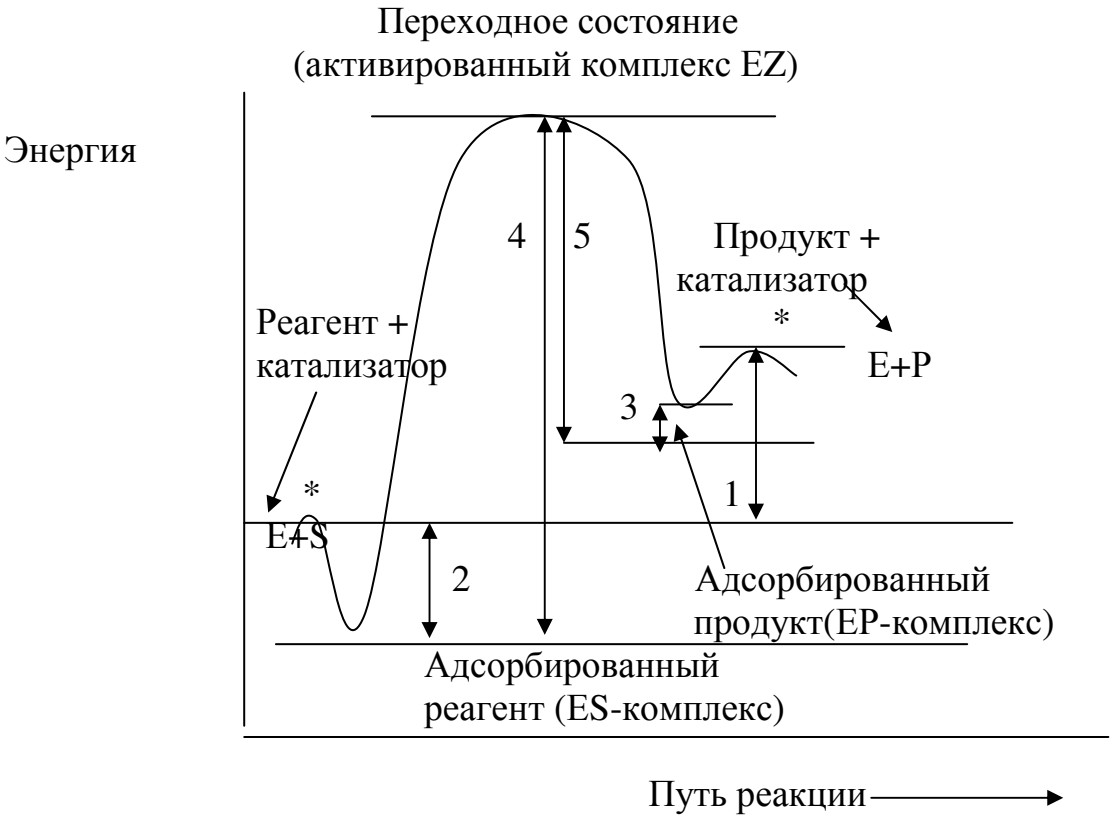


Рис. 4.17**.** Кривая потенциальной энергии для эндотермической реакции, катализируемой ферментом: E – фермент, S – субстрат, P –продукт, EZ – переходное состояние активированного комплекса, * –небольшие энергетические барьеры между состояниями E+S и ES и между состояниями E+P и EP. 1 – ΔH реакции, рассчитывается из K_{eq} при T_1 и T_2; 2 – ΔH образования комплекса ES, рассчитывается из $1/K_M$ для реакции в прямом направлении при T_1 и T_2; 3 – ΔH образования комплекса EP, рассчитывается из $1/K_M$ для обратной реакции при T_1 и T_2; 4 и 5 – энергия активации соответственно прямой $E_{a(пр.р)}$ и обратной реакции $E_{a(обр.р)}$, рассчитываются из констант скорости k при T_1 и T_2 по уравнению Аррениуса

Как уже отмечалось ранее, термическая инактивация ферментов приводит к изменению структуры активного центра и может быть обратимой, необратимой и смешанной. В предыдущих разделах мы уже рассматривали обратимую термическую инактивацию ферментов, для которой в известных температурных приделах выполняется уравнение Аррениуса. Основываясь на уравнении Аррениуса, можно находить температурные интервалы не только обратимой ферментативной реакции, но и условия ее ускорения.

Ранее уже говорилось о связи ферментативной реакции со вторым законом термодинамики, рассмотрим еще одну относительно простую модель термической инактивации ферментов. Согласно этой модели активная $E_{ак}$ и неактивная E_i формы фермента находятся в равновесии, т.е.

$E_{ак} = E_i$, тогда константа равновесия этой реакции может быть выражена следующим образом:

$$[E]_I / [E]_{ак} = K_d = \exp(-\Delta G_d/RT) = \exp(-\Delta H_d/RT)\exp(\Delta S_d/R). \qquad (4.49)$$

В этом уравнении символами ΔG_d, ΔH_d и ΔS_d обозначены: свободная энергия Гибса, энтальпия и энтропия инактивации соответственно.

Хотя водородные связи, стабилизирующие структуру молекулы, сравнительно слабы (12–30 кДж/моль) энтальпия инактивации, а, следовательно, и устойчивости ферментов, достаточно высока и составляет, например, для трипсина и лизоцима соответственно 280 и 303 кДж/моль. Инактивация этих ферментов сопровождается изменением энтропии, равным +878 Дж/моль·К. Благодаря высокой энтальпии денатурации уже небольшие изменения температуры существенно изменяют относительное количество активной формы фермента. При таких высоких значениях ΔH_d фермент инактивируется практически полностью в диапазоне 30°.

Поскольку весь фермент существует либо в активной, либо в неактивной форме, то

$$[E]_0 = [E]_{ак} + [E]_I. \qquad (4.50)$$

Объединяя уравнение (4.49) с уравнением (4.50), можно найти, что

$$[E]_a = \frac{[E]_0}{1+K_d} \quad . \qquad (4.51)$$

4.7. Методы стабилизации ферментов

Помимо поиска более устойчивых природных форм существует ряд методов повышения стабильности уже известных ферментов или ферментных препаратов. Эти методы можно разделить на три основные группы:

а) добавление стабилизирующих веществ к среде, в которой хранится фермент или проводится ферментативная реакция;

б) химическая модификация растворимого белка;

в) иммобилизация белка на поверхности либо во всем объеме нерастворимого твердого носителя или матрицы.

В этой краткой главе основное внимание будет уделено первым двум методам стабилизации, что же касается иммобилизации ферментов и ее влияния на их устойчивость, то этому будут посвящены специальные главы этого пособия.

К веществам, повышающим устойчивость белков, относятся субстраты, органические растворители и соли. Поскольку активный центр фермента часто представляет собой одновременно и наиболее лабильный участок его молекулы, то присутствие субстрата может стабилизировать фермент путем закрепления части молекулы белка в виде фермент-субстратного комплекса. С другой стороны, известны случаи дестабилизации ферментов соответствующими субстратами. Растворители типа многоатомных спиртов, стабилизирующие некоторые ферменты, возможно, повышают устойчивость внутримолекулярных водородных связей белка. При низких концентрациях солей (< 0,1 М) ряд катионов, например, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Mo^{2+} и Cu^{2+}, специфично взаимодействуют с особыми ферментами, называемыми *металлоферментами.* Как уже отмечалось ранее, некоторые из перечисленных катионов являются кофакторами, и их присутствие стабилизирует фермент. Катион Ca^{2+} участвует в стабилизации третичной структуры ряда белков. Образуя ионные связи с двумя различными аминокислотными остатками, ионы Ca^{2+} могут выполнять функцию стабилизирующего мостика аналогично дисульфидным связям.

Примеры влияния различных веществ на стабильность ферментов приведены в табл. 4.3. Следует подчеркнуть, что влияние данного вещества или фактора на стабильность какого-либо фермента не всегда означает, что это вещество или фактор будут таким же образом действовать и на другие ферменты. С другой стороны, стабилизирующий эффект часто проявляется только при определенном сочетании раствора и температуры. Например, добавление небольших количеств солей стабилизирует ферменты, а более высокие концентрации тех же солей обычно вызывают их денатурацию. Это правило относится и к органическим растворителям.

Для повышения стабильности ферментов сравнительно успешно использовался также такой важный инструмент биохимических исследований, как химическая модификация белков. В одном из вариантов этого метода модификации подвергают боковые цепи остатков некоторых аминокислот, например путем ацилирования, восстановительного алкилирования или конденсации аминогрупп нативного белка с боковыми цепями полиаминокислот.

Другой вариант химических методов стабилизации белков основан на применении бифункциональных реагентов, например глутарового диальдегида. Такие реагенты образуют поперечные связи между аминогруппами белка и тем самым, во-первых, затрудняют доступ протеаз к белку и, во-вторых, могут закреплять активную конформацию белковых молекул. Для химической стабилизации могут применяться и диамиды, связывающие поперечными амидными связями аминные и карбоксильные группы. Эти реагенты и соответствующие реакции будут рассмотрены

подробнее в ходе изучения их применения для иммобилизации ферментов и получения технологических биокатализаторов.

Таблица 4.3

Примеры методов стабилизации ферментов

Фермент	Метод стабилизации	Результат стабилизации
Глюкоамилаза	Добавление аналогов субстрата – глюкозы, глюконолактона	Повышение термической устойчивости
Лактатдегидрогеназа	Добавление субстрата (лактата) или эффектора (фруктозодифосфата)	Повышение термической устойчивости; дестабилизация в присутствии другого субстрата (пирувата)
α-Амилаза	Добавление 50–70% сорбита	Повышение термической устойчивости и устойчивости при хранении
Химотрипсин	Добавление 50–90% глицерина	Повышение устойчивости к протеолизу
β-Галактозидаза	Добавление 5–10% этанола или пропанола	Повышение термической устойчивости; метанол или *н*-пропанол в тех же концентрациях дестабилизируют фермент
α-Амилаза (из *Bacillus caldolyticus*)	Добавление Ca^{2+}	Значительное повышение термической устойчивости
Трипсин	Конденсация полиаланина (около 10 аминокислотных остатков) с аминогруппам	Повышение устойчивости к протеолизу и тепловой инактивации белка
Аспарагиназа	Введение сукцинильных групп обработкой янтарным ангидридом	Повышение устойчивости к протеазам

Продолжение табл. 4.3

Гликогенфосфорилаза	Введение бутильных или пропильных заместителей обработкой альдегидом и $NaBH_4$	Повышение термической устойчивости
Папаин	Образование поперечных связей с помощью глутарового диальдегида	Повышение термической устойчивости

4.8. Ферментативные реакции в гетерогенных системах

Помимо ферментативных реакций в гомогенных системах, где все компоненты реакции находятся в растворе, в природе и в биотехнологии возможны и многие другие сочетания различных состояний фермента и субстрата. Если субстрат одновременно может существовать в нескольких фазах, то чаще всего ферментативной реакции подвергается только та его часть, которая находится в растворе. Поскольку все вещества в той или иной степени растворимы в воде, то небольшое количество субстрата всегда будет находиться в растворе и, следовательно, подвергаться действию фермента так, как это показано на рис. 4.18. В то же время скорость этого процесса может быть настолько мала, что с практической точки зрения он не будет представлять особого интереса.

Теперь рассмотрим некоторые примеры другого рода. Одним из таких примеров может являться реакция гидролиза метилбутирата под действием панкреатической липазы – фермента, образующегося в пищеварительном тракте человека и способного расщеплять жиры. В отличие от предыдущего примера здесь реакция не идет до тех пор, пока в реакционной смеси не сформируется нерастворимая форма субстрата в виде небольших капель, как это показано на рис. 4.19.

Очевидно, что панкреатическая липаза способна проявлять свою активность только на границе раздела двух жидких фаз. Учитывая возможность денатурации фермента за счет поверхностного натяжения, интересно отметить, что поверхностное натяжение на жировых каплях может существенно снизиться вследствие адсорбции желчных кислот – природных поверхностно-активных веществ, выделяемых желчным пузырем в пищеварительный тракт.

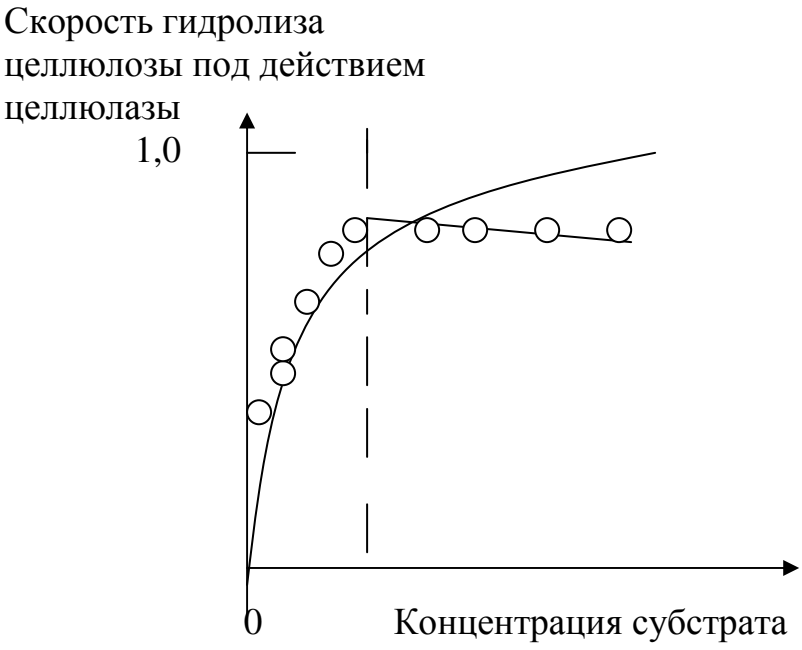


Рис. 4.18. Ферментативная реакция осуществляется только с растворенной формой субстрата

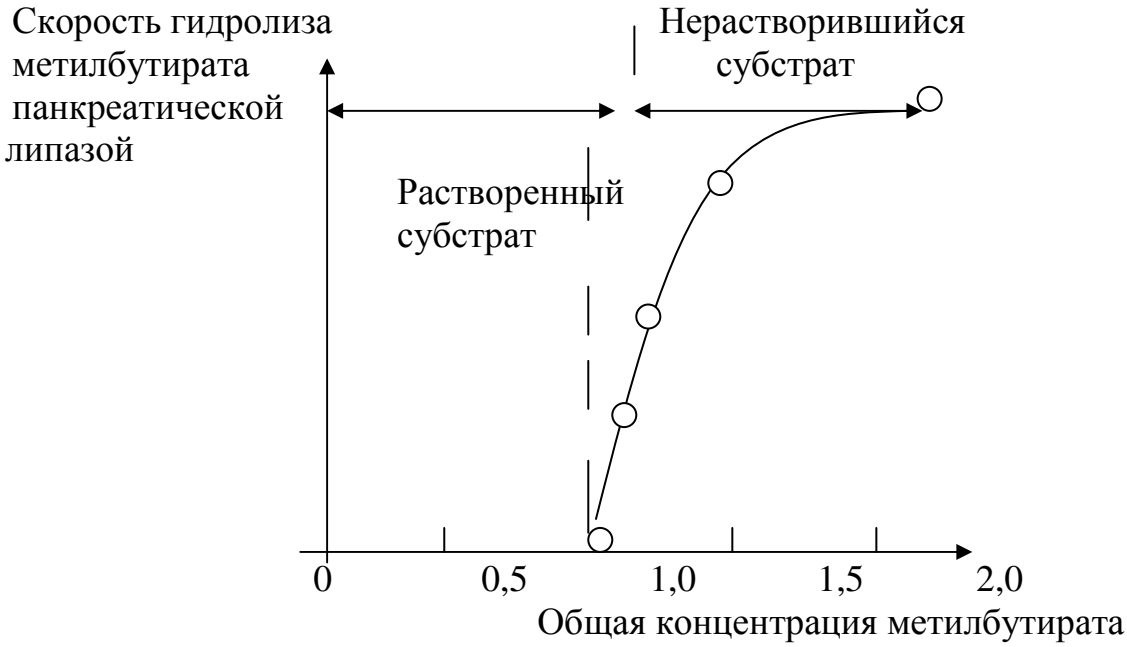


Рис. 4.19. Реакция на поверхности раздела двух жидких фаз

Другие ферменты активны как для растворимой, так и нерастворимой формы субстрата. Так, например, было показано, что протеолитический фермент трипсин способен расщеплять как свободный лизоцим, так и лизоцим, адсорбированный на поверхности каолинита. Сам лизоцим может также взаимодействовать с растворимыми и

нерастворимыми субстратами. Как уже отмечалось ранее, лизоцим активно разрушает стенки бактериальных клеток; в то же время он способен катализировать и расщепление растворимых олигомеров, образующихся из полимеров клеточной стенки.

Взаимодействие растворенного фермента с нерастворимым субстратом путем адсорбции на поверхности последнего может быть описано с помощью рассмотренных выше уравнений. Однако в отличие от предыдущих случаев, когда скорость реакции возрастала пропорционально концентрации фермента, здесь при повышении концентрации фермента скорость реакции сначала возрастает, а затем начинает приближаться к некоторой предельной величине. Такое поведение может наблюдаться при гидролизе целлюлозы целлюлолитическими ферментами, при гидролизе трудно растворимых молекул белка или его модифицированных фрагментов, например тиогеля – желатина, сшитого поперечными связями при помощи глутарового диальдегида или какими-либо другими методами, как это показано на рис. 4.20.

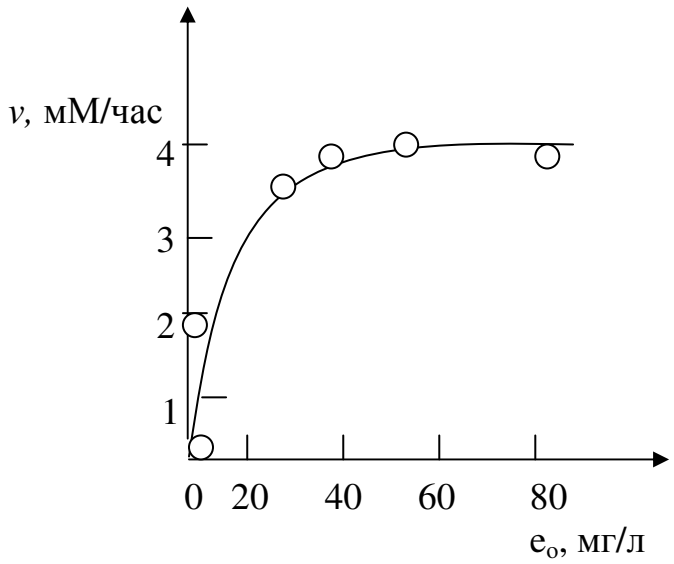


Рис. 4.20. Зависимость скорости разрушения твердого субстрата (тиогеля) от концентрации e_o фермента в растворе

Разработку модели для кинетики гетерогенной реакции начнем с допущения, обратного тому, которое было положено в основу анализа скоростей ферментативных реакций в растворе – теперь будем считать, что фермент адсорбируется на субстрате. Обозначив символом А вакантные центры на поверхности субстрата, можно написать следующее уравнение:

$$E + A \underset{k_{des}}{\overset{k_{ads}}{\rightleftharpoons}} EA.$$

Если общее число молей центров адсорбции на поверхности субстрата в расчете на единицу объема реакционной смеси принять равным a_o, то

$$a_o = a + (ea). \qquad (4.52)$$

Из уравнения (4.52) и вышеприведенной схемы равновесной адсорбции следует, что

$$(ea) = \frac{a_o e}{K_A + e}, \quad \text{где} \quad K_A = \frac{k_{des}}{k_{ads}}. \qquad (4.53)$$

Теперь остается только допустить, что реакция завершается необратимым расщеплением комплекса ЕА. Следовательно,

$$v = k_3(EA) = \frac{k_3 a_o e}{K_A + e}. \qquad (4.54)$$

По условиям модели e обозначает концентрацию свободного фермента, которая вначале эксперимента связана с общей концентрацией фермента e_o соотношением

$$e_o = e + (ea). \qquad (4.55)$$

Если начальная концентрация фермента значительно превышает начальную концентрацию субстрата ($e_o >> a_o$), то с хорошей степенью приближения можно считать, что

$$e_o \approx e. \qquad (4.56)$$

Поэтому

$$v = \frac{k_3 a_o e_o}{K_A + e_o}. \qquad (4.57)$$

Для реакций с твердыми субстратами ситуация, когда $e_o >> a_o$, достаточно типична и не является исключением. Например, подобная ситуация была получена при гидролизе синтетического твердого субстрата тиогеля в присутствии трипсина, когда соотношение e_o/a_o составляло около 4000. Этим гетерогенные реакции резко отличаются от реакций в растворах, когда s_o обычно значительно больше, чем e_o.

Из уравнения (4.57) следует, что график зависимости $1/v$ от $1/e_0$ (в двойных обратных координатах Лайнуивера – Берка) должен представлять

собой прямую линию. Как показано на рис. 4.21., так оно и есть на самом деле. На рис. 4.21 приведена прямая, которая выражает в другой форме те же данные, которые были представлены на рис. 4.20.

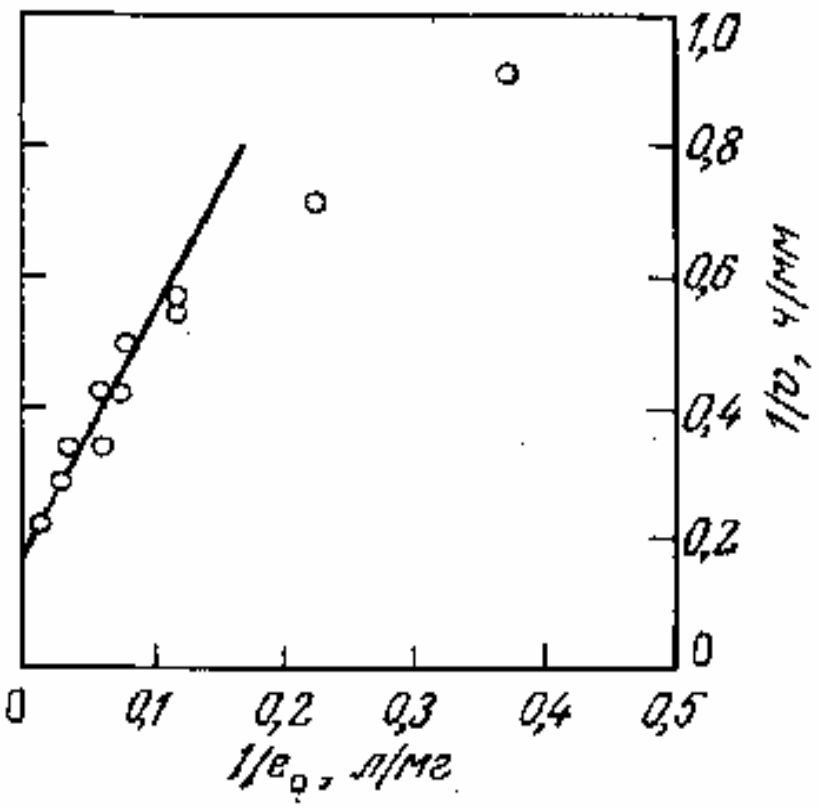


Рис. 4.21. Зависимость скорости деструкции твердого субстрата (тиогеля) ($1/v$) от концентрации трипсина ($1/e_0$) в растворе в координатах Лайнуивера-Бэрка

Многие источники питательных веществ для микроорганизмов представляют собой твёрдые частицы (в потоках сточных вод, озёрах, хранилищах компоста и т.д.) Очевидно, что адсорбции и транспорту растворённых веществ через клеточные мембраны должен предшествовать гидролиз этих частиц внеклеточными ферментами. Точно также гидролиз целлюлозы ферментами типа целлюлаз требует предварительного расщепления нерастворимых частиц.

В заключение следует подчеркнуть, что область применения рассмотренной кинетической модели не ограничивается твёрдыми субстратами; она использовалась и для описания нерастворимых жидких субстратов, диспергированных в растворе фермента, например системы, кинетическая кривая которой представлена на рис. 4.22.

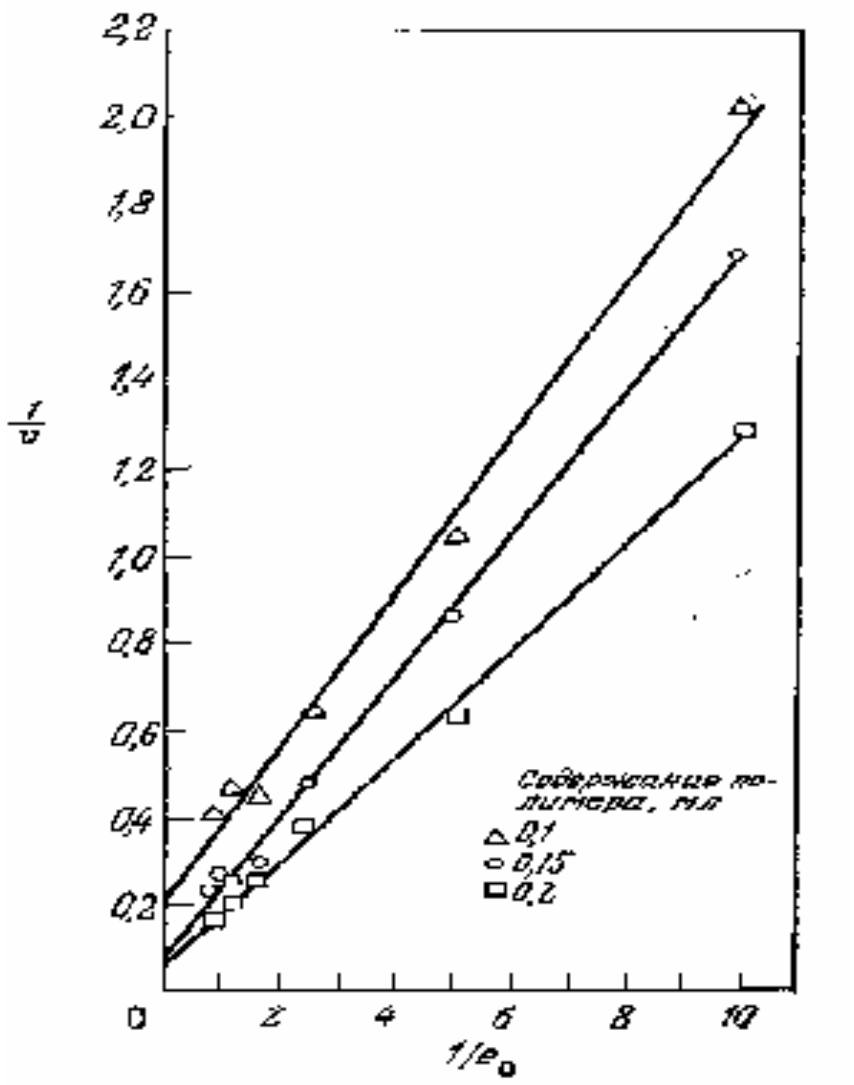


Рис. 4.22. Зависимость скорости деструкции нерастворимого субстрата (частиц поли-β-гидроксибутирата) раствором фермента (деполимеразы из *P.lemognei*) в координатах Лайнуивера-Берка

Следует отметить, что ферментативная кинетика изучалась, как правило, на наиболее чистых препаратах ферментов. Кроме того, применялось минимальное число субстратов (лучше всего один, если это возможно) и строго контролировались параметры среды в отношении содержания активаторов (Ca^{2+}, Mg^{2+} и т.п.), коэффициентов и ингибиторов. В тоже время многие из применяемых в промышленности препаратов очищены в гораздо меньшей степени. Как правило, они содержат ряд ферментов с различными каталитическими свойствами. Кроме того, в большинстве случаев эти препараты используются для таких материалов, которые даже отдалённо не напоминают чистый субстрат или синтетическую среду строго определённого состава. Следует отметить, что одновременное действие нескольких ферментов может быть более

эффективным, чем последовательная обработка рядом индивидуальных ферментов. Однако и в этих случаях к ним можно применять кинетические схемы, описываемые уравнениями (4.49 – 4.57).

Глава 5

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Ранее уже было упомянуто об одном из методов стабилизации ферментов – их фиксации на каком либо твердом носителе, получившим название *иммобилизации*, а сами фиксированные ферменты стали называть *иммобилизованными ферментами* или технологическими биокатализаторами.

Эпоха получения технологических биокатализаторов началась с середины 50-х годов прошлого века и дала направление одному из широко используемых разделов биотехнологии, получившему название *инженерной энзимологии*.

Все применяющиеся в практической работе ферменты выделяют из природных источников, так как это было описано в предыдущей главе. Однако в ряде случаев выделенный фермент имеет высокую стоимость и, следовательно, процесс получения того или иного вещества с его участием будет дорогостоящим и, поэтому, экономически невыгодным процессом. Кроме того, после завершения процесса в ряде случаев фермент трудно удалить из реакционной смеси, что особенно важно при получении пищевых или медицинских препаратов.

Таким образом, необходимость в иммобилизации возникает по целому ряду причин, основные из которых следующие.

1. Получаемый в результате иммобилизации технологический биокатализатор легко отделить от реакционной среды, что позволяет:

а) остановить реакцию в любой требуемый момент времени;

б) многократно использовать катализатор после его выделения из реакционной среды;

в) получать продукты, не загрязненные ферментами, что особенно важно в ряде пищевых и фармацевтических производств.

2. Полученный в результате иммобилизации гетерогенный продукт позволяет проводить процесс непрерывно, например, в проточных реакторах, и регулировать скорость катализируемой реакции или выход продукта скоростью подачи субстрата.

3. Иммобилизация ферментов позволяет целенаправленно изменять свойства фермента, в том числе его специфичность (в особенности по отношению к макромолекулярным субстратам), зависимость активности от pH среды и во многих случаях увеличивает его термостабильность.

4. Иммобилизованные ферменты можно локализовать в соответствии с последовательностью осуществляемых ими каталитических превращений, что будет способствовать повышению эффективности многостадийного процесса.

Таким образом, основной задачей инженерной энзимологии является создание технологических биокатализаторов с заданными свойствами на основе ферментов, полиферментных комплексов и клеток микроорганизмов. К таким свойствам относятся:

а) срок службы катализатора при определенных условиях реакции (температуре, pH среды и т.д.);

б) специфичность действия;

в) производительность (каталитическая активность);

г) токсичность (не должны привносить в получаемые в результате ферментной обработки лекарства и пищевые ингредиенты и другие продукты «для человека» токсичные компоненты);

д) геометрическая форма катализатора и его механические свойства (прочность, истираемость, фильтруемость, доступность и устойчивость при перемещении в транспортных технологических системах, например реакторах, трубопроводах и т.д.).

5.1. Методы иммобилизации

Существует много способов иммобилизации ферментов. Часто от выбранного метода во многом зависят и свойства будущего технологического биокатализатора. Все методы иммобилизации можно разделить на три основные группы.

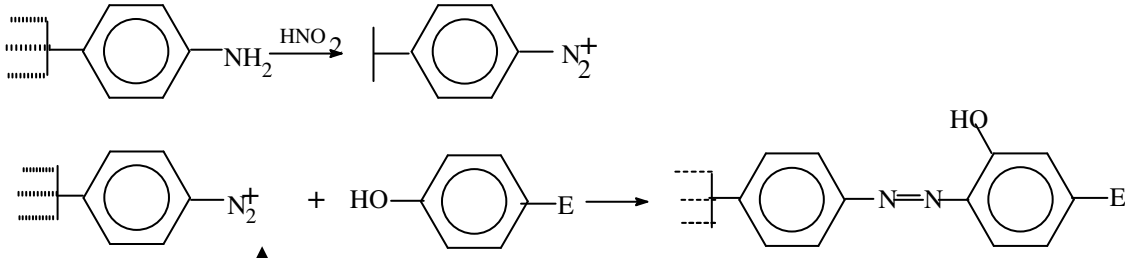
1. *Физические*, основанные на создании слабых взаимодействий между ферментами и носителями или основанные на включении фермента или ферментного комплекса в какую-либо оболочку или матрицу.

2. *Химические*, основанные на создании ковалентной связи между реакционными группами фермента и носителя.

3. *Смешанные,* основанные на предварительной обработке фермента каким-либо химическим реагентом, после чего он включается в матрицу или на модификации фермента химическим реагентом одновременно или после его включения в матрицу или носитель. Чаще всего в качестве такого носителя используется глутаровый диальдегид.

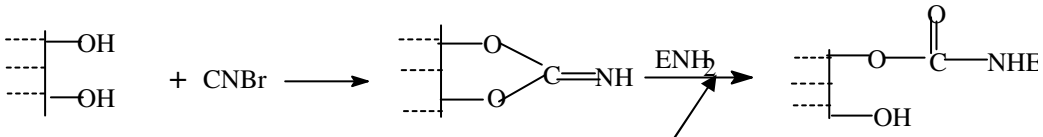
Свойства иммобилизованного фермента, как уже отмечалось ранее, будут определяться как свойствами самого фермента, так и характеристиками носителя или матрицы для иммобилизации.

5.1.1. Диазометод



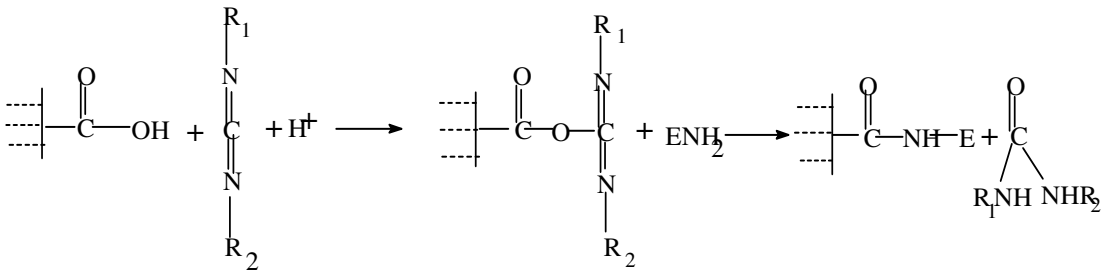
Также группы NH_2 и имидазольное кольцо гистидина

5.1.2. Активация бромцианом



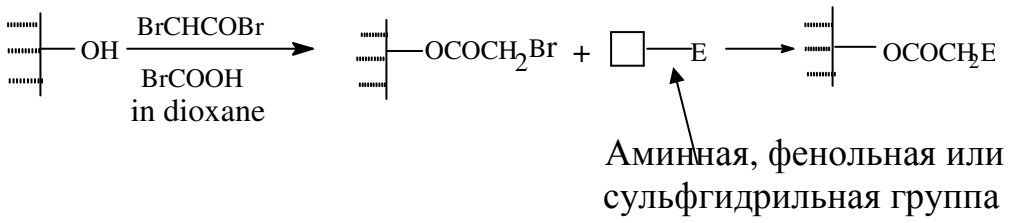
NH_2 – концевая аминогруппа
ε – аминогруппа лизина
Реакция идет в водной среде
с выделением аммиака

5.1.3. Карбодиимидный метод



Можно также осуществлять конденсацию группы NH_2 на носителе с группой COOH на ферменте

5.1.4. Метод алкилирования



5.1.5. Метод иммобилизации с глутаровым диальдегидом

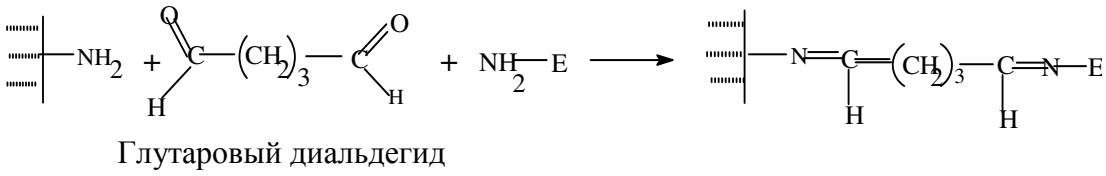


Рис 5.1. Некоторые методы ковалентного связывания ферментов с носителями (Е – фермент)

Выбор носителя для иммобилизации фермента зависит прежде всего от свойств поверхности носителя. Способен ли фермент адсорбироваться на этой поверхности? Есть ли у носителя функциональные группы, связывающие фермент? Если поверхность носителя не удовлетворительна в этом отношении, то можно ли химически модифицировать или иным образом трансформировать поверхность носителя, чтобы облегчить связывание фермента.

Один из наиболее простых физических методов иммобилизации – это адсорбция фермента на твердых носителях. Другим практически таким же простым методом иммобилизации является фиксация фермента на носителе за счет образования ионных связей. Целесообразность применения этих методов иммобилизации обусловлена еще и тем обстоятельством, что в ряде случаев катализатор удается сравнительно просто регенерировать путем десорбции отработанного фермента и адсорбцией новой порции активного биокатализатора. В качестве адсорбентов могут быть использованы: активированный уголь, SiO_2, Al_2O_3, глина, стеклянные бусинки и т.д. (см. табл. 5.1).

В табл. 5.1 перечислены некоторые носители, используемые для иммобилизации ферментов путем создания ковалентных связей, и приведены функциональные группы, участвующие в этих связях. В качестве носителей могут использоваться и стеклянные бусинки, глиноземы и оксиды металлов после их предварительной обработки какими – либо химическими реагентами для возникновения на их поверхностях определенных функциональных групп. Часто в качестве такого химического модификатора используются производные кремния,

например, γ-аминопропилтриэтоксисилан: $(CH_3CH_2O)_3Si(CH_2)_3R$, где R – чаще всего аминогруппа, как в вышеуказанном соединении.

Носитель, подвергнутый силанизации, содержит на поверхности аминогруппы, которые (как и аминогруппы других носителей) можно перевести в альдегидные группы конденсацией с глутаровым диальдегидом или в ариламинные группы с помощью *п*-нитробензоилхлорида, или в карбоксильные группы конденсацией с янтарным ангидридом. Другой способ модификации поверхности носителей основан на введении гибких, сравнительно длинных цепей (например, остатка *н*-пропиламида).

Таблица 5.1

Носители, применяемые для иммобилизации ферментов методом адсорбции и типы взаимодействия между ферментом и носителем

Взаимодействие	Адсорбенты
Физическая адсорбция	Активированный уголь, силикагель, оксид алюминия, крахмал, глина, стекло Модифицированные носители: таннинаминогексилцеллюлоза, конкавалин А-сефароза
Ионное связывание	Катионообменники: карбоксиметилцеллюлоза, амберлиты различных марок, полистирольные сульфокатиониты и др. Анионообменники: диэтиламинотилцеллюлоза, диэтиламиноэтилсефадекс, полиаминостирол. Амберлиты различных марок

.

С помощью подобных модификаций можно также изменять гидрофобность или гидрофильность поверхности носителя. В качестве примера на вышеприведенном рис. 5.1 дана схема иммобилизации фермента на активированную окись алюминия при помощи глутарового диальдегида. Для более прочной фиксации полученное основание Шиффа можно восстановить боргидридом натрия ($NaBH_4$).

Таблица 5.2

Нерастворимые носители, применяющиеся для ковалентного связывания ферментов (указаны участвующие в связывании функциональные группы, расположенные на поверхности носителей)

Носители природного происхождения	Синтетические носители
Целлюлоза (–OH) Карбоксиметилцеллюлоза (–COOH) Агароза (сефароза) (–OH) Декстран (сефадекс) (–OH)	Полиакриламиды и их производные (биогель, энзакрил и др.) (ароматические аминогруппы) Полиаминостирол ($–NH_2$) Сополимеры малеинового ангидрида

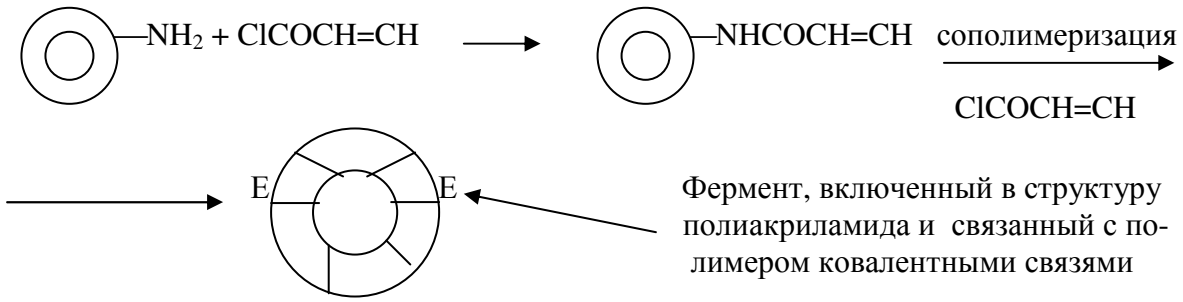
На том же рис. 5.1 суммированы типичные реакции иммобилизации ферментов с участием функциональных групп на поверхности носителей, в том числе перечисленных в табл. 5.2. Следует отметить, что каждая из указанных реакций протекает только в строго определенных условиях, в частности при заданных величинах pH, ионной силы и концентрации реагентов. Химическая природа функциональных групп на поверхности носителя определяет и функциональные группировки белка, с участием которых он образует ковалентные связи. Благодаря наличию достаточно большого числа методов поверхностной модификации носителей иммобилизацию какого-либо определенного фермента на конкретном носителе обычно можно осуществить несколькими способами. Однако конденсация фермента с носителем, очевидно, не должна затрагивать аминокислотные остатки, входящие в активный центр фермента или расположенные вблизи от него.

Решая вопрос о выборе носителя и способе модификации его свойств, нельзя забывать и о взаимодействиях между поверхностью носителя и реакционной смесью, благодаря которым непосредственно примыкающие к носителю, а следовательно, и к ферменту слои реакционной смеси могут существенно отличаться по своим свойствам от основного объема реакционной смеси. Например, вокруг частиц носителя с ионизированными группами образуется зона с повышенной концентрацией противоположно заряженных ионов, что в свою очередь приводит к существенному изменению зависимости наблюдаемой каталитической активности от pH жидкой фазы в сравнении с аналогичной зависимостью для ферментативной реакции в растворе. Аналогично гидрофобные или гидрофильные свойства носителя будут влиять на локальные концентрации растворенных веществ и растворителей в соответствии с их гидрофобностью (или гидрофильностью).

Другая важная функция поверхности носителя связана с её прямым или косвенным влиянием на молекулярное окружение фермента. В какой-то степени фермент всегда взаимодействует с поверхностью носителя на молекулярном уровне и в то же время контактирует с реакционной средой, на которую так же, как только что было показано, влияет носитель.

Молекула фермента построена таким образом, что она принимает определенную конформацию и проявляет соответствующую активность только в свойственной ей природной среде. Очевидно, что путем подбора носителя для иммобилизации фермента можно попытаться, как сохранить свойственное данному ферменту окружение, так и направленно изменить его с тем, чтобы повлиять на активность, а также на селективность и стабильность фермента. В настоящее время уделяется большое внимание изучению взаимодействия ферментов с их окружением на молекулярном уровне и выяснению возможности использования таких взаимодействий для углубления наших знаний о поведении ферментов в природных условиях и для оптимизации соответствующих биокаталитических процессов.

Теперь остановимся на третьем, так называемом *смешанном методе* иммобилизации, который в настоящее время приобретает всё большее значение для практических целей. Этот метод можно осуществлять по-разному: в начале молекулу фермента модифицируют каким-либо соединением с двойными связями, способным к полимеризации, например акрилоилхлоридом, после чего ацилированный фермент вносят в раствор мономера и проводят сополимеризацию. В результате такой операции фермент оказывается «вшитым» в полимерную сетку геля, с которой он одновременно связан и ковалентной связью, так как это приведено на схеме:



Этот метод можно осуществить и несколько иным способом: вначале включить фермент в полимерную сетку геля, а затем «подшить» его к полимеру при помощи бифункционального реагента, например с помощью того же глутарового диальдегида.

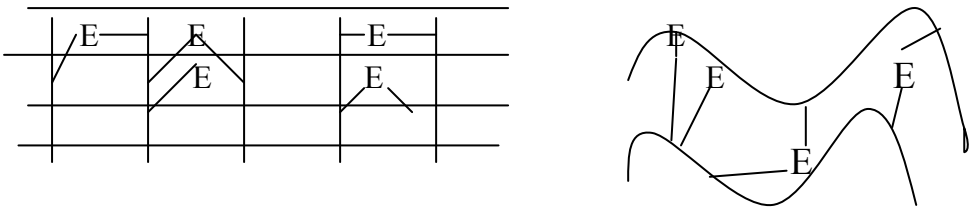


Рис. 5.2. Схема смешанной иммобилизации фермента в трехмерную решетку или полые волокна. Черточки – ковалентные связи

На активность и другие параметры иммобилизованного фермента оказывают сильное влияние также физические и механические свойства носителя. Пористость носителя и распределение пор по размерам определяют количество фермента, который может быть иммобилизован на этом носителе, и доступность субстрата для молекул фермента, связанных с внутренними поверхностями. Механическая прочность носителя в существенной степени влияет на возможность его использования в реакторах определенной конструкции. Например, в реакторе с перемешиваемой взвесью твердого катализатора нецелесообразно использовать носители, склонные к механическому истиранию, а легко сжимаемые материалы нельзя применять в насадочных колоннах крупномасштабного производства. Кроме того, необходимо ещё и учитывать способность носителя к набуханию.

Метод иммобилизации фермента путем его включения в различные гели или полые волокна выгодно отличается от других методов относительной независимостью от природы фермента, т.е. использование практически одной и той же методики для иммобилизации различных ферментов, а также сравнительно небольшими нарушениями нативной структуры фермента. Причем в случае необходимости, как уже отмечалось ранее, фермент может быть ковалентно фиксирован в матрице при помощи бифункциональных реагентов. Кроме глутарового диальдегида для этой цели могут быть также использованы бис-диазобензидин, цианурхлорид и гексаметилендиизоцианат.

Методы включения можно разделить на две группы: к первой группе относятся методы, основанные на включении фермента в полимерную матрицу, а ко второй – методы, в которых раствор фермента отделяют мембраной, проницаемой для субстратов и (или) продуктов, но непроницаемой для фермента.

Чаще всего фермент иммобилизуют в трехмерной полимерной решетке полиакриламидного геля путем полимеризации акриламида в присутствии сшивающих мономеров и фермента.

Инициатором полимеризации может быть персульфат калия ($K_2S_2O_8$), а её ускорителями: β-диметиламинопропионитрил (DMAPN), тетраэтилметилэтилендиамин (TEMED), раствор NaOH или другие

соединения. Сообщалось, что с помощью этих реагентов можно получать гели иммобилизованных ферментов с диаметром пор от 100 до 400 нм, которые надежно удерживают многие ферменты, имеющие обычно диаметр молекул от 300 до 2000 нм.

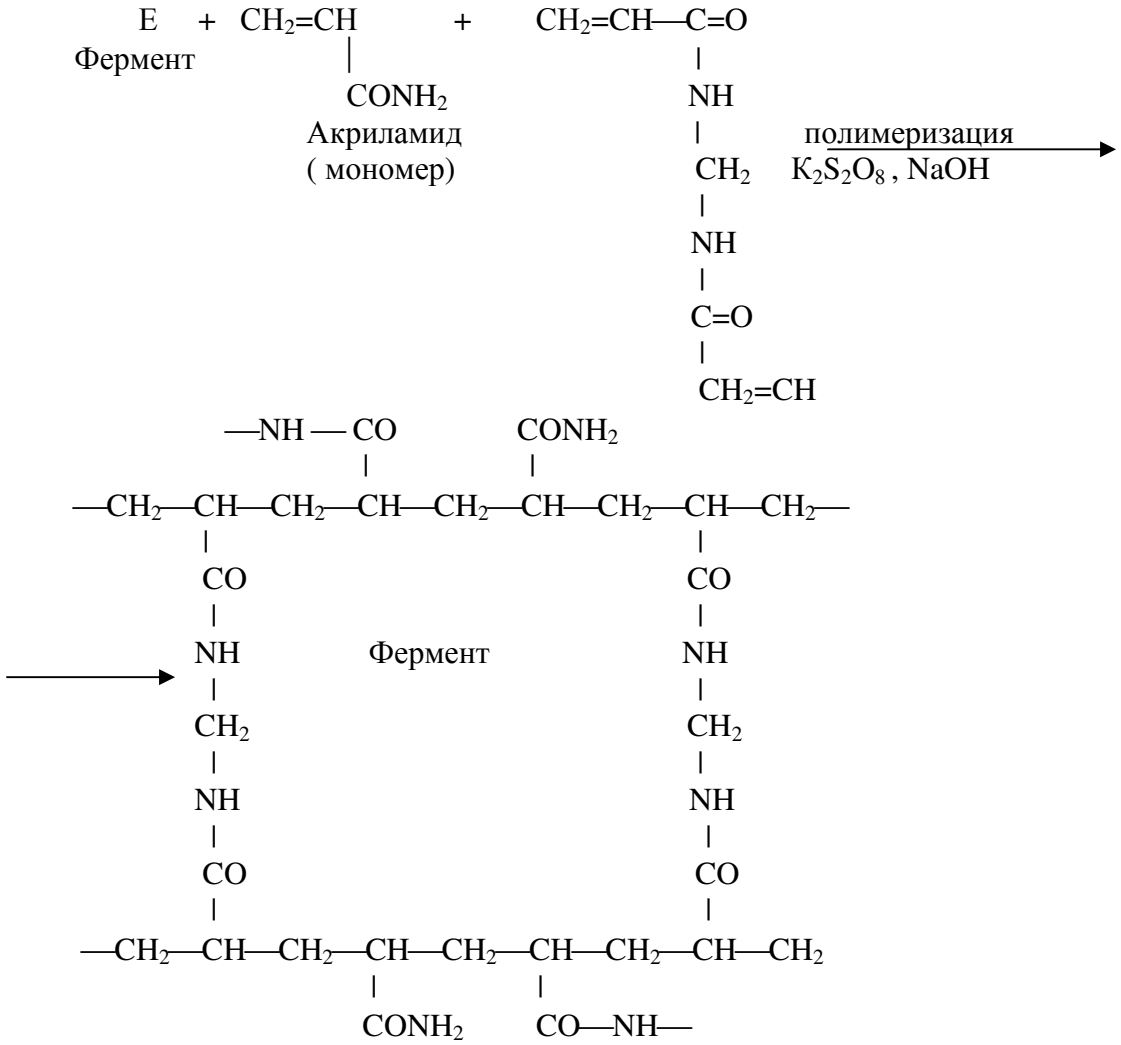


Рис. 5.3. Метод иммобилизации фермента путем его включения в полиакриламид

В альтернативном способе иммобилизации раствор фермента отделяют мембраной таким образом, чтобы фермент постоянно находился в объеме, ограниченном этой полупроницаемой мембраной. Биологическим прототипом этого метода иммобилизации являются липосомы клеток, в которых сконцентрированы гидролитические ферменты, вызывающие при попадании в цитоплазму мгновенную гибель клеток. В одном из вариантов этого способа, называемого *микрокапсулированием*, ферменты заключают в крохотные капсулы диаметром до 300 нм. Капсулы включены в сферические мембраны с порами, через которые в любом направлении могут транспортироваться

небольшие молекулы субстратов и продуктов реакции и в то же время не могут проникать ферменты и другие высокомолекулярные соединения.

Остановимся подробнее на этом методе. Итак, как уже только что упоминалось, различные ферменты и кофакторы можно заключать в капсулы без потери их активности по отношению к субстратам, диффундирующим внутрь капсулы. Чтобы предохранить фермент от инактивации, перед микрокапсулированием его обычно смешивают с водорастворимыми полимерами. Например, такими соединениями, как полиэтиленимин (ПЭИ), бычий сывороточный альбумин (БСА), гемоглобин, поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (ПВС). Для сохранения активности существенным фактором является концентрация полимера. Которая обычно составляет ~1%.

Для получения устойчивых микрокапсул к реакционной смеси ещё обычно добавляют эмульгаторы – неионогенные поверхностно-активные вещества, например такие, как «тритон», «Спан – 85» и др. Концентрация эмульгатора обычно не должна превышать 0,1%. При микрокапсулировании в капсулу попадает не только фермент, но и раствор, в котором он находится. В результате при интенсивном перемешивании раствора образуются мельчайшие капсулы внутри которых находится фермент и через пористую стенку которых могут свободно проникать и субстрат и продукты реакции.

Одним из преимуществ микрокапсулирования перед другими методами иммобилизации является большая площадь поверхности, приходящаяся на единицу активности иммобилизованного фермента, что позволяет использовать высокие концентрации фермента в исходном растворе и достигать высокую эффективность действия иммобилизованного фермента. Поскольку присутствие в растворе фермента не влияет на процесс образования мембран, можно микрокапсулировать различные ферменты, клетки или биомолекулы, что позволяет осуществлять в одном реакционном сосуде многостадийные реакции. Диаметр микросфер может быть от нескольких микрон (мкм) до нескольких тысяч микрон, а толщина мембраны от сотен ангстрем до нескольких микрон. Возможно также заключать маленькие микрокапсулы, содержащие фермент, в более крупные, выполненные, например, из бутадиенового каучука, так как это показано на рис. 5.4 .

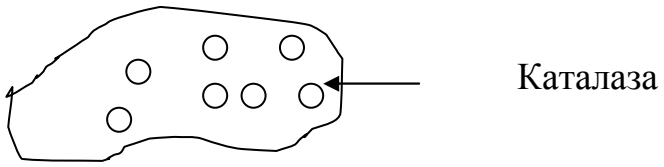


Рис 5.4. Микрокапсулы с каталазой, включенной в структуру из бутадиенового каучука

В результате микрокапсулирования константа Михаэлиса K_M обычно увеличивается. Например, для уреазы K_M изменяется от 3 мМ для свободного фермента до 8 мМ для микрокапсулированного. После хранения в течение 16 суток эта величина возрастает вообще до 0,14 М. В общем случае увеличение K_M обычно означает увеличение сопротивления массопереносу внутрь капсулы, обусловленное либо проницаемостью через мембрану, либо через пограничные слоя капсулы.

Физические и химические свойства микрокапсулированных ферментов обычно зависят от природы полимера, из которого формируется микрокапсула. Полимер должен обладать когезионными свойствами, обеспечивающими образование непрерывной пленки, быть проницаемым для субстрата и инертным по отношению к реакционной среде. Вещества для микрокапсулирования выбирают из природных и синтетических полимеров. Чаще других используют карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ), капрон, нитрат целлюлозы, желатин, силиконовый каучук, эпоксидные смолы, полиуретаны, гуммиарабик, стирол, полиамины, полиэфиры.

Для включения фермента в капсулы чаще всего используют два метода: коацервацию и межфазную полимеризацию или поликонденсацию.

Коацервацией называется явление возникновения в растворе высокомолекулярного соединения капель (в нашем случае капсул), обогащенных растворимым веществом, в данном случае ферментом. При коацервации происходит фазовое разделение коллоидных частиц полимера, которые образуют ассоциаты вокруг маленьких капель воды и затем образуют непрерывную мембрану при их коалесценции (сшивании) так, как это показано на рис. 5.5.

Так как при коацервации не происходит химических реакций, её можно широко применять для инкапсулирования многих биохимических препаратов и получения очень тонких мембран. Типичными полимерами для коацервации являются нитрат целлюлозы, ацетат целлюлозы, гуммиарабик, бутадиеновый каучук.

Полученные в результате коацервации микрокапсулы отделяют от раствора седиментацией или центрифугированием. После их промывания буферным раствором, содержащим ПАВ, чаще всего «твин», они могут многократно использоваться, причем не только в водной, но и в органической среде. Избыток органического растворителя, необходимый для эффективной коацервации (чаще всего циклогексан), чаще всего удаляют выпариванием реакционной смеси под вакуумом.

В соответствии с другим методом: *межфазной полимеризации* или *конденсации*, один из реагентов вместе с ферментом находится в водной фазе, а другой – в органической, как правило, несмешивающейся с водой. На границе раздела фаз происходит реакция полимеризации или

поликонденсации и вокруг водных капель, деспергированных в органическом растворителе, образуется слой полимера. В результате фермент вместе с водной фазой оказывается включенным в капсулу, практически так, как это было показано на рис. 5.5.

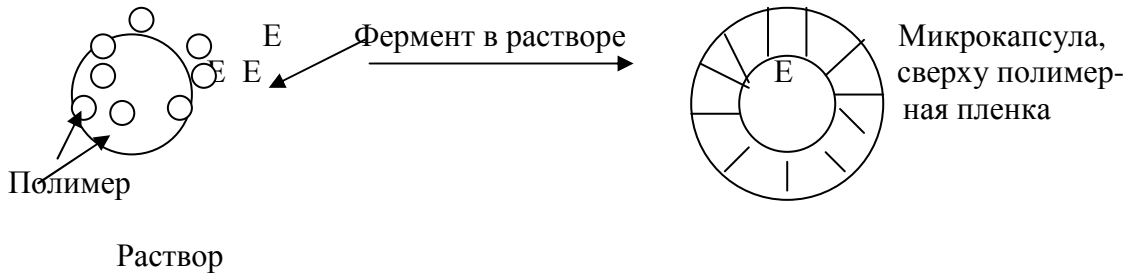


Рис. 5.5. Пример коацервации фермента в растворе

Типичным примером межфазной полимеризации является включение фермента в капсулы, образующиеся при полимеризации капролактама.

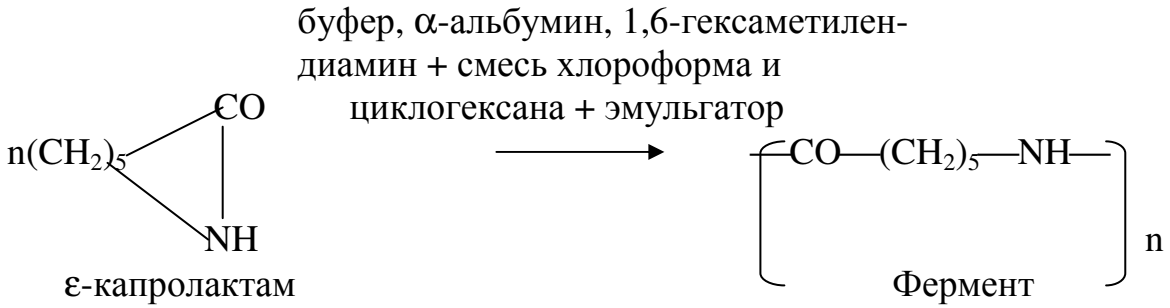


Рис. 5.6. Микрокапсулирование межфазной полимеризацией

После образования устойчивой эмульсии к реакционной смеси добавляют при интенсивном перемешивании себацилхлорид [ClCO—$(CH_2)_8$—COCl] в смеси с хлороформом и циклогексаном. Перемешивание продолжают в течение нескольких минут, образовавшиеся микрокапсулы отделяют центрифугированием и промывают водным раствором, содержащим «твин-20». Подобным образом можно также получать капсулы и пленки из эпоксидных смол, полиуретана, полиэфира и других синтетических полимеров.

Неустойчивые микрокапсулы в случае необходимости можно получить простым эмульгированием водного раствора фермента в присутствии ПАВ, при этом образуются капсулы, заключенные в

мембрану из поверхностно-активного вещества, которые затем можно добавлять к водному раствору субстрата.

Следует ещё раз напомнить о том, что все методы микрокапсулирования отличаются высокой удельной поверхностью катализатора (характерная величина составляет 2500 см^2 на 1 мл суспензии фермента) и, кроме того, обладают возможностью повышения специфичности, так как иногда удаётся изготовить мембраны, селективно пропускающие одни субстраты и задерживающие другие.

Еще одним эффективным методом фиксации фермента является метод ультрафильтрации через полупроницаемые мембраны. На рис. 5.7 изображена схема непрерывной ультрафильтрации, где, как и в случае микрокапсулирования, фермент удерживается в определенном объёме. В то же время в отличие от метода микрокапсулирования в этом случае площадь поверхности, разделяющей два раствора, несколько меньше, и к тому же в данном случае возникает опасность определенной денатурации фермента, индуцированного потоком раствора.

К преимуществам метода иммобилизации ферментов с помощью полупроницаемых мембран можно отнести возможность применения практически любого фермента и смесей любых ферментов, а также высокомолекулярных или нерастворимых субстратов, например целлюлозы (по отношению к которым связанные с полимерными носителями ферменты обычно малоэффективны). Кроме того, в реакции гидролиза полимеров через полупроницаемые мембраны проникают только низкомолекулярные соединения, а все вещества с относительно большой молекулярной массой остаются в растворе. На этом принципе основан интересный метод регулирования молекулярно-массового распределения на выходе из реактора.

Изучен целый ряд вариантов принципиальной схемы, изображенной на рис. 5.6 и 5.7. Так, вместо реактора с перемешиванием можно использовать трубчатый реактор. Блок с одной полупроницаемой мембраной можно заменить на устройство с множеством параллельных пустотелых нитей или волокон, в котором один поток направляется во внутреннюю полость нитей, а другой – в омывающий нити объем. В случае необходимости можно также «подшить» фермент на полупроницаемую мембрану любым из вышеприведенных методов; в этом случае мы будем иметь вышеописанный случай *смешанной иммобилизации*.

Важнейшие характеристики различных методов иммобилизации суммированы в табл. 5.3.

Здесь под «ферментативной активностью» понимается собственная каталитическая активность иммобилизованных ферментов по отношению к активности тех же ферментов в растворе. В общем случае методы химической иммобилизации снижают активность ферментов, поскольку создающиеся в процессе иммобилизации ковалентные связи могут в какой-

то мере нарушить третичную структуру, свойственную нативным белкам. С другой стороны, ковалентные связи обеспечивают надежное, прочное связывание фермента, а иногда снижают скорость его инактивации и изменяют специфичность в нужном направлении. Иммобилизация ферментов путем их включения или адсорбции обычно в меньшей степени сопровождается нарушением их структуры, и поэтому свойства иммобилизованных такими методами ферментов мало отличаются от их свойств в растворах. В то же время нельзя забывать, что всё выше сказанное относится только к собственным свойствам ферментов, а на практике в силу эффектов массопередачи соответствующие параметры иммобилизованного фермента могут иметь совершенно другие значения.

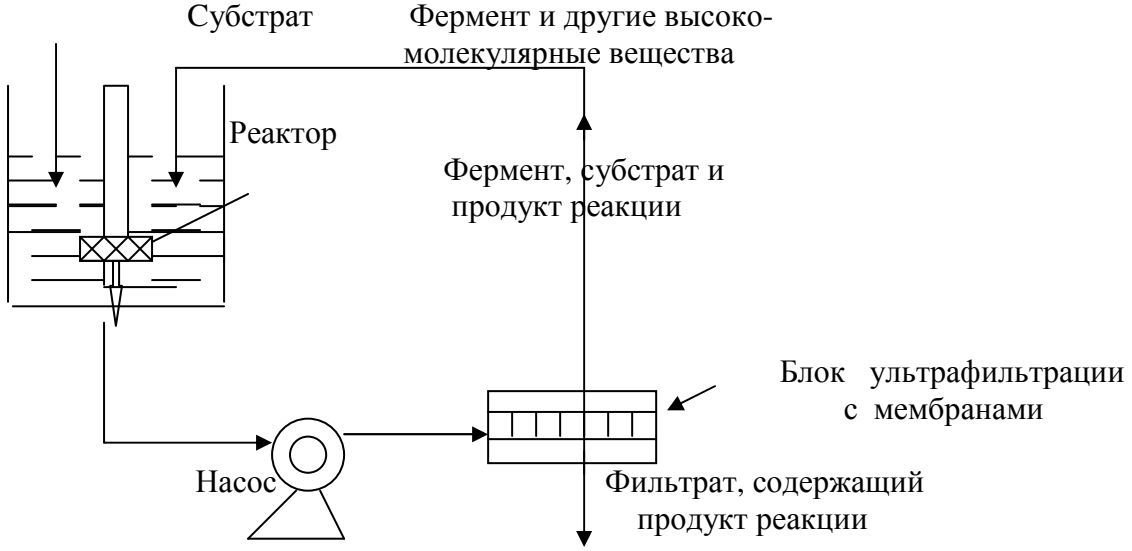


Рис 5.7. Локализация фермента в масштабе всего реактора. Полупроницаемая мембрана удерживает фермент и другие высокомолекулярные соединения в реакторе

Диффузионные эффекты обычно сильнее проявляются в случае сшитых поперечными связями ферментных катализаторов и в меньшей степени – у ферментов, иммобилизованных на носителях.

Кинетические особенности катализа иммобилизованными ферментами. В данном разделе мы не будем подробно останавливаться на кинетических особенностях катализа иммобилизованными ферментами, так как на практике обычно пользуются уже приведенными кинетическими уравнениями для нативных ферментных препаратов. Однако при проектировании технологического процесса с участием технологических биокатализаторов необходимо учитывать влияние носителя на свойства полученного иммобилизованного фермента:

1. Внешние и внутренние диффузионные затруднения при прохождении субстрата к активному центру фермента.

2. Стерические препятствия, особенно в реакциях фермента с макромолекулами.
3. Распределение субстратов, ингибиторов и активаторов между водным раствором и матрицей.

Таблица 5.3

Сравнение основных характеристик различных методов иммобилизации ферментов

Характеристики	Метод связывания с носителем				
	Физический	Ионное связывание	Ковалентное включение	Сшивка бифункциональными реагентами	Включение в гель
Методика иммобилизации	Простая	Простая	Сложная	Сложная	Сложная
Ферментативная активность	Низкая	Высокая	Высокая	Умеренная	Высокая
Субстратная специфичность	Не изменяется	Не изменяется	Может изменяться	Может изменяться	Не изменяется
Связывающие силы	Слабые	Умеренные	Сильные	Сильные	Сильные
Регенерация	Возможна	Возможна	Невозможна	Невозможна	Невозможна
Область применения	Узкая	Умеренная	Умеренная	Узкая	Широкая
Стоимость процесса	Низкая	Низкая	Высокая	Умеренная	Низкая

Некоторые из этих эффектов нежелательны и с ними приходится бороться, подбирая другой носитель или условия иммобилизации. В ряде случаев выбор носителя позволяет изменить pH-оптимум фермента, например, иммобилизация ферментов на катионите смещает pH-оптимум

некоторых ферментов в сторону более кислых значений pH, а иммобилизация на анионите – в сторону более щелочных значений.

Иммобилизованные клетки микроорганизмов. Иммобилизация клеток микроорганизмов, содержащих не только ферменты, но и кофакторы, и не один, а целый комплекс ферментов или их продуцентов, а также продуцентов различных биологически активных веществ, представляется в настоящее время особо интересной задачей. В этом случае ферментный препарат не требует своего выделения и очистки, что существенно удешевляет процессы инженерной энзимологии. Кроме того, в результате включения всей клетки в какую-либо матрицу создаётся эффект двойной иммобилизации. Фермент или продуцент биологически активных веществ, заключенный в живую или неживую клетку, подвергается иммобилизации методом включения в структуру полимерного геля, чаще всего природного происхождения или в гель, полученный в результате полимеризации акриламида так, как это описано для нативных ферментов. В качестве носителей природного происхождения чаще всего используют полисахариды, выделенные из морских водорослей – каррагенан или альгиновую кислоту. Структурирование полимерного геля вместе с включенной в него клеткой обычно осуществляется добавлением к этим гелям либо солей натрия (каррагенан), либо солей кальция (альгиновая кислота). В результате создаются мостики между карбоксильными или оксигруппами этих полимеров, происходит «сшивка» их молекул между собой и одновременное включение микробной или иной клетки в структуру полученного геля. Если клетка живая, то она содержит в себе все элементы клеточного строения и способна не только осуществлять многочисленные химические реакции, но и размножаться. Получение таких технологических биокатализаторов создает совершенно новую генерацию технических биокатализаторов, позволяющих осуществлять многие трудоёмкие процессы получения сложных веществ, например синтез аминокислот, трансформацию стероидов, получение антибиотиков.

Эти процессы могут быть не только периодическими, но и непрерывными, что особенно важно не только для земной, но и космической биотехнологии. В настоящее время удалось успешно создать такие технологические биокатализаторы, которые способны продуцировать бензилпенициллин, некоторые аминокислоты, например, аспарагиновую кислоту из аланина, и ряд других технологических процессов получения биологически активных веществ. Клетки, как было показано исследователями, могут жить в иммобилизованном состоянии на подходящей питательной среде достаточно долгое время (иногда до года), но требуют строгих правил асептики и особо мягких условий иммобилизации. Чаще всего для этих целей готовят суспензию живых клеток с полисахаридной матрицей; эту суспензию в стерильных условиях

вносят по каплям в раствор хлорида калия в случае альгиновой кислоты или хлорида натрия в случае каррагенана, в результате чего образуются мелкие гранулы, внутри которых заключены клетки – продуценты биологически активных веществ. При таком способе иммобилизации полученные гели имеют достаточно высокую пористость, что позволяет снабжать клетки всеми необходимыми питательными веществами и тем самым обеспечивать их рост, развитие и получение как первичных, так и вторичных метаболитов. Подобные иммобилизованные клетки, а также некоторые простейшие широко используются для очистки сточных вод, о чем будет сказано несколько позже.

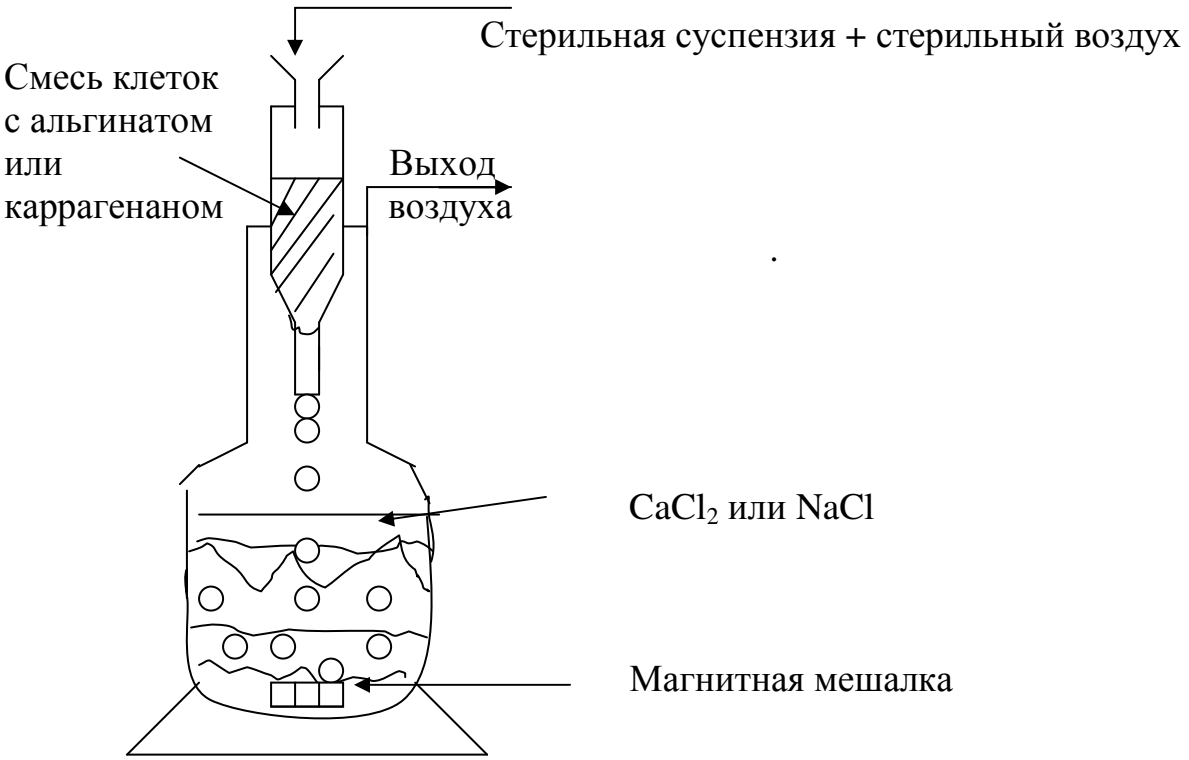


Рис. 5.8. Получение живых иммобилизованных клеток

Глава 6

ПРОМЫШЛЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАТИВНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК

Катализаторы на основе водорастворимых (нативных) и иммобилизованных ферментов используются в той или иной степени в ряде крупномасштабных производств уже более 40 лет. В отличие от синтетических катализаторов, широко использующихся в химической промышленности, ферменты, как уже отмечалось ранее, отличаются

исключительно высокой субстратной специфичностью. В результате этого свойства появляется возможность осуществлять необходимые химические модификации у индивидуальных химических веществ, например, ввести метильные группы в определенные положения структуры стероидов, или осуществить гидролиз амидной связи у такой лабильной молекулы, как молекула бензилпенициллина, не затрагивая остальных составных частей или реакционных групп у молекул, подвергнутых энзиматической трансформации.

В большинстве современных биотехнологических процессов используют, главным образом, ферменты микроорганизмов, хотя в отдельных случаях, например, в медицине или сыроделии, могут быть использованы и ферменты животного происхождения. Причем продуцентами микробных ферментов могут быть отдельные штаммы микроорганизмов, выращенные не только на специально приготовленных дорогостоящих средах, но и на отходах пищевой, целлюлозно-бумажной и деревообрабатывающей промышленности.

Как уже отмечалось ранее, ферменты, продуцируемые микроорганизмами, могут быть внутри- или внеклеточными биополимерами. Обычно в силу экономических причин, связанных с трудностями выделения и очистки, стараются использовать внеклеточные ферментные препараты. Чаще всего в качестве продуцентов ферментов используют мезофильные культуры, растущие при 25 – 40°C, а также, если это удается, термофильные продуценты, температурный оптимум которых может быть свыше 60°C. Использование ферментов, продуцируемых последними, позволяет проводить технологические процессы при температурах свыше 50^{0}C, что часто бывает необходимым для защиты реакционной смеси от посторонней микрофлоры или так называемой *контаминации*, а также увеличение скоростей реакций биохимической трансформации тех субстратов, растворимость которых увеличивается при увеличении температуры. В случае, если возникает необходимость вести процесс при экстремальных значениях pH, могут быть использованы *ацидофильные ферменты* с pH оптимумом 2,0 – 4,0 (например, пепсин) или *алкофильные*, pH оптимум которых лежит в интервале 9,0 – 10,5 (некоторые щелочные протеазы).

6.1. Применение гидролитических ферментов

Катализируемые гидролитическими ферментами реакции лежат в основе не только таких макропроцессов, как порча пищевых продуктов, «ожижение» крахмала или обработка сточных вод, но и в химии процессов дозревания неспелых плодов, автолизе различных животных и микробных тканей, созревании мяса, производстве сыра, предотвращении образования осадка в пиве и многих других явлений пищевой биотехнологии.

Таблица 6.1

Гидролитические ферменты

Фермент	Субстрат	Продукты гидролиза
Эстеразы:		
липазы	Глицериды (жиры)	Глицерин и жирные кислоты
Фосфатазы:		
лецитиназы	Лецитин	Холин, H_3PO_4 и жирные кислоты
пектинэстераза	Метиловый эфир пектина	Метанол и полигалактуроновая кислота
Карбогидразы:		
фруктозидазы	Сахароза	Фруктоза и глюкоза
α-глюкозидазы (мальтаза)	Мальтоза	Глюкоза
β-глюкозидазы (целлобиаза)	Целлобиоза	Глюкоза
β-галактозидазы (лактаза)	Лактоза	Глюкоза и галактоза
амилазы	Крахмал	Мальтоза, глюкоза или мальтоолигосахариды
целлюлаза	Целлюлоза	Целлобиоза
цитаза		Простые сахара
полигалактуроназа	Полигалактуроновая кислота	Галактуроновая кислота
Ферменты, гидролизующие азотсодержащие соединения:		
протеиназы	Белки	Полипептиды
полипептидазы	Белки	Аминокислоты
Дезаминазы:		
уреаза	Мочевина	CO_2 и NH_3
аспарагиназа	Аспарагин	Аспарагиновая кислота и NH_3
Деаминазы:	Аминокислоты	Карбоновые кислоты и NH_3
аминоацилаза	Ацил-L-аминокислоты	L-аминокислота и уксусная кислота

В табл. 6.1 приведена общая классификация важнейших гидролитических ферментов. Три основные группы гидролаз расщепляют сложноэфирные, гликозидные и различные связи с участием атома азота соответственно. Многие гидролазы компартментализованы в тех или иных структурных элементах клетки, отделенных от цитоплазы, как мы уже отмечали ранее, мембранами. Такая локализация гидролаз защищает многие биополимеры цитоплазмы от деструкции. Грамположительные бактерии выделяют в среду множество гидролаз. Надежным хранилищем гидролаз у грамотрицательных бактерий служит ограниченное двумя мембранами периплазматическое пространство наружной оболочки. В клетках эукариот гидролазы могут локализоваться в ограниченных мембраной особых органоидах – липосомах, в периплазме (в микроорганизмах типа дрожжей) или выделяться в среду, где они выращиваются.

Как уже упоминалось ранее, большинство используемых в промышленности гидролаз представляет собой внеклеточные продукты жизнедеятельности микроорганизмов. В то же время некоторые гидролазы обнаружены и в цитоплазме. Здесь они участвуют в метаболических циклах и тем самым выполняют важную функцию, помогая клетке полностью использовать её внутренние ресурсы.

Поскольку вода является универсальным субстратом, концентрация которого составляет около 55 М, и поскольку гидролитические ферменты обычно катализируют реакции деградации, например превращение крахмала в сахара, белков в полипептиды, липидов в глицерин, жирные кислоты и фосфаты то основой для последующего изложения послужат субстраты, гидролиз которых осуществляется в водных растворах. Однако следует отметить, что в некоторых разработанных методах синтеза полипептидов или переэтерификации жиров с низким содержанием воды природные гидролазы могли использоваться и в качестве конденсирующих агентов, т.е. в специфических условиях некоторые гидролитические ферменты, главным образом протеазы и липазы, могут катализировать и обратную реакцию – не гидролиза, а синтеза.

6.2. Протеолитические ферменты

Существует множество ферментов, селективно атакующих азотсодержащие соединения, особенно белки. Эти ферменты находят себе разнообразное практическое применение. Протеазы, как и многие другие гидролазы, разделяются на ферменты, гидролизующие концевые группы, которые носят название *экзопептидаз,* и ферменты, расщепляющие внутренние пептидные связи в биополимерах, которые носят название *эндопептидаз.*

Свободные нативные протеазы применяются в основном в производстве моющих средств, в химической чистке, при умягчении и созревании мяса, в сыроделии (пепсин и реннин), дублении и обезволашивании кож, производстве препаратов, способствующих пищеварению, в пивоварении для осветления пива, в микробиологической промышленности для приготовления гидролизатов – необходимых компонентов различных питательных средств, в медицине при лечении воспалительных процессов и вирулентных ран и в некоторых других случаях.

В качестве добавок к моющим средствам ферменты начали использовать уже с 1913 г., однако особенно резкий рост потребления протеаз начался с конца 1960-х годов. Ферменты, способствующие удалению загрязнений белковой природы, представляют собой смесь нейтральных и щелочных бактериальных протеаз, активных в интервале pH от 6,5 до 10,0 при температурах от 30 до 60°C. Продуцентами таких протеаз являются многие микроорганизмы, а в 20 – 40 годах использовались даже ферменты животного происхождения, выделяемые из поджелудочной железы свиней или крупного рогатого скота. Однако наиболее удобными и недорогими продуцентами протеаз такого рода оказались различные штаммы *B. subtilis*. Обычно помимо протеаз в их состав входят и липазы, в результате чего использование этих ферментов в стиральных порошках позволяет одновременно расщеплять белковые и жировые загрязнения. Кроме того, обладая свойствами ПАВ, ферменты и сопутствующие им белки не дают возможности продуктам гидролиза вновь осаждаться на тканях и выносят их на поверхность вместе с пеной.

Различные методы умягчения разделанных мясных туш с помощью специальных агентов основаны на протеолитической активности недорогих и устойчивых к действию тепла растительных протеаз папаина и бромелаина. В последнее время для этих целей стали применяться и ферменты из печени краба, которые не только умягчали мясо за счет частичного гидролиза коллагена, основного белка соединительной ткани, а также нейтральная протеаза – протосубтилин Г-10Х из *B. subtilis*, которая в небольших количествах способствовала более быстрому «созреванию» мяса. Процесс «созревания» целых туш обычно проводят до их разделки и расфасовки путем контролируемого автолиза собственными ферментами мяса при температуре 5–15°C с одновременным облучением ультрафиолетом для предотвращения роста нежелательных микроорганизмов на поверхности туш. Очевидно, внесение экзогенных ферментных препаратов активирует собственные ферменты мяса и, тем самым, способствуют его более быстрому созреванию.

Сырые ферментные препараты поджелудочной железы различных животных содержат все пищеварительные протеазы, за исключением пепсина и реннина, а также липазы и амилазы. Эти смеси, а также

различные протеазы из *B.subtilis*, обладающие мощной гидролитической активностью, используются для обезволашивания (удаления волос) шкур животных и одновременного гидролиза других белков, не содержащих коллаген, так как в основе механизма обезволашивания лежит гидролиз белков и мукополисахаридов, образующих внутреннюю выстилку волосяных сумок. В этом случае ферментные препараты не требуют высокой степени очистки, однако важно, чтобы не проявлялась активность сопутствующих ферментов, мешающих процессу, например коллагеназ, вызывающих гидролиз коллагена и понижающих прочность кожевенных изделий. Поскольку пепсин гидролизует коллаген, фибриллярный белок, являющейся основой кожного покрова животных, этот фермент нельзя применять при выделке кож.

Ферментные препараты с протеолитическим действием находят себе широкое применение и при получении натурального шелка. Качество шелка – сырца бывает неудовлетворительным из-за высокого содержания в нем склеивающего белка – серицина и жира. Смесь протеаз и липаз гидролизует серицин и уменьшает содержание жира, в результате чего происходит значительное улучшение качества шелковой нити.

Дешевые протеазы микробного происхождения стали использоваться и для нужд сельского хозяйства в качестве микродобавок к кормам сельскохозяйственных животных. Попадая вместе с пищей в организм животного, ферменты оказывают существенное влияние на процессы переваривания кормов и на микробиологические процессы в пищеварительном тракте.

В молочной промышленности широко применяется реннин, как по отдельности, так и в смеси с пепсином. Реннин отщепляет гликопептид от растворимого казеината кальция и таким образом превращает последний в относительно мало растворимый параказеинат кальция, осаждающийся в виде творожного сгустка. Очевидно, пепсин помогает протеканию этого процесса, и поэтому его в небольших количествах добавляют к реннину. Следует отметить, что превращать казеинат кальция в параказеинат могут и многие другие протеазы, но, к сожалению, катализируемый ими протеолиз на этом не останавливается. Поскольку продукты более глубокой деградации казеина обладают большей растворимостью, то творожный сгусток не образуется в этих условиях. Нехватка животного реннина стимулировало разработку методов получения аналогичных бактериальных препаратов, в том числе и с применением генетической инженерии, которые, очевидно, в скором будущем будут применяться в сыроделии.

Широкое применение получили различные эндо- и экзопротеазы для получения белковых гидролизатов из отходов сырья мясной и молочной промышленности. Проведенные испытания показали, что полученные гидролизаты могут с успехом применяться в микробиологической

промышленности и для диагностических целей. Являясь обязательной составной частью микробиологических сред и сред для диагностики различных заболеваний, белковые гидролизаты получили в настоящее время самое широкое распространение. Они с успехом выпускаются в промышленном масштабе, решая сразу же две задачи: экологическую, устраняя отходы, и биотехнологическую, обеспечивая сырьем производство других ценных биологически активных соединений, в том числе и препаратов, получаемых при помощи генетической инженерии. Кроме того, белковые гидролизаты широко применяются в медицинской, пищевой и комбикормовой промышленностях.

Протеолитические ферменты нашли себе широкое применение и в медицинской промышленности в качестве средств, способствующих пищеварению, а также для лечения тяжелых ран. Поскольку ферменты представляют собой белки, способствующие пищеварению энзимы применяют либо в капсулах, либо в таблетках, покрытых специальной оболочкой, предохраняющих вводимые в организм человека ферменты от кислой среды желудка, которая неминуемо вызвала бы их денатурацию.

Протеазы животных применяется также для подавления воспалительных процессов в тканях. В отличие от живых мертвые клетки обычно не способны защищать себя от действия протеаз; на этом принципе основано применение протеаз для лечения вирулентных или сочащихся ран. Протеазы способствуют размягчению омертвелой ткани и клеток, облегчая тем самым дренаж ран и ускоряя их заживление. В последнее время для удобства обработки ран и для увеличения продолжительности действия протеаз, используемых в медицине для этих целей, стали применять ферменты, иммобилизованные на перевязочные материалы. Особенно эффективным для этих целей оказался коллалетин – ферментный препарат из поджелудочной железы животных, обладающий коллагеназной и протеазной активностями.

Протеолитические ферменты, особенно трипсин, подавляют воспалительные процессы и опухоли, связанные с внутренними повреждениями и инфекциями. Действие трипсина, вероятно, основано на растворении тромбов и осадков внеклеточных белков или на локальной активации других защитных систем организма, выполняющих те же функции, или на обоих этих факторах одновременно. Кроме того, протеолитические ферменты тормозят развитие или полностью излечивают ряд тяжелых инфекционных заболеваний, приводящих к накоплению в легких слизи.

Для борьбы с тромбозами сосудов нашла себе широкое применение стрептокиназа – протеаза расщепляющая тромбин, основной компонент сгустков крови. Этот фермент разрушают сгустки крови, затрудняющие кровообращение и способные привести к летальному исходу. В нативном состоянии при его введении внутривенным или внутримышечным

способом, стрептокиназа вызывает мощную иммунную реакцию организма, способную привести к смертельному исходу и без того больного человека. В связи с этим научились лишать этот фермент от его побочного действия методом ковалентной иммобилизации на модифицированные декстраны со средней молекулярной массой (20 – 45кД) при помощи глутарового диальдегида. Кроме того, стрептокиназа обладает и мощным противовоспалительным действием. Подобным методом получена также иммобилизованная холинэстераза, гидролизующая холестерин, локализованный на внутренних стенках кровеносных сосудов, накопление которого, как известно, приводит к атеросклерозу, тяжелому заболеванию, свойственному обычно людям пожилого возраста.

6.3. Дезаминазы

Использование уреазы, иммобилизованной микрокапсулированием вместе со специально приготовленной ионообменной смолой и активированным углем, легло в основу одного из интересных проектов компактной искусственной почки. Образующийся в процессе разложения аммиак адсорбируется внутри микрокапсулы по нижеследующей схеме

$$\text{Мочевина} \xrightarrow[\text{микрокапсулу}]{\text{диффузия в}} \text{мочевина} \xrightarrow{\text{уреаза}} HCO_3^- + NH_4^+ \rightarrow \text{адсорбция на смоле или на активированном угле}$$

Рис. 6.1. Схема искусственной почки при инкапсулировании уреазы

Кроме вышеперечисленного действия, урокиназа, иммобилизованная на декстран, также как и стрептокиназа, способствует рассасыванию тромбов в кровеносных сосудах.

Для борьбы с некоторыми видами лейкозов (рак крови) хорошо зарекомендовала себя аспарагиназа. Механизм действия аспарагиназы основан на её способности гидролизовать аспарагин (β-амид аспарагиновой кислоты), накапливающийся в организме лейкозах. Гидролизуя этот амид, фермент лишает возможности синтеза и существования раковые клетки, использующих аспарагин в качестве строительного материала, и тем самым облегчает течение заболевания.

6.4. Другие гидролазы, применяющиеся в медицине

Из других гидролитических ферментов, не вошедших в табл. 6.1, но тем не менее широко применяющихся в медицине, нельзя не отметить *лизоцим* – фермент, содержащийся в слизи носовой полости и слезах, но получающийся в промышленных масштабах из белков куриных яиц. Лизоцим обладает способностью, как об этом уже упоминалось ранее, гидролизовать мукополисахариды клеточных стенок ряда грам-положительных бактерий и поэтому применяется в качестве антибактериального средства для лечения ряда кожных заболеваний и послеоперационных инфекций. Этот фермент не гидролизуется трипсином химотрипсином и папаином и помимо своего антибактериального действия рекомендуется также при лечении некоторых язв, кори и рассеянного склероза.

Ранее уже отмечалось, что проницаемость клеточных мембран и составляющих их структурных элементов для многих веществ сравнительно низка. В случае клеток высших животных это свойство мембран обусловлено наличием очень вязкой полигиалуроновой кислоты. Эффективность некоторых лекарственных препаратов и местных анестетиков, например в стоматологии, существенно повышается при одновременном введении с ними гидролитического фермента *гиалуронидазы*, расщепляющего полигиалуроновую кислоту.

Некоторые одноклеточные организмы продуцируют *пенициллиназу* (или β-лактамазу) и таким образом защищают себя от летальных доз пенициллиновых антибиотиков. Организм человека не вырабатывает пенициллиназу, поэтому аллергическую реакцию на введенный больному пенициллин можно снять путем инъекции раствора пенициллиназы, которая расщепляет β-лактамное кольцо пенициллина и превращает этот антибиотик в вещество, не вызывающее аллергии.

К гидролазам относится и сравнительно новый лекарственный фермент *стрептодорназа,* противовоспалительное средство, гидролизующее ДНК и тем самым снижающее вязкость экссудатов (воспалительных выделений) из ран.

Широкое применение в медицинской диагностике получила и *глюкозооксидаза,* которая, хотя и не является гидролазой, но тем не менее помогает определять продукты распада сахара в крови больных диабетом. Этот фермент катализирует окисление глюкозы до глюконовой кислоты по следующей схеме:

$$\text{глюкоза} + O_2 + H_2O \longrightarrow \text{глюконовая кислота} + H_2O_2 .$$

Поскольку образующийся при этом пероксид водорода легко обнаружить с помощью специальных индикаторов, глюкозооксидазу

используют в качестве чувствительного и специфического реагента на глюкозу.

6.5. Аминоацилазы

Потребность в L-аминокислотах для применения их в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве постоянно возрастает. В связи с этим большое внимание уделяется микробиологическому и ферментативному методу получения аминокислот. Однако целый ряд аминокислот получают химическим методом в результате чего образуются их рацематы, т.е. равная смесь L- и D-аминокислоты. В большинстве случаев D-аминокислоты не имеют никакой питательной и иной ценности и поэтому желательно получать только физиологически активные L-аминокислоты.

Указанная цель была достигнута в процессе деления рацематов аминокислот с помощью иммобилизованной аминоацилазы, разработанном в конце 50-х годов прошлого столетия японской фирмой Tanabe на примере метионина. В качестве носителя для иммобилизации был использован DEAE-сефадекс и ионный метод связывания фермента с носителем. Вначале рацемат аминокислоты подвергали ацилированию уксусным ангидридом и затем пропускали полученный водный раствор через колонны с иммобилизованным ферментом. В результате получали смесь ацетил-D-метионина и L-метионина, которую затем разделяли за счет их различия в растворимости. Полученный L-изомер складировали, а ацетил-D-изомер подвергали рацемизации и полученную рацемическую смесь вновь пропускали через колонну с иммобилизованной аминоацилазой. В результате такого процесса удавалось получить желаемый L-изомер с количественным выходом. Подобным образом удалось разделить рацематы и многих других аминокислот. Общая схема получения L-изомеров вышеописанным способом представлена на рис 6.2.

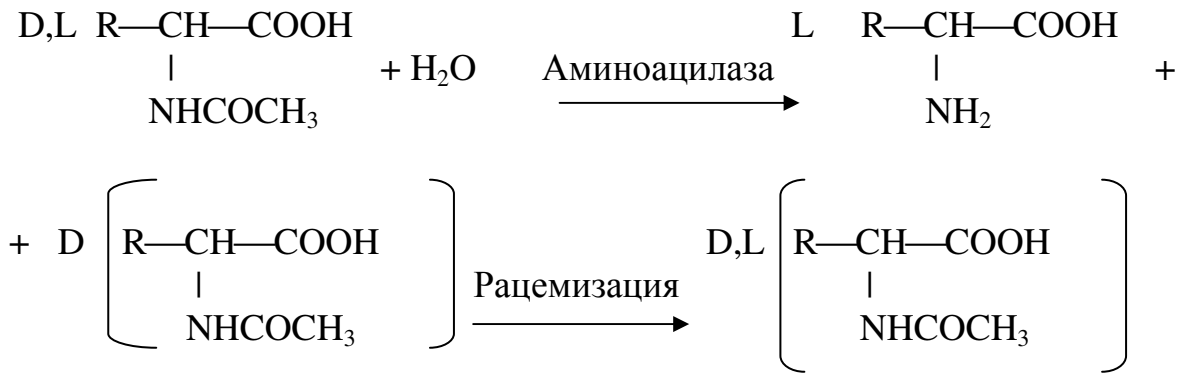


Рис. 6.2. Схема получения L-аминокислот с помощью иммобилизованной аминоацилазы

В нашей стране подобный процесс также используется для деления ацетильных производных рацематов метионина, фенилаланина и валина. В качестве фермента в данном случае используется грибная аминоацилаза, иммобилизованная смешанным методом включения в полиакриламидный гель при помощи глутарового диальдегида. Полученный таким образом технологический биокатализатор имеет время полуинактивации свыше 3 лет и может многократно использоваться для деления различных рацематов D,L-ацетиламинокислот.

Остановимся в этом разделе на ферментативном синтезе некоторых аминокислот, хотя ферменты, использующиеся для этих целей, не относятся к классу гидролаз. Так, для синтеза аспарагиновой кислоты из фумаровой широко применяется нативная и иммобилизованная аспартаза, а также микробные клетки, содержащие этот фермент. Реакция протекает по следующей схеме:

$$\underset{\text{Фумаровая кислота}}{HOOC—CH=CH—COOH} + NH_3 \xrightarrow{\text{аспартаза}} \underset{\text{Аспарагиновая кислота}}{HOOC—CH—CH_2—COOH}$$

Рис. 6.3. Схема получения аспарагиновой кислоты с помощью аспартазы

Для получения другой аминокислоты триптофана, являющейся незаменимой аминокислотой, в качестве предшественника используются индол и аминокислота – серин по нижеследующей схеме

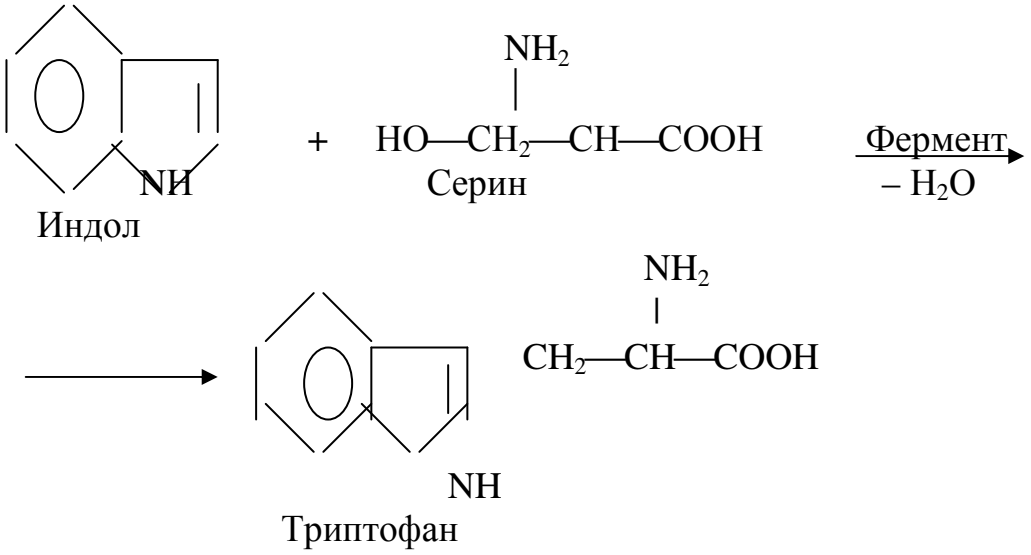


Рис. 6.4. Схема ферментативного синтеза триптофана

В качестве фермента обычно используется в этом случае бактериальная триптофаназа.

Иммобилизованные клетки дрожжей способны синтезировать уже не свободные аминокислоты, а целый трипептид – глутатион, который широко используется в практике лечения глазных болезней и предшественником которого являются глюкоза и неорганический фосфат.

Пять ферментов из *Brevibacterium sp*. осуществляют синтез коэнзима А из пантотеновой кислоты, цистеина и АТФ.

6.6. Применение эстераз

Ферменты этой группы расщепляют сложноэфирные связи с образованием спирта и кислоты или катализируют обратную реакцию:

$$R^1COOR^2 + H_2O \longleftrightarrow R^1COOH + R^2OH.$$

Наиболее важной подгруппой эстераз являются липазы, гидролизующие жиры до глицерина и свободных жирных кислот:

$$\begin{array}{c} H_2C—OCOR^1 \\ | \\ HC—OCOR^2 \\ | \\ H_2C—OCOR^3 \end{array} \xleftrightarrow{\text{Липаза}} \begin{array}{c} H_2COH \\ | \\ HCOH \\ | \\ H_2COH \end{array} + \begin{array}{c} R^1COOH \\ + \\ R^2COOH \\ + \\ R^3COOH \end{array}$$

Липид Глицерин Жирные кислоты

Панкреатическая липаза, выделяемая в пищеварительный тракт после нейтрализации кислого содержимого желудка, расщепляет жиры до свободных жирных кислот; при этом образуются и промежуточные продукты гидролиза – моно- и диглицериды. Как уже упоминалось ранее, нерастворимость высокомолекулярных жиров служит причиной того, что липазы проявляют заметный каталитический эффект только на границе раздела фаз вода – липид.

Специфичность липиз, так же как и специфичность второй группы эстераз, называемых алиэстеразами, относительно невысока. Липазы активны при гидролизе высокомолекулярных жиров и не действуют на жиры, построенные из карбоновых кислот с короткой углеводородной цепью. Последние, напротив, легко гидролизуются алиэстеразами, не активными по отношению к высокомолекулярным жирам. Активность липаз повышается в присутствии ПАВ (например, желчных кислот, которые стабилизируют высокую удельную поверхность жиров в

эмульсиях) и ионов кальция, которые, очевидно, связывают образующиеся жирные кислоты путем осаждения или образования комплексов. Связывание жирных кислот выводит их из сферы реакции, в противном случае они могут действовать либо как ингибиторы, либо приводить к обратной реакции переэтерификации, т.е. к образованию триглицеридов.

Реакции переэтерефикации стали широко использоваться в последнее время для создания специальных видов жиров для пищевых и лечебных целей. Как мы уже отмечали ранее, три жирных кислоты являются *незаменимыми* для организма человека: линолевая, линоленовая и арахидоновая, в какой-то мере к ней примыкает и олеиновая кислота. Все эти кислоты и их производные содержат одну, две, три и большее количество ненасыщенных двойных связей и в значительной степени определяют пищевую и биологическую ценность природных жиров. Наименьшее количество незаменимых жирных кислот содержится в животных жирах, особенно в жирах крупного рогатого скота, в связи с чем последние имеют более низкую усвояемость, чем растительные жиры, содержащие в достаточном количестве линолевую и линоленовую кислоты. Правда, в состав растительных жиров не входит арахидоновая кислота, но последняя может быть синтезирована в организме млекопитающих из линолевой или линоленовой кислот.

Учитывая способность липаз катализировать не только реакцию гидролиза жиров, но и их синтеза, исследователем пришла в голову интересная мысль – попытаться улучшить состав природных жиров за счет реакции переэтерификации. В частности, с помощью этой реакции заменить трудно усвояемые насыщенные жирные кислоты с длинной цепью, например такие, как стеариновая, пальмитиновая, на легко усвояемые незаменимые жирные кислоты. С этой целью были использованы липазы самого различного происхождения как в нативной, так и в иммобилизованной форме.

Идея улучшения природных жиров оказалась весьма плодородной и в настоящее время разработана целая серия технологий по созданию жиров с заданными свойствами при помощи реакций переэтерификации, катализируемых липазами. Причем, самое интересное, что большинство реакций переэтерификации протекали наиболее успешно в органических средах, содержащих следовые количества воды. Жиры, полученные энзиматическим методом, оказались существенно лучше природных жиров и нашли применение не только в пищевой промышленности, но и в медицине для лечения атеросклерозов и других сосудистых заболеваний.

Следует отметить, что некоторые протеазы, например трипсин, также обладают эстеразной активностью и, очевидно, в организме могут частично заменять липазы при заболеваниях поджелудочной железы.

Микробные липазы или продуцирующие их организмы широко используются при очистке сточных вод, расщепляя жировые и нефтяные

пленки. Обычно собранную жидкость, содержащую большое количество жира или масел, инкубируют с микроорганизмами – продуцентами липаз и тем самым частично очищают её от жировых пленок, обеспечивая тем самым доступ кислорода к очистным сооружениям, содержащим аэробные микроорганизмы, например, «активный ил».

Как уже отмечалось ранее, микробные липазы вместе с протеазами применяются в бытовой химии в качестве биодобавок к стиральным порошкам и различным моющим средствам.

Отдельные виды эстераз используются в медицинской практике, главным образом для лечения атеросклероза. Так, высокоочищенная холинэстераза в нативном или иммобилизованном состоянии получила распространение из-за своей способности гидролизовать холестерин, локализованный на внутренних стенках кровеносных сосудов.

Следует остановиться еще на одной группе эстераз, называемых фосфатазами. Фосфатазы являются неотъемлемыми биополимерами внутриклеточных путей метаболизма, в которых используется химическая свободная энергия, высвобождающаяся при окислении клеточного топлива – макроэргических фосфатов и других фосфорсодержащих соединений. В последние годы фосфатазы стали применяться в мясной промышленности вместе с протеазами для улучшения нежности при созревании мяса.

6.7. Применение амилаз, карбогидраз и изомераз

Находящие широкое применение амилазы представляют собой ферменты, которые гидролизуют гликозидные связи в крахмале и родственных полимерах глюкозы. Чтобы понять различие между разными типами амилаз, следует вспомнить, что крахмал состоит из линейных полимеров глюкозы, называемых амилозой и разветвленного полимера – амилопектина. Последний значительно более растворим по сравнению с амилозой и способен резко повышать вязкость крахмала. При обработке α-амилазой вязкость раствора снижается за счет *неупорядоченного* разрыва любых α-1,4-гликозидных связей; по этой причине α-амилазу часто называют *ферментом, разжижающим крахмал.* Напротив, β-амилаза может атаковать α-1,4-связи только на не восстанавливающих концевых участках полимерной цепи, поэтому при гидролизе линейных полимеров этим ферментом, всегда образуется мальтоза. По этой причине β-амилазу называют часто *осахаривающим ферментом.* При обработке крахмала β-амилазой в конечном итоге образуется смесь мальтозы и декстринов, представляющих собой фрагменты молекул крахмала с концевыми 1,6-связями. Эти связи β-амилаза не гидролизует.

Таблица 6.2

Области наиболее широкого применения амилазных ферментов

Производство	Применение
Производство глюкозы и патоки	Крупномасштабное производство сахаров путем полного или частичного гидролиза крахмала амилоглюкозидазой или α-амилазой
Пивоварение	Превращение размолотых зерен крахмала в мальтозу (субстрат дисахаридной природы, пригодный для дальнейшего дрожжевого брожения)
Хлебопечение	Заквашивание теста: превращение части крахмала в дисахариды, образующие при последующем ферментативном распаде диоксида углерода
Производство фруктовых соков	Осветление путем гидролиза нерастворимых фракций крахмала
Бумажная промышленность	Снижение вязкости раствора крахмала под действием α-амилазы, предшествующее нанесению раствора на целлюлозную основу (бумага с регулируемой массой)
Текстильная промышленность	Шлихтование: α-амилаза снижает вязкость растворов крахмала, применяющихся затем для усиления волокон основы Расшлихтовка: обработка α- и β-амилазами удаляет шлихт из тканного материала; это обеспечивает равномерность последующего окрашивания и необходимую текстуру ткани
Кондитерская промышленность	Производство кондитерских изделий необходимой консистенции

Другой осахаривающий фермент, *амилоглюкозидаза* (имеющая много других названий, в том числе глюкоамилаза), атакует прежде всего

не восстанавливающие концевые α-1,4-связи крахмала, гликогена, декстринов и мальтозы. Амилоглюкозидаза гидролизует также α-1,6-связи, но со значительно меньшей скоростью. Если целью процесса является получение глюкозы, а не мальтозы, то применяют смесь ферментов или последовательную обработку α-амилазой и глюкоамилазой. Такие процессы применяются на спиртоводочных заводах (в отличии от пивоваренных предприятий), в производстве концентрированных растворов глюкозы и кристаллической глюкозы. Использование амилаз в производстве глюкозы и других областях обуславливает большую практическую значимость этих ферментов. Основные сферы применения амилаз представлены в табл. 6.2.

Амилазы получают из разных источников. Они продуцируются рядом бактерий и плесеней. Препараты амилазы, используемые человеком для пищевых целей, обычно получают из зерновых культур, в первую очередь из ячменя, пшеницы, ржи, овса, кукурузы, сорго и риса. В амилазах зерна отношение осахаривающей и разжижающей ферментативных активностей зависит не только от типа растения, но и от состояния зерен, в первую очередь от того, проросли ли зерна или нет. В производстве солода (размягченных проросших зерен ячменя), применяемого в пивоварении, не проросшие зерна ячменя хранят в условиях высокой влажности и соответствующей температуры, способствующих их быстрому прорастанию, причем одновременно в них возрастает содержание α-амилазы. Затем проросшие зерна медленно высушивают в печи. В сухом препарате амилазная активность не проявляется, но ферменты не подвергаются необратимой инактивации. Обладающий высокой гидролитической активностью высушенный и измельченный солод используют затем для превращения крахмала в сахара, которые впоследствии могут быть переработаны путем дрожжевого брожения.

Другие перечисленные в табл. 6.2 карбогидразы также расщепляют гликозидные связи. Так, например, совместное применение *пуллуланазы*, которая селективно расщепляет 1,6-гликозидные связи боковых цепей, и амилазы повышают выход глюкозы из крахмала. В производстве мороженого обычно используют *лактазу*, расщепляющую лактозу – молочный сахар – на более сладкие моносахариды глюкозу и галактозу. Родственный фермент *инвертаза* гидролизует сахарозу и полисахариды, содержащие β-D-фруктофуранозильные связи. Свое название этот фермент получил после того, как было установлено, что гидролиз сахарозы в растворах и образование глюкозо-фруктозного раствора сопровождается изменением направления вращения плоскости поляризации света. Частично или полностью гидролизованный раствор сахарозы обладает двумя ценными для кондитерской промышленности качествами – он

слаще, чем исходный раствор, и не кристаллизуется при выпаривании до значительно более высоких концентраций.

Большое промышленное значение во многих странах приобрел фермент *глюкоизомераза* за счёт своей способности изомеризовать глюкозу во фруктозу. При 50^0С константа равновесия этой реакции изомеризации близка к единице, причем изменение температуры мало влияет на эту константу изомеризации, поскольку теплота реакции изомеризации мала и составляет всего около 4,5 кДж/моль. Продуктом реакции является смесь глюкозы и фруктозы в отношении 1:1. Такая смесь слаще глюкозы и может заменять сахар в самых различных областях пищевой промышленности и особенно в производстве безалкогольных напитков и хлебопекарной промышленности. Еще более сладкие смеси удаётся получить путем хроматографирования и разделения на колонках этих смесей, продуктов изомеризации, за счёт обогащения их сладкой фруктозой. Для этого процесса, как правило, используют колонны с иммобилизованной глюкоизомеразой. Для иммобилизации чаще всего применяют физические методы, а именно сорбцию фермента на носителе за счет ионного связывания. Принципиальная схема получения такой смеси приведена на рис. 6.5.

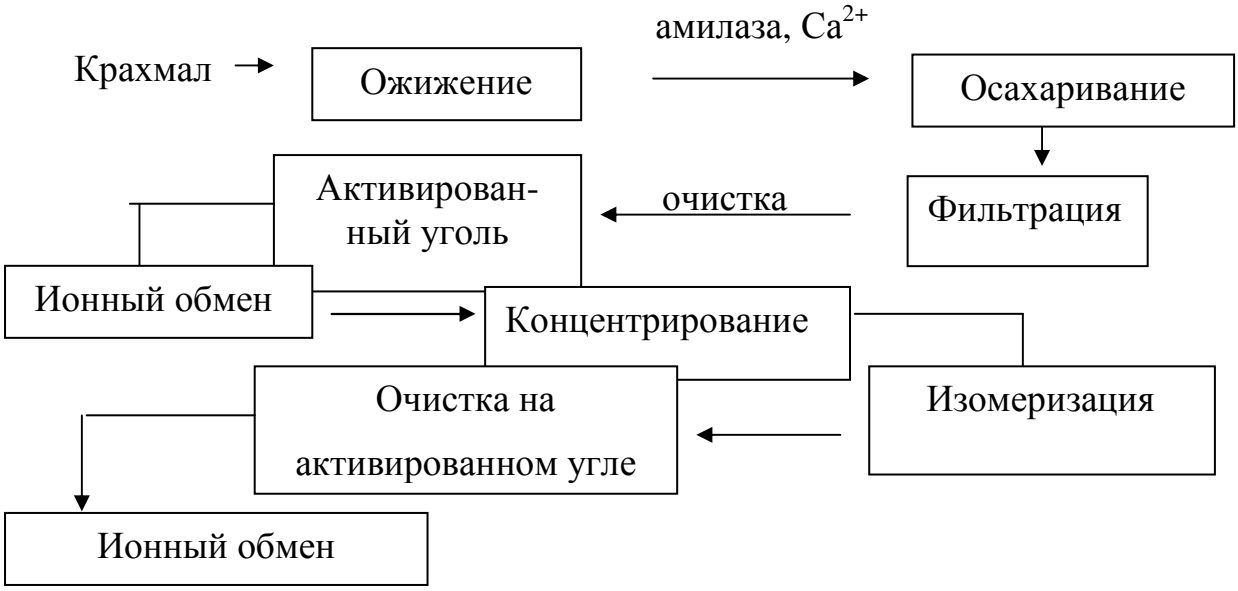


Рис. 6.5. Схема производства сиропа с высоким содержанием фруктозы при участии иммобилизованных ферментов

Глюкоизомераза представляет собой внутриклеточный фермент, продуцируемый рядом микроорганизмов, из которых используются главным образом некоторые штаммы *Arthrobacter* и *Streptomyces.* Необходимость дезинтеграции клеток достаточно мягкими методами, не вызывающими необратимую инактивацию фермента, приводит к

существенному повышению стоимости глюкоизомеразы по сравнению, например, с внеклеточными гидролазами. К тому же глюкоизомераза очень чувствительна к ряду ингибиторов. Оба эти фактора предполагают целесообразность иммобилизации глюкоизомеразы и ведения процесса в строго контролируемых условиях.

В данном процессе, наряду с иммобилизованным ферментом, можно использовать и целые клетки, иммобилизованные методом включения в гель, например, коллагена или альгиновой кислоты, что позволяет ещё более удешевить процесс за счет исключения стадий выделения фермента.

В приведенной схеме используются два иммобилизованных фермента – α-амилаза и глюкоизомераза. Для стабилизации α-амилазы процесс осахаривания крахмала проходит при температуре около 105°С, к реакционной смеси добавляют ионы Ca^{2+}, но затем их необходимо удалять из реакционной среды, так как они ингибируют ферментативную активность глюкоизомеразы. Удаление кальция осуществляют с использованием колонки с катионитом.

6.8. Применение целлюлаз и лигнинразрушающих ферментов

Прежде чем начинать наше знакомство с ферментами, расщепляющими целлюлозу и разрушающими лигнин, вспомним о некоторых свойствах древесины и составляющих её компонентах, так как именно они являются основными субстратами для вышеупомянутых ферментов. Итак, древесина или вторичная ксилема – это высокоспециализированная система растительных тканей, выполняющая функцию водоснабжения, при одновременном обеспечении высокой механической прочности многолетней структуры дерева. Она состоит из ряда специальных эукариотических клеток, которые различаются между собой в зависимости от того, принадлежит ли древесина к хвойным или лиственным породам. Как и кора, иначе флоэма, древесина образована клетками камбия – продольной делящейся тканью, расположенной между древесиной и корой. Отсюда вытекает важная характеристика древесины; ежегодное отложение нового наружного слоя, примыкающего к камбию, и убывание возраста слоёв от центра к периферии.

Основными материалами, из которых построены клеточные стенки древесины, являются целлюлоза, лигнин и гемицеллюлозы (полиозы). Они являются самыми распространенными компонентами возобновляемого органического вещества на Земле, составляя, соответственно: 40, 30 и 26% его общей массы. Не случайно, поэтому, именно древесина составляет основную массу возобновляемой органической материи.

Как известно, целлюлоза является основным армирующим материалом клеточных стенок, образующим упорядоченные нитевидные структуры – фибриллы. Лигнин и гемицеллюлозы являются аморфными

биополимерами сетчатого или разветвленного строения и играют роль связующих (наполнителей). Распределение этих биополимеров в толще клеточной стенки очень неравномерно и определяется её тонкой структурой. В зависимости от вида древесины и породы деревьев содержание целлюлозы может колебаться от 38 до 52%, гемицеллюлоз – от 16 до 30% и лигнина от 18 до 32,5%.

Итак, основной компонент древесины, целлюлоза является самым распространенным органическим веществом на Земле. К сожалению, этот весьма перспективный субстрат для получения многих ценных продуктов, встречается в древесине только в виде композита с другими биополимерами, и её сложно отделить от них без частичного разрушения. Известно также, что наибольшее количество (80 – 98%) целлюлозы содержится в хлопке, льне и некоторых других сельскохозяйственных культурах, но, в отличие от древесины, они требуют для своего выращивания определенных денежных и трудовых затрат и поэтому как сырьё уступают древесине.

Считается, что мономером целлюлозы является глюкоза, но в строгом смысле слова мономером целлюлозы является не глюкозное, а дисахаридное (целлобиозное) звено. Гибкость молекулы целлюлозы определяется возможностью вращения ангидроглюкозных остатков в целлобиозном звене относительно β-гликозидной связи, что выражается в изменение углов φ и ψ (вращение вокруг C′1–O4 и C4–O4), соответственно, и угла θ, характеризующего поворот полимерной цепи вокруг оси, проходящей через гликозидные кислороды. Устойчивость линейной конформации целлюлозы определяется, в частности, минимальным отталкиванием C′1–H и C4–H в такой конформации.

В молекуле целлюлозы, также, как и в других полигликозидах, выделяют восстанавливающий и не восстанавливающий концы. Направление молекулы считают от не восстанавливающего к восстанавливающему концу. Восстанавливающий конец молекулы целлюлозы – это остаток глюкозы, полуацетальный гидроксил C1- атома которого не вовлечен в гликозидную связь. Соответственно, не восстанавливающий конец – ангидроглюкозный остаток, у которого свободен экваториальный гидроксил при C4-атоме. Известно также, что существуют аморфные и кристаллические формы целлюлозы, из которых аморфная форма легче поддается действию ферментов. Остановимся вначале на биотрансформации целлюлозы, а затем уже перейдем к другим компонентам древесины.

В настоящее время изучению ферментативного гидролиза целлюлозы посвящено множество работ, проводившихся в различных странах. Прежде чем приступить к изложению этой темы, следует подчеркнуть, что ферментные препараты, использующиеся для деполимеризации целлюлозы и обычно называемые целлюлазой,

представляют собой сложный комплекс многих ферментов. Более того, природа входящих в состав целлюлазы ферментов и их относительные количества зависят от типа микроорганизмов, из которых была выделена целлюлаза, а часто и от процесса получения комплекса ферментов.

Некоторые методы предварительной обработки позволяют модифицировать целлюлозу и родственные ей субстраты и тем самым снизить их устойчивость к гидролизу. Таким образом, скорость гидролиза целлюлозных материалов и выхода продуктов реакции в каждом конкретном процессе зависят от совокупности нескольких факторов: во-первых, от природы и свойств субстрата, во-вторых, от результатов предварительной обработки и, в-третьих, от степени активности и специфичности индивидуальных ферментов, входящих в состав целлюлаз.

К сожалению, в организме человека, свиней и некоторых других животных и птиц (например, кур) отсутствуют ферменты, гидролизующие целлюлозу, или присутствуют в столь ограниченном количестве, что не способны осуществить биоконверсию целлюлозы в полном объеме. Исключением в этом отношении являются только жвачные животные, в одном из отделов желудка которых (рубце) находятся соответствующие микроорганизмы – бактериальные целлюлазы. При этом в «рубцовой жидкости» находится только 5% целлюлаз в свободном состоянии, остальная часть представлена ассоциатами, т.е. находится в частично иммобилизованном или стабилизированном состоянии. В гидролизе целлюлозы участвуют различные бактерии, населяющие рубец. За 6–8 часов пребывания в этом отделе желудка целлюлоза расщепляется на 40–50%.

Таким образом, чтобы сделать целлюлозу пригодной для её дальнейшей переработки для пищевых целей тем млекопитающим, у которых отсутствует в организме рубец и целлюлозорасщепляющие микроорганизмы необходимо осуществлять предварительное расщепление последней. Остановимся на путях подготовки этого субстрата к ферментативному гидролизу.

Механическое измельчение является наиболее простым способом предварительной обработки. Как известно, любое измельчение позволяет существенно увеличить удельную поверхность материала, а, следовательно, площадь её контакта с биокатализатором или каким либо другим реагентом. Обычно сильное механическое измельчение приводит к изменению структуры сырья на молекулярном уровне. Так, при измельчении целлюлозы на вибрационной, шаровой или роликовой мельнице степень её полимеризации может снизиться с 1200 до 900 глюкозных единиц. При этом важно контролировать температурный режим процесса измельчения, поскольку значительное повышение температуры может вызвать протекание нежелательных побочных реакций. Однако механическое измельчение целлюлозы играет

несомненно важную роль, так как в настоящее время установлено, что скорость гидролиза целлюлозы прямо пропорциональна величине удельной поверхности этого субстрата.

Другими методами предварительной обработки являются γ-облучение целлюлозы, её пиролиз, а также обработка кислыми или щелочными реагентами. Например, жесткий кислотный гидролиз целлюлозы и подобных ей компонентов при температуре 120–130°C 10–12% HCl в течение 5–6 ч при повышенном давлении может привести к расщеплению целлюлозы до декстринов и даже мономерных звеньев, однако при этом происходят многочисленные побочные реакции, препятствующие использованию этих фрагментов для дальнейшего применения. Обычно при таком гидролизе происходит образование значительных количеств метанола, формальдегида, ацетона, фурфурола и других токсичных соединений. Приблизительно такая же картина наблюдается и при пиролизе целлюлозы. Тем не менее, эти процессы широко используются при обработке древесины, когда требуются жесткие условия отделения гексоз от пентоз и лигнина, что используется на практике при получении кормовых дрожжей из древесного сырья.

При щелочном гидролизе выход токсичных продуктов существенно ниже, но, как правило, гидролиз целлюлозы и другого растительного сырья происходит существенно хуже и, кроме того, имеет место значительная рацемизация продуктов гидролиза.

Таким образом, для подготовки целлюлозы к дальнейшей ферментативной переработке и переводу значительной её части из кристаллического состояния в аморфное, которое, как уже отмечалось ранее, лучше подвергается ферментативному гидролизу, следует учитывать все эти изменения и выбирать из процессов предобработки наиболее мягкие, но эффективные. Например, пропитывание обезвоженной целлюлозы 1–5% растворами кислот с последующим температурным гидролизом при 400°C в течение нескольких минут дает выход декстринов от 40 до 80%, которые в дальнейшем успешно превращаются в глюкозу при последующем ферментативном гидролизе. Начаты также исследования по переработки целлюлозы и лигноцеллюлозы, основанные на шнековой экструзии, обработке гетерогенными катализаторами в сочетании с методами ультрафильтрации, а также газификация в псевдоожиженном слое.

В настоящее время установлено, что основные ферменты, гидролизующие целлюлозу и другие компоненты, входящие в состав древесины являются грибы как микро-, так и макроформ. Действительно, превращение древесины в природе, приводящее в конечном итоге к её полному разложению и гумификации – сложный и длительный процесс, в ходе которого происходит взаимодействие различных организмов, последовательная смена одних форм другими, их взаимопомощь и

одновременно – конкуренция. Основную роль в нем безусловно играют различные грибы – *ксилотрофы*. В пораженной древесине эти грибы, по всей вероятности живут вместе с бактериями, например, с азотфиксирующими бактериями, обеспечивающими обогащение бедного древесного субстрата доступным азотом, причем на долю собственно ксилотрофов приходится более 90% разлагаемой древесины.

Разрушая мембраны пор в древесине, бактерии способствуют её аэрации и этим стимулируют рост грибов. Грибы, идеально приспособленные к существованию плотного субстрата, бедного питательными веществами, но богатого трудноусвояемыми источниками углерода – лигнином и целлюлозой. Для грибов, по-видимому, характерна реутилизация доступного азота, фосфора и микроэлементов из отмерших остатков клеток и транспорт этих необходимых компонентов в зону активного роста. В подавляющем большинстве случаев грибы – продуценты целлюлаз, относят к двум типам: аскомицетам и базидомецетам, к которым относятся наиболее эффективные разрушители целлюлозы и полиоз, так называемые возбудители «мягких гнилей» древесины. Считается, что возбудители «мягкой гнили», предпочтительно деполимеризуют целлюлозу, тогда как возбудители так называемых «белых коррозионных гнилей» – лигнин. Однако, как оказалось впоследствии, что возбудители «мягкой гнили» также способны разрушать лигнин, как и возбудители «белой гнили» – частично разрушать целлюлозу.

В настоящее время наиболее тщательно изучены и охарактеризованы целлюлазные системы, принадлежащие к «гомогенной мягкой и бурой трухлявой гнилям», а также к «белой трухляво-волокнистой гнили», в частности к представителям базидомицетов, которые продуцируются грибами *Trichoderma.* В частности, в состав гриба *T.viridae* входят следующие ферметы: эндо-1,4-β-глюканаза, экзо-1,4-β-целлобиогидролаза, целлобиаза (β-глюкозидаза), эндо-1,3- и эндо-1,4-β-глюканаза и 1,3-β-глюканаза, т.е. практически весь комплекс ферментов, способных биотрансформировать целлюлозу в глюкозу и декстрины. На рис. 6.6 приведена гипотетическая схема этой реакции.

Как видно из приведенной схемы, в гидролизе целлюлозы участвуют как эндо-, так и экзо-глюканазы и обычно в процессе их воздействия на целлюлозу наблюдается определенный синергизм.

Исследователями установлено, что кинетика каждой стадии в приведенной схеме реакций подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен со строго конкурентным и неконкурентным ингибированием. Целлюлазы с различными свойствами и активностями продуцируют и многие другие грибы и плесни рода *Fusarium solani, Aspergillus niger, Pennicillium funicolsum, Sporatrichum pulverulentum, Cellulomas sp., Clostridium thermocellum* и *Clostridium thervosaccharolyticum.* Так, совсем недавно

удалось выделить из навоза сельскохозяйственных животных смешанную культуру *Clostridium,* способную конвертировать целлюлозу, целлобиозу, глюкозу, кукурузный остаток, хлопок и льняную костру в этанол с выходом спирта до 0,95 г/л из 1,5 г/л целлюлозы, а также уксусную кислоту (до 0,8 г/л). Однако наиболее изученными оказались грибы рода *Trichoderma*. Помимо уже перечисленной культуры *T. viridae*, эффективными продуцентами целлюлаз оказались и другие грибы этого рода *T. reesei* и *T. longibrachiatum*. При этом чрезвычайно важным для успешного гидролиза оказалась способность ферментов сорбироваться на целлюлозе.

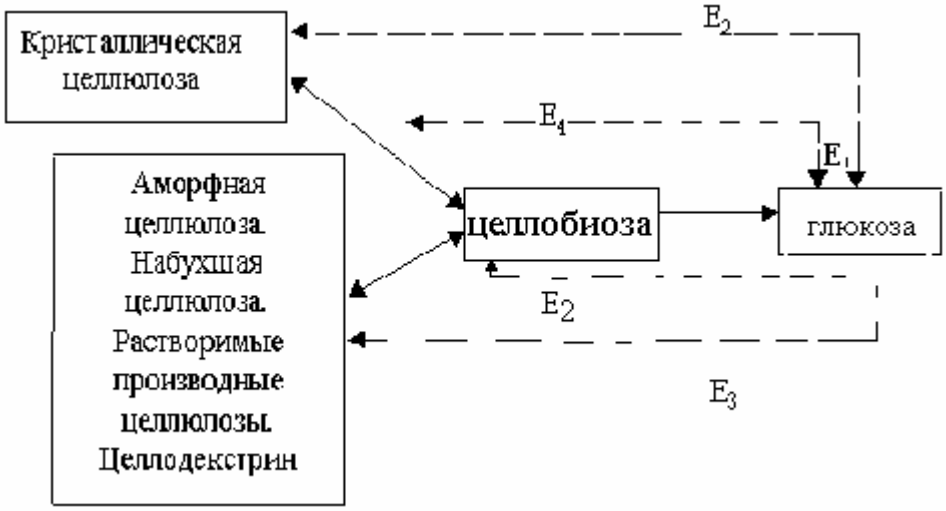


Рис. 6.6. Принципиальная схема гидролиза целлюлозы грибными ферментами. E_1 – эндо-1,4-β-глюканаза; E_2 – экзо-1,4-β-целлобиогидралаза; E_3 – экзо-1,4-β-глюкангидролаза; E_4 – β-глюкозидаза. (⟶ основной путь гидролиза; – – – побочная реакция; — — — → эффекты ингибирования)

При гидролизе целлюлозы, как это видно из схемы, приведенной на рис. 6.6, в закрытых реакторах с перемешиванием наряду с гидролизом целлюлозы может происходить и реакция синтеза отдельных её фрагментов, а также, как уже упоминалось ранее, различные виды ингибирования процесса продуктами реакции. В связи с этими обстоятельствами в настоящее время разработана целая система биореакторов, в которых гидролиз совмещен с ультрафильтрацией, позволяющей удалять из реакционной смеси образующиеся продукты гидролиза и тем самым уменьшить ингибирование процесса и увеличивать выход продуктов реакции.

Большинство грибных целлюлаз и целлюлаз актиномицетов имеют pH-оптимум при значении 4–5 и температурный оптимум 40–60°С. Многие

целлюлазы являются углеводсодержащими белками, причем углеводная цепь может составлять до 90% от молекулярной массы фермента. Обычно углеводная часть фермента играет роль связующего участка, способствуя сорбции фермента на частицах целлюлозы.

Из целлюлаз, получаемых в нашей стране, наиболее известен препарат «целовередин Г-20Х». Он представляет собой комплексный препарат целлюлитических ферментов и ферментов, расщепляющих гемицеллюлозы (полиозы), полученный при глубинном культивировании гриба *T. viridae*. В состав препарата входят все вышеперечисленные ферменты и он стандартизован по целлюлазной активности. За единицу активности целлюлазы принята способность фермента образовывать 1 мг восстанавливающих сахаров (глюкозы) при действии на целлюлозу (50 мг хроматографической бумаги) при температуре 50°С, pH 4,7 в течение часа.

В международных единицах за единицу целлюлазной активности принята способность фермента, действуя на субстрат (хроматографическую бумагу) при 50°С и pH 4,8 образовывать 1 мкМ восстанавливающих сахаров (глюкозу) в течение минуты. Данная единица в 11 раз больше, чем единица, принятая в России.

Вторая по важности полисахаридная составляющая древесины – гемицеллюлоза или более правильнее называть эту составляющую *полиозы*, так как в состав её входит не один, а целый ряд полисахаридных соединений. Основным отличием полиоз от целлюлозы является разнообразие углеводных остатков, входящих в их состав, значительно более низкая степень полимеризации и разветвленность цепи. Ангидроуглеводные остатки, входящие в состав полиоз, относятся к пентозам, гексозам, гексуроновым кислотам и дезоксигексозам. Основными моносахаридами этого класса углеводородов являются: для хвойных лесов маноза – от 15 до 21%, галактоза – от 2,6 до 5,6%, ксилоза – от 5,9 до 8,8%, арабиноза – от 1,5 до 5,4% общей массы полисахаридной фракции; для лиственных – соответственно, 1 – 5% , 1 – 2,3%, 20 – 34,5% и 0,1 – 1,7%. Причем L-арабиноза встречается в составе различных полиоз как в виде пиранозного, так и в виде фуранозного цикла. Основные цепи молекул полиоз могут представлять собой как гомополимер, например, ксилан, так и гетерополимер, например, глюкоманнан.

Полиозы часто делят на три класса по типу основных углеводных звеньев: гексозаны, пентозаны и полиурониды.

Другая классификация предусматривает выделение следующих групп нецеллюлозных растительных полисахаридов: 1) гемицеллюлозы, куда входят как гексозаны (глюкоманнаны), так и пентозаны (ксиланы); 2) пектины: галактуроназы (полиурониды), арабинаны (пентозаны), галактаны (гексозаны) и/или линейные арабиногалактаны (смешанные гексо/пентозаны); 3) другие смешанные поисахариды: арабиногалактаны с высокй степенью ветвления, фуко- и/или галактоксилоглюканы.

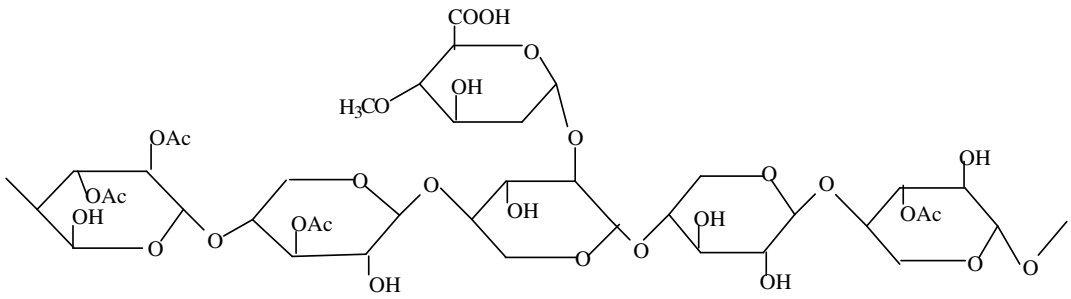
Данное разделение также в значительной степени отражает функциональные отличия групп полисахаридов. Объединение ксиланов и маннанов в группу гемицеллюлаз указывает на их роль, сопутствующую целлюлозе, в клеточной стенке. Объединение в группу пектинов заряженных галактуранов и нейтральных малоразветвленных полисахаридов на основе арабинозы и галактозы подчеркивает их совместную локализацию в первичной клеточной стенке древесины. Сильно разветвленные галактаны и арабиногалактаны относят к иной группе, хотя родство химической структуры делает целесообразным их рассмотрение вместе с линейными и малоразветвленными аналогами – компонентами пектинов.

Кратко остановимся на основных представителях первой группы полисахаридов, входящих собственно в класс гемицеллюлоз.

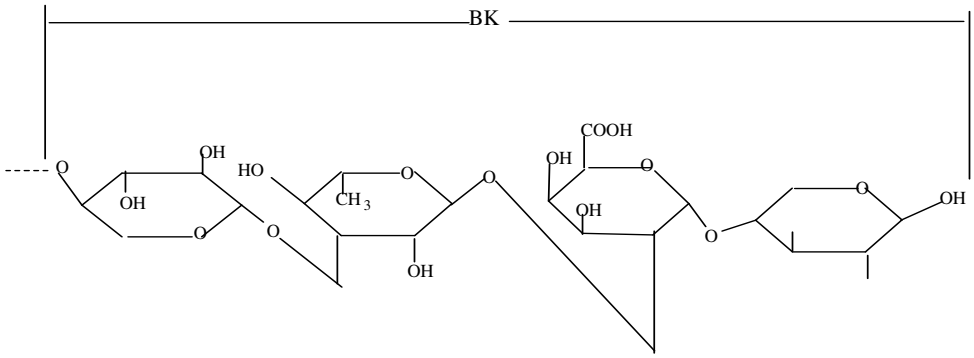
Ксиланы. Ксиланы – пентозаны с линейной цепью из соединенных β-1,4-глюкозидной связью остатков ксилозы. *Ксиланы лиственных пород* (4-О-метилглюкуроноксиланы) являются основными после целлюлозы полисахаридными компонентами древесины. Их основная цепь через нерегулярные интервалы имеет ответвления, состоящие из остатков 4-О-метилглюкуроновой кислоты; последние прикреплены к остаткам ксилозы α-1,2-гликозидной связью. В среднем, одно уронидное звено приходится на 9–10 ксилозных, однако встречается и более высокое их содержание. Соотношение остатков ксилозы и глюкуроновой кислоты меняется от 9:1 до 15:1.Средняя степень полимеризации основной цепи составляет от 100 до 200 ксилозных звеньев.

Основным отличием *ксиланов хвойной древесины* от ксиланов лиственных является присутствие L-арабинофуранозных звеньев, присоединенных α-1,3-гликозидной связью к основной цепи, и отсутствие (или минорное содержание) ацетильных групп при С2ОН и С3ОН остатков ксилозы. По этой причине они носят название арабино-4-О-метилглюкуроноксиланов. Обычно один остаток арабинозы приходится в среднем на восемь остатков ксилозы. При этом молекулы ксиланов хвойных имеют в среднем в 1,5 раза меньшую степень полимеризации. Соотношение мономеров в основной и боковых цепях у них составляет примерно 2,5 против 5:1 у лиственных ксиланов. Восстанавливающий конец хвойных ксиланов так же, как и у лиственных, включает рамнозу и галактуроновую кислоту в основной цепи.

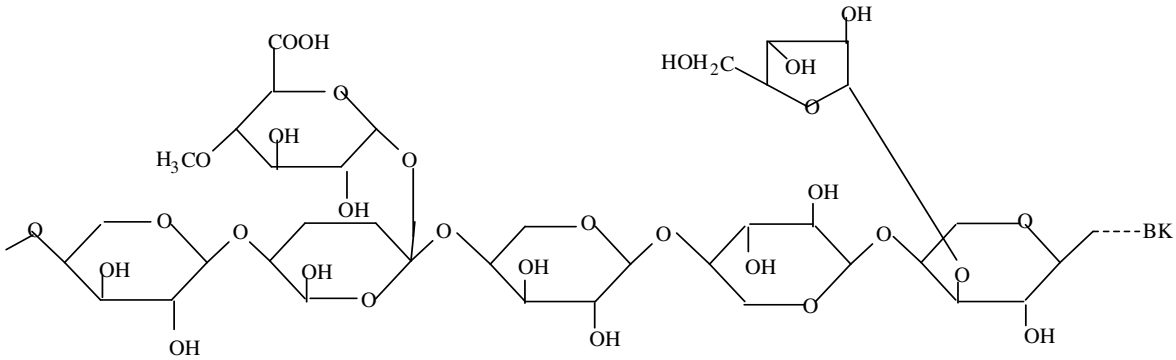
Глюко- и галактоманнаны. Представляют собой гетерополисахариды, в основе цепи которых чередуются остатки маннозы и глюкозы. Простейшее строение имеют глюкоманнаны лиственных, сополимеры глюкозы и маннозы с β-1,4-гликозидными связями между ними и небольшим числом ветвлений.



а



б



в

Рис. 6.7. Ксиланы лиственной и хвойной древесины: а – 4-*о*-метиглюкуроносиланы лиственных; б – ВК-восстанавливающий конец молекулы; в – арабиноглюкуроноксиланы хвойных пород

Среднее соотношение Man:Glc в большинстве пород лиственных деревьев составляет 1,8:1. Среднечисловая степень полимеризации глюкоманнанов лиственных составляет 60–70 углеводных остатков. В лиственных деревьях глюкоманнаны составляют от 1 до 3–5% сухой массы, что в 4–7 раз меньше, чем содержание ксиланов. У хвойных деревьев их содержание достигает 20–25%, причем их строение более сложное, чем у лиственных. К основной цепи дополнительно присоединены α-1,6-гликозидной связью остатки галактозы, число которых варьирует в довольно широких пределах, в зависимости от

источника и метода выделения полисахарида. Кроме того, часть глюкозных и маннозных звеньев ацетилирована по С2ОН и С3ОН – группам, поэтому их называют О-ацетил-галактоглюкоманнанами. Степень замещения основной цепи ацетогруппами составляет от 0,17 до 0,36.

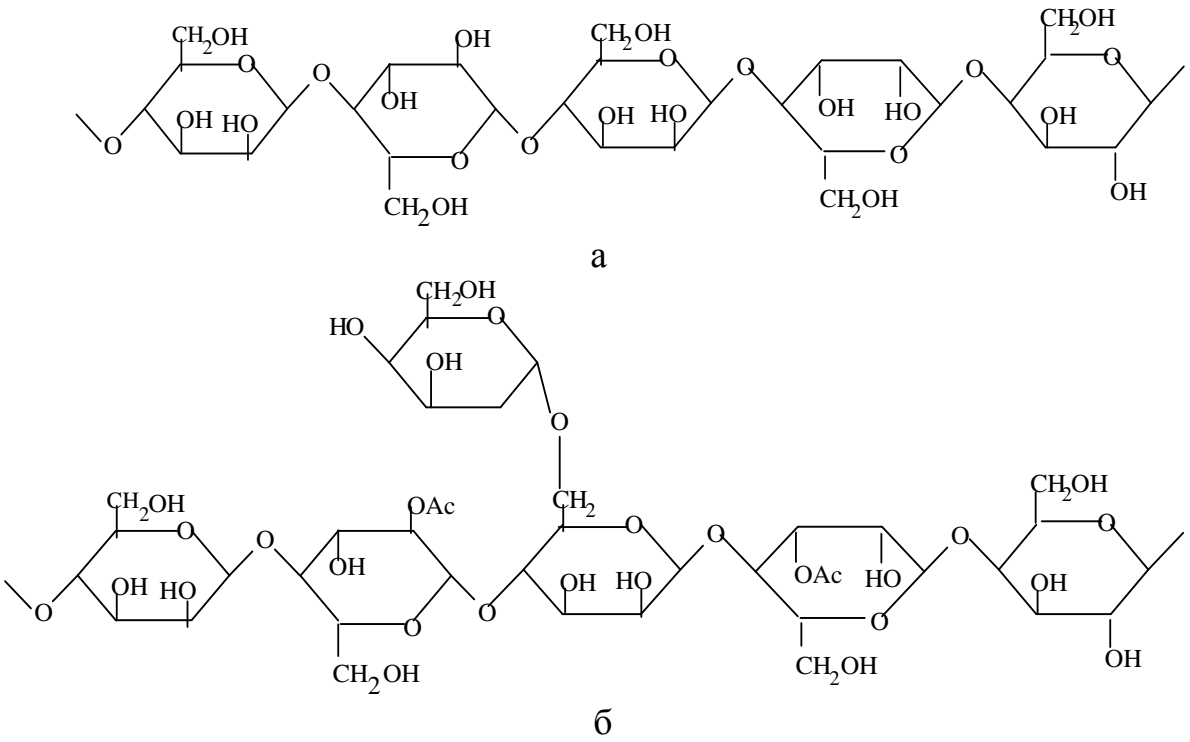


Рис 6.8. Глюкоманнаны и галактозоманнаны:
а – лиственной; б – хвойной древесины

Арабинаны, галактаны и арабиногаллактаны. Это весьма гетерогенная по структуре группа биополимеров, встречающихся в древесине как в виде спутников гемицеллюлаз (ксиланов и глюкоманнанов), так и в составе пектинов. Их содержание повышено в области сжатия и растяжения древесины, а в нормальных тканях большинства древесных пород невелико и находится в пределах 0,5–3%. Исключением является лиственница, из ядровой древесины которой выделены растворимые в воде арабиногалактаны с выходом от 5 до 40%. Средняя степень полимеризации арабиногалактана лиственных пород составляет от 200 до 400 остатков. Галактаны хвойных пород имеют степень полимеризации, близкую к 300.

Остальные полисахариды содержатся в древесине в малых количествах, и мы не будем останавливаться на их характеристиках.

Как видно из приведенных структур, гемицеллюлозы подвергаются гидролизу до соответствующих моно- и олигосахаридов теми же грибными ферментами, что и целлюлоза, но их гидролиз происходит существенно

быстрее. Столь подробное изложение свойств этих полисахаридов объясняется тем, что в настоящее время их фрагменты после обработки соответствующими ферментами обладают определенными адгезионными свойствами и могут, по-видимому, использоваться в бумажной и деревообрабатывающей промышленности в виде экологически чистых клеёв и связующих.

В последнее время различные «белые гнили» стали находить применение в бумажной и деревообрабатывающей промышленности для разрушения лигнинов. Как известно, в бумажной промышленности для извлечения лигнинов и пектинов из древесины, древесное сырье в измельченном виде подвергают сульфитной варке (обработке водным раствором гидросульфита, содержащего свободный диоксид серы) или сульфатной варке (обработке водным раствором NaOH и Na_2S) при повышенных температурах и давлении (крафт-процесс).

Путем такой обработки четырех различных пород древесины в различных условиях были получены целлюлозные материалы с различным содержанием лигнина, которые затем были подвергнуты действию серной кислоты для гидролиза веществ целлюлозной природы. Результаты этих экспериментов наглядно показали, что скорость гидролиза целлюлозы в первую очередь зависит от количества оставшегося лигнина. Для разрушения лигнина применяют и другие методы, в том числе обработку древесины газообразным SO_2, минеральными кислотами или методом парового взрыва. Суть последнего метода заключается в том, что сухую щепу древесины помещают в камеру взрыва и обрабатывают при давлении 6 МПа и температуре 200–260°C в течение 20–120 секунд острым паром в присутствии 0,2–0,4% H_2SO_4. Затем резко снижают давление до атмосферного давления. В результате в обработанном сырье образуется три фазы: гидрофобный лигнин всплывает на поверхность в виде шариков, гемицеллюлоза переходит в подкисленный раствор, а целлюлоза с некоторой примесью лигнина остается в нерастворимом состоянии в нижней фазе, которая может быть легко отделена, и затем использоваться для ферментативного гидролиза.

Этот метод нашел себе хорошее применение в сельском хозяйстве для повышения питательной ценности молодых лиственных пород, подсолнечной и рисовой лузги и пр. Так, усвоение измельченной березы в желудке крупного рогатого скота после парового взрыва возрастает с 5 до 60%, подсолнечной лузги с 45 до 75%.

Ряд ферментов из «белой гнили» нашел себе практическое применение для переработки бумажной пыли, образующейся в процессе резки рулонов технической бумаги. Бумажная пыль обрабатывалась культуральной жидкостью, полученной в результате биосинтеза базидомицетов «белой гнили», содержащих целлюлолитические и лигнин-разрушающие ферменты. Полученный гидролизат, содержащий сахара и

декстрины, использовался в дальнейшем для биосинтеза дрожжей или самих ферментов. Остаток, образовавшийся после отделения гидролизата, оказался прекрасной заменой свекловичного жома, необходимого для биосинтеза целлюлаз в качестве источника углерода.

Как показали последние исследования, «белая гниль» включает в себя значительное количество целлюлаз, гемицеллюлаз и оксидоредуктаз. Последние интенсивно участвуют в переработке лигноцеллюлозы и представлены сложной группой ферментов. Как уже отмечалось ранее, гемсодержащие пероксидазы – лигнин и/или марганец-зависимая пероксидаза, осуществляет расщепление С-α-С-β-связей в нефенольных лигниновых субстратах с помощью перекиси водорода. В зависимости от наличия или отсутствия редоксипереносчика одни и те же ферменты могут как деполимеризовать лигнин через расщепление его не фенольных структур, так и конденсировать образующиеся низкомолекулярные продукты с образованием псевдолигнинов.

Другие оксидоредуктазы – медьсодержащие оксидазы, являются ферментами лакказного типа, т.е. окисляют кислородом воздуха как фенольные, так и не фенольные структуры лигнина. Эти ферменты могут играть роль шунтирующего пути при деполимеризации лигнина, когда имеет место недостаток перекиси водорода для действия марганец – пероксидазы. Целлобиозо – хинон – оксидоредуктаза катализирует окисление целлобиозы хинонами, продуктами действия оксидаз.

Глюкозо-, целлобиозо- и целлодекстриноксидазы – флавиновые оксидазы, которые окисляют моно- и олигосахариды кислородом воздуха. Эти ферменты участвуют в важном сопряжённом процессе, образуя, с одной стороны, перекись – субстрат для важнейших лигнин разрушающих пероксидаз, а с другой – лактоны – мощные ингибиторы целлюлаз и целлобиазы. Они способны окислять также фенолы и многие хиноны. Глиоксальоксидаза образует перекись водорода из гликольальдегида – продукта деструкции нефенольной части лигнина лигнин- или марганец-пероксидазами.

Разложение лигнина грибами белой гнили является многоступенчатым окислительным процессом. В настоящее время показано, что в основе ферментативного связывания древесных волокон лежит образование стабильных феноксирадикалов в лигниновой матрице под действием лакказы. Окисление концевых гидроксильных групп лигнина древесины можно схематически описать следующим образом:

$$4\text{Phe} - \text{OH} + O_2 \xrightarrow{\text{лакказа}} 4\text{Phe} - \text{O}^{\cdot} + 2H_2O.$$

Подобный процесс, по мнению исследователей, приводит к увеличению площади поверхности волокон, повышению гидрофобности и

совместимости их поверхностей, уменьшению содержания целлюлозы и гемицеллюлозы, что в свою очередь ведёт к усилению взаимодействия, адгезии и ковалентному связыванию между древесными частицами. Это явление было использовано в дальнейшем для создания технологии получения пластиков и плит. Действительно, на основании вышеизложенных представлений в последние годы начались интенсивные исследования по получению экологически чистых древесностружечных (ДСП) и древесноволокнистых плит (ДВП) в отсутствии связующих, т.е. в отсутствии карбомидо- или фенольно-формальдегидных смол.

Как известно, традиционный технологический процесс получения этих плит включает в себя предварительную подготовку древесной стружки и последующее горячее прессование из неё брегетов с применением в качестве связующих древесных частиц вышеупомянутых смол. Затраты на смолы обычно составляют до 30% от себестоимости плит, но главный недостаток использования смол даже не их стоимость, а их токсичность, так как в процессе эксплуатации таких материалов смолы со временем разлагаются и в воздух попадают вредные для человека вещества – фенол и формальдегид. В связи с этим, биотехнологическая модификация древесины и получение с её помощью экологически «чистых» древесных конструкций с помощью ферментативной системы «белой гнили» становится особенно актуальной.

Для биотехнологического производства подобных плит обычно используют штаммы возбудителей белой гнили древесины, относящиеся к микроскопическим грибам – представителям рода *Panus, Pleurotis, Coriolus* и другим, содержащие целлюлазы, гемицеллюлаза и оксидо-редуктазы. Основное количество культуральной жидкости получают в ферментёрах ёмкостью от 100 до 1000 л, в которых в качестве источника углерода используют мелкоизмельчённые опилки (фракция опилок 1–2 мм). В процессе выращивания осуществляется постоянный барбатаж воздуха и поддерживается оптимальное для роста гриба значение pH, обычно в пределах 5,5–6,0. Обработка производится при комнатной температуре и не требует поддержания стерильных условий. Возможность многократного использования этой культуральной жидкости на стадии биообработки тонко измельчённых древесных частиц позволяет значительно сократить образование отходов и побочных продуктов производства. Немаловажно и то, что из последних можно получать ферменты, пищевой белок и растворимые сахаристые вещества, необходимые в сельском хозяйстве.

В настоящее время разработана технологическая схема получения такой «белой гнили», представленная на рис. 6.9.

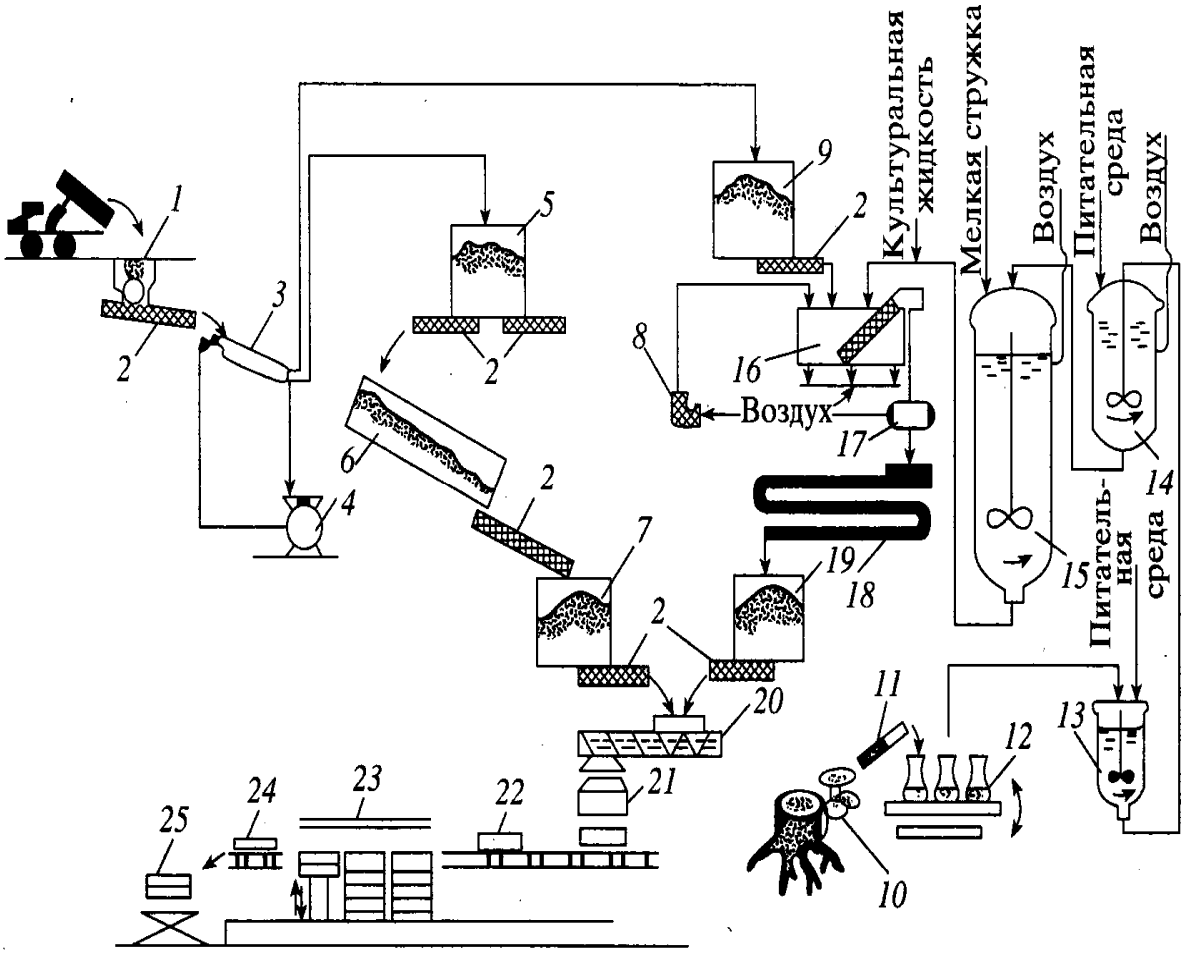


Рис. 6.9. Схема производства ДСП биотехнологическим методом

Производство древесно-стружечных плит (ДСП) с использованием ферментов можно разделить на три основных этапа:

– получение древесных частиц;
– биотехнологический этап, включающий получение культуральной жидкости смеси грибов, входящих в состав «белой гнили», глубинным культивированием с последующей биотрансформацией древесной массы;
– технологические операции получения самих древесных плит.

На участке получения древесных частиц отходы лесопиления и деревообработки (щепа, опилки, стружки) загружают в приёмный бункер *1*, откуда винтовым конвейером *2* подают на сортировочную машину *3*, где производится разделение древесных частиц на три фракции: мелкие частицы, предназначенные для обработки культуральной жидкостью, направляют в бункер мелкой влажной сушки *9*, крупные кондиционные частицы поступают в бункер влажной кондиционной стружки *5*, а некондиционные частицы – после доизмельчения в стружечном станке *4* – возвращаются на ситовую сортировку *3*.

Биотехнологическая часть предобработки древесных частиц осуществляется следующим образом. Гриб, выделенный из гниющей древесины *10*, хранится в пробирке *11* в виде чистой культуры. Наращивание биомассы гриба в питательной среде происходит в несколько стадий: сначала в лабораторных условиях – в колбах на качалках *12* и небольших ферментаторах – инокуляторах *13*, затем в посевном аппарате *14*, где биомасса гриба увеличивается в среднем на порядок, и наконец, в промышленном ферментёре *15*.

Культуральная жидкость, содержащая мицелий гриба и активный ферментативный комплекс, а также остатки древесных частиц, служивших источником углерода при росте гриба, поступают в установку биоферментации *16*. Процесс биообработки проводится в течение нескольких суток при температуре 28 – 30°С. После окончания процесса биотрансформации древесины биомассу отжимают на центрифуге *17*, сушат в пневматической сушилке *18* и собирают в бункер-дозатор *19*, а водную пульпу насосом *8* подают для повторного использования в установку *16*.

На участке изготовления плит влажную кондиционную стружку из бункера *5* по конвейеру *2* подают через сушилку *6* в бункер-накопитель кондиционной стружки с влажностью 8–12% *7*. Отсюда стружка поступает в смеситель *20* вместе с биообработанной стружкой из бункера *19* в соотношении 1:1. После смешения древесную массу направляют в формующую машину *21*, из которой готовая смесь равномерно насыпается на стальные поддоны. Поддоны со сформированным на них пакетом *22* подаются в гидравлический пресс *23*, в котором под давлением 2,5 – 3,5 МПа и при температуре 170 – 190°С идёт изготовление ДСП. Из пресса плиты *24* – после обрезки до заданного формата – штабилируют на посту *25*.

Обычно при таком способе получения ДСП не требуется охлаждения плит пресса; продолжительность прессования составляет, как правило, не более 1 мин на 1 мм толщины. Плиты, полученные биотехнологическим способом, имели прочность при статическом изгибе 15–40 МПа, их разбухание после 24 ч выдержки в воде составляло 10–25%. Результаты санитарно-гигиенической оценки показали, что плиты не выделяют вредных веществ в атмосферу и могут быть отнесены к классу экологически чистых материалов. С учётом всех характеристик такие плиты без ограничений могут использоваться в строительстве и производстве мебели.

Таким образом, использование биотехнологии для направленной микробиологической деструкции древесных отходов, открывает новый путь к созданию экологически чистых материалов. Биотехнологические подходы позволяют использовать внутренние связывающие свойства полимеров, что устраняет главный недостаток традиционных технологий

получения древесных строительных плит – использование токсичных для человека синтетических смол и отвердителей, а также энергоёмких воздействий.

6.9. Применение ферментных смесей, пектиновых ферментов и ферментов для электродов и генной инженерии

Мы уже не раз останавливались на том, что во многих случаях целесообразно использовать не индивидуальные ферменты, а их смеси. Таким примером является использование «мягкой и белой гнилей» для переработки древесины, α- и β-амилазы для переработки крахмала, экстракты поджелудочной железы, представляющие собой смесь протеаз, пептидаз, амилаз и липазы и др. Такое использование смесей ферментов позволяет существенно повысить выход целевого продукта, а иногда только с помощью таких смесей и можно успешно провести процесс ферментативной трансформации субстрата. Практически большинство добавок к моющем средствам также использует смеси ферментов: бактериальных протеаз, липаз и амилаз.

Окисление галактозы до галактуроновой кислоты с последующей поликонденсацией приводит к образованию полигалактуроновых кислот. Последние являются основным структурным элементом ряда природных материалов растительного происхождения, называемых *пектинами.* В пектинах карбоксильные группы часто этерифицированы до карбометоксильных. *Фермент пектинметилэстераза (пектинэстераза, гидролизующая пектаза)* гидролизует карбометоксильные группы, а *полигалактуроназа (пектиназа, пектолаза)* расщепляет гликозидные связи в пектинах. Основными источниками ферментов первого типа служат фрукты, а ферменты второго типа получают также, как и целлюлазы, из грибов различного рода.

Пектиновые ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности. Так, например, при обработке льна в текстильной промышленности. Обычный процесс замачивания льна весьма примитивен и трудоёмок и направлен, главным образом, на гидролиз пектиновых веществ, происходящий за счёт собственных микроорганизмов, развивающихся на стеблях льна. В настоящее время этот процесс существенно ускорен при помощи пектиновых ферментов. Ещё одним примером использование пектиназ совместно с целлюлазами и амилазами является сельскохозяйственное производство кормов. В настоящее время доказано, что добавление смесей вышеуказанных ферментов обеспечивает гидролиз полисахаридов при силосовании трудно- или вообще несилосующихся зеленых кормов и существенно улучшает их качество и усвояемость.

Пожалуй, одной из отраслей промышленности, которая наиболее широко использует пектиназы, является пищевая промышленность. Пектиновые ферменты применяются в двух отраслях пищевой промышленности – в производстве соков и в виноделии. После первичной переработки фруктов и овощей получаются очень вязкие соки, что вполне приемлемо для соков из томатов и цитрусовых, но часто нежелательно для яблочного и других соков. Путем контролируемого частичного гидролиза пектинов удаётся получить продукт с необходимой текучестью, но в то же время достаточно вязкий, чтобы не происходило осаждение нерастворимых веществ. В производстве яблочного сока применяют более глубокий гидролиз пектинов, благодаря чему облегчается последующее фильтрование, обеспечивающее необходимую прозрачность сока. Если в дальнейшем предполагается использовать соки в производстве желеобразных продуктов, то их обрабатывают только пектин-эстеразой. Образующиеся полигалактуроновые кислоты затем желатинизируют ионами кальция.

Другой важной областью применения пектиновых ферментов является виноделие. Добавление смеси пектиновых ферментов к раздавленному винограду приводит к повышению выхода сока, более эффективному экстрагированию красящих веществ из кожуры, а также ускоряет процессы фильтрования и отжима.

Обработка пектиновыми ферментами уже перебродившего виноградного сока также даёт положительный эффект, связанный с ускорением процесса отделения вина от дрожжей и осадка, повышением его прозрачности и стабильности, в основном за счёт снижения концентрации суспендированных белков в готовом вине. Таким образом, как в первой, так и во второй области применения пектиновых ферментов в пищевой промышленности они способствуют главным образом достижению необходимой вязкости и фильтруемости полупродуктов, что положительно сказывается на экономичности процессов и на внешнем виде готовой продукции. В будущем, возможно, пектиновые ферменты будут применяться и для обработки древесины хвойных пород. Свежесрубленная древесина таких пород, как некоторые виды ели, трудно поддаётся пропитке химическими консервантами. Как оказалось, предварительная обработка пектиназами улучшает проницаемость древесины и повышает, таким образом, эффективность химической пропитки. В последнее время уже разработаны или находятся в состоянии разработки и многие другие процессы с использованием гидролаз, приведенные в табл. 6.3.

Особое место занимают высокоочищенные ферменты. Они широко применяются в научно-исследовательских работах общебиологического и медицинского профиля. Эти ферменты необходимы в работах по молекулярной и физико-химической биологии.

Таблица 6.3

Перспективные или находящиеся в стадии разработки области применения гидролаз

Фермент	Процесс
Пенициллинацилаза	Получение исходного сырья для производства полусинтетических пенициллинов из бензилпенициллина и его производных
Лактаза	Гидролиз лактозы, содержащейся в молоке, сыворотке
Рибонуклеаза	Получение 5’-нуклеотидов из РНК
Декстраназа	Удаление зубных бляшек
Изоамилаза	Производство мальтозы из крахмала
Кератиназа	Обработка шерсти, щетины, кожи
Танназа	Деструкция дубильных веществ в пищевых продуктах

Например, для выяснения первичной структуры белков широко применяются высокоочищенный трипсин и α-химотрипсин, а также амино- и карбоксипептидазы. Для конструирования новых генов, продуцирующих физиологически активные соединения, например, таких как инсулин, необходимый для лечения диабета, выделены эндонуклеазы (рестриктазы), обладающие уникальной специфичностью относительно небольших участков (сайтов) в молекуле ДНК. Расщепление этой молекулы позволяет, как это будет видно дальше, заменить одни сайты на другие, кодирующие последовательность аминокислот в интересующем нас белке и обеспечивающим его синтез, т.е. получать рекомбинантные молекулы ДНК. Благодаря своей специфичности высокоочищенные ферменты обеспечивают большую точность анализа, чем химические методы при их использовании как реагентов для количественного определения некоторых субстратов. Наиболее широко используются: глюкозооксидаза для количественного определения глюкозы, пируваткиназа для анализа глицерина и некоторых фосфорсодержащих метаболитов, глутаматдекарбоксилаза для анализа глутаминовой кислоты и др. соединений. Как правило, эти ферменты иммобилизуют на полупроницаемые мембраны и конструируют на их основе ферментные электроды, позволяющие совмещать электрохимические и биохимические процессы и тем самым контролировать содержание вышеназванных веществ как в крови, моче, так и в культуральных жидкостях, где продуцируются эти соединения различными микроорганизмами.

Основное преимущество таких методов анализа заключается в том, что анализируемое вещество может находиться в смеси с другими веществами. Например, для анализа содержания мочевины используют ферментные электроды с иммобилизованной уреазой, для определения мочевой кислоты – фермент урокиназу, фосфолипидов – фосфолипазу D, ацетилхолина – холиноксидазу, перекиси водорода – пероксидазу. Схема подобного электрода для определения содержания мочевины приведена на рис. 6.10.

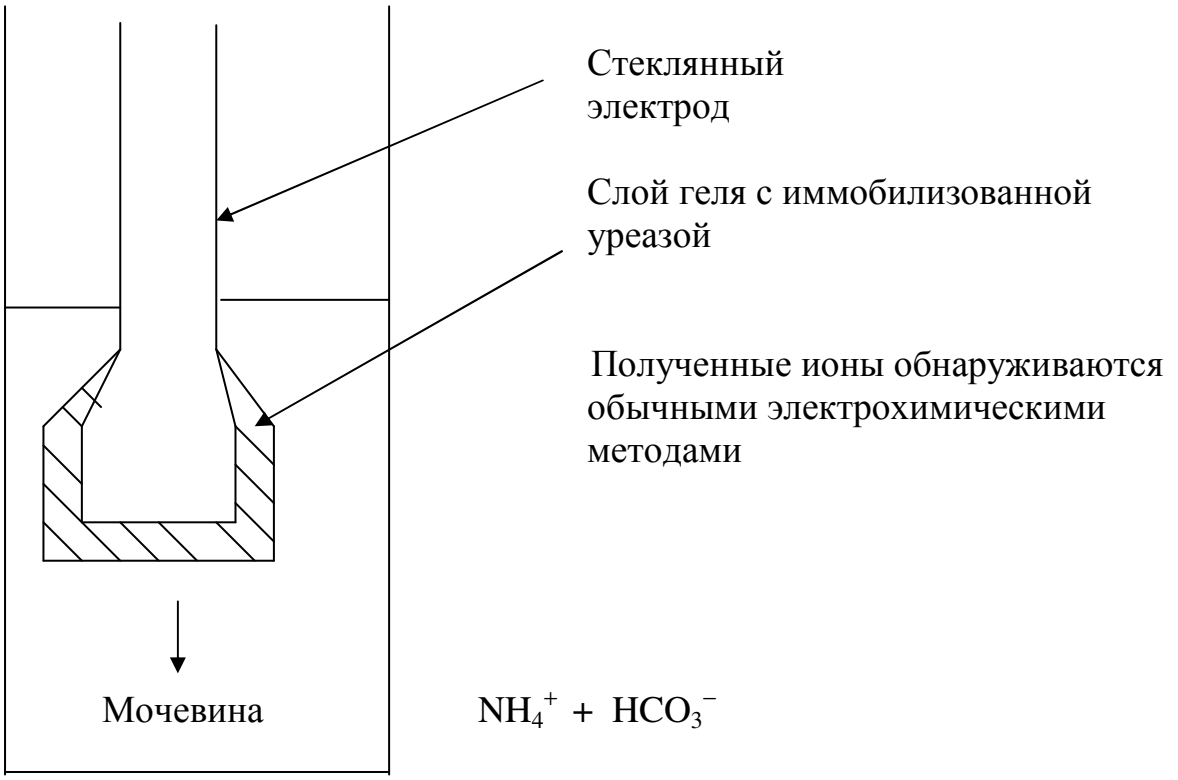


Рис 6.10. Электрод для определения мочевины; в этом электроде уреаза иммобилизована в геле, нанесенном на поверхность стеклянного электрода

При иммобилизации вместо ферментов дрожжевых клеток, содержащих кофакторы ферментов, можно создать ферментные электроды для определения этанола или ацетальдегида в смесях по нижеследующим схемам (рис. 6.11):

$$\text{Этанол} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{алкогольдегидрогеназа}} \text{Ацетальдегид} + \text{NADH} + H^+,$$

$$\text{Ацетальдегид} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{альдегиддегидрогеназа}} \text{Ацетат} + \text{NADH} + H^+$$

Рис. 6.11. Схема определения содержания алкоголя при помощи иммобилизованных дрожжевых клеток, содержащих два фермента: алкогольдегидрогеназу и альдегиддегидрогеназу

При иммобилизации дрожжевых клеток, содержащих фермент и кофактор – NAD, подобный ферментный электрод может эффективно работать в течение продолжительного времени. К сожалению, концентрации спирта в определяемой среде не могут быть слишком большими (не более 10%), так как иначе начнётся ингибирование фермента субстратом (этанолом).

В случае необходимости клинического анализа, требующего высокой степени чистоты, можно отдельно иммобилизовать фермент и кофактор. В этом случае мы получим аналогичный эффект.

Глава 7

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

В соответствии с названием экологическая химия – это наука о химических процессах и взаимодействиях в окружающей нас среде (экосфере), а также о последствиях таких взаимодействий. Некоторые разделы химии, имеющие отношение к экосфере, рассматриваются в науках, связанных с геологией, биологией, сельским хозяйством, а также с биохимией и фармакологией. Поэтому в задачу экологической химии входит изучение таких разделов, которые не рассматриваются в курсах перечисленных дисциплин. Тем самым экологическая химия сближается с экологией, решающей проблемы, выходящие за рамки собственно биологических и геологических наук. В отличие от экологической химии химическая экология ограничивается изучением природных материалов (аллелохимикатов), применением материалов только в природных условиях, исследованием обменных процессов и механизмов регулирования в организмах (разложение и распространение аллелохимикатов за границы региона применения не относится к тематике химической экологии). В экологической химии наряду с биологическими, применяют также химические методы, например, для выделения и идентификации активно действующих веществ.

Развитие современной промышленности и сферы услуг, а также расширяющееся использование биосферы и ее ресурсов, приводит к возрастающему вмешательству человека в материальные процессы, протекающие на планете. Связанные с этим планируемые и осознанные изменения материального состава (качества) окружающей среды направлены на улучшение условий жизни человека в техническом и социально-экономическом аспектах. В последние десятилетия в процессе развития технологии была оставлена без внимания опасность непреднамеренных побочных воздействий на человека, живую и

неживую природу. Это можно, пожалуй, объяснить тем, что ранее считали, что природа обладает неограниченной способностью компенсировать воздействие человека, хотя уже столетия известны необратимые изменения окружающей среды, например вырубки лесов с последующей эрозией почвы. Сегодня нельзя исключать непредвиденные воздействия на легко ранимые области экосферы в результате активной деятельности человека. Оказалось, что не существует научной дисциплины, которая была бы способна выработать основы классификации химических веществ и исследования антропогенных воздействий на биосферу.

Исследованием влияния антропогенных химических веществ на биологические объекты окружающей среды занимается *экотоксикология.* Задачей экотоксикологии является изучение воздействия химических факторов на виды, живые сообщества, абиотические составляющие экосистем и на их функции. В принципе она отличается от *токсикологии* тем, что в ней не рассматриваются вопросы отравления конкретного организма. Влияние на человека происходит косвенно через ухудшение жизненных условий из-за вредных воздействий на окружающую среду.

Токсикологические и экотоксикологические свойства веществ обусловлены их химическим составом, так что в изолированном состоянии они не имеют никакого значения для человека и природы. После длительной экспозиции, т. е. длительного воздействия на человека, эти свойства начинают проявляться. Это означает, что эколого-химическое поведение веществ, методы их применения и объемы поступления в биосферу определяют в конечном итоге уровень экспозиции. Последний в комплексе с экотоксикологическими свойствами вещества является основой для оценки воздействия вещества на окружающую среду.

Для объективной оценки влияния химических продуктов на окружающую среду было бы желательно иметь абсолютную шкалу измерения качества окружающей среды. Однако поскольку не все факторы, влияющие на состояние окружающей среды, можно измерить количественно, а также, поскольку неизвестно оптимальное состояние окружающей среды для человека, в настоящее время проводятся оценки только изменений ее состояния относительно некоторой исходной ситуации.

Оптимальным решением было бы изучение всех химических продуктов в отдельности, определение их содержания и поведения в окружающей среде, исследование биологических последствий их воздействия. Пожалуй, лишь для выяснения синергетического и антагонистического эффектов следовало бы изучить некоторые смеси веществ. Однако из-за большого числа загрязняющих химических соединений этот путь невозможен, и поэтому в зависимости от постановки

задачи следует искать другие пути. Для этого можно объединить ряд веществ по некоторым общим критериям и изучать суммарные последствия их воздействия, либо детально исследовать модельные химические продукты с известным нежелательным воздействием на окружающую среду:

Исследование многих химических продуктов можно использовать для выявления взаимодействий и для прогноза поведения других аналогичных по своему строению веществ. Так как на основании структуры и физико-химических свойств вещества можно лишь немногое сказать о его поведении в окружающей среде, необходимо экспериментально исследовать некоторые наиболее важные особенности этого вещества.

Для развития теоретических основ и экспериментальных методов очень важно выяснить длительность воздействия химических продуктов на окружающую среду. Только надежная методология прогноза их поведения может обеспечить разработку действенной стратегии защиты окружающей среды и исключение в будущем неожиданных экологических катастроф или необратимых нарушений экосферы.

Имеющиеся в настоящее время аналитические методы и приборы позволяют выявить локальные концентрации химических веществ, попадающих в окружающую среду, и предпринять необходимые меры для снижения их содержания, а в отдельных случаях и для полного их исключения. Это используется на современных предприятиях, осуществляющих крупнотоннажное производство. Наличие постоянного технического контроля за выбросами в атмосферу таких предприятий должно быть составной частью технологии в целом.

Напротив, в глобальном масштабе загрязнения вредными веществами, если и могут быть снижены, то только с большими затратами и до некоторого порога безопасности. Поэтому при внедрении прогрессивной технологии или технологического процесса необходимо предусматривать применение таких химических материалов и продуктов, глобальное накопление которых не может привести к вредным последствиям для всей экосферы, частью которой является и человек. Задачей экологической химии как раз является выработка критериев для такого отбора химических веществ. Естественно, необходим постоянный мониторинг за состоянием окружающей среды.

Эти трудности усугублены тем, что химические продукты часто выпускаются в продажу в виде сложных смесей, причем продукт одной фирмы часто является исходным сырьем для получения продуктов другой фирмой, так что фирме-изготовителю часто неизвестно, какие вещества будут получены из произведенного ею продукта. В процессе производства и промышленного применения такие вещества находятся под контролем, и на предприятиях соблюдаются промышленно-санитарные нормы и правила. Однако использование их потребителями часто не поддается контролю или какому-либо регламентированию.

Такая ситуация требует постановки следующих вопросов: существуют ли системы и общепринятые принципы прогнозирования свойств химических продуктов, оказывающих вредное воздействие на экосферу, с тем, чтобы можно было заблаговременно предпринять необходимые защитные меры? Какими безвредными для окружающей среды продуктами их можно заменить? Только установление таких зависимостей и разработка методов, способных прогнозировать поведение химических продуктов в окружающей среде, позволяют своевременно принять соответствующие меры. Знание этих взаимосвязей с глобальной точки зрения является необходимой предпосылкой для разработки технологических процессов, экологически безвредных для данного региона (экотехнология).

7.1. Определение основных понятий

Несвойственные окружающей среде (посторонние) химические продукты – это химические вещества, поступающие в природную среду в результате деятельности человека, в отдельных случаях достигающие таких концентраций, которые оказываются вредными для абиотических составляющих экосистем, для живых существ и особенно для самого человека. К таким продуктам относятся химические элементы, неорганические и органические соединения – синтетические или природного происхождения.

Деятельность человека может осуществляться непосредственно или опосредованно, она может быть целенаправленной или непреднамеренной. Понятие «живые существа» объединяет в нашем изложении человека и весь окружающий его живой мир – животных, растения и микроорганизмы. Вредное воздействие химических продуктов в окружающей среде может иметь острый и хронический характер и проявляться после накопления этих веществ или их химических превращений, а также в результате синергических процессов (законодательство дает более узкое определение посторонних для окружающей среды химических продуктов).

Загрязняющие химические продукты классифицируют по источникам поступления, областям применения и характеру воздействия; вопросы такой классификации будут подробно рассмотрены позднее. Здесь можно, пожалуй, назвать несколько таких групп. Биоциды (например, инсектициды, гербициды, фунгициды) являются значимыми для окружающей среды химическими продуктами, поскольку длительное время применяются в окружающей среде, а по своему назначению их действие направлено против живых существ. Добавки к пищевым продуктам и косметическим средствам имеют также большое значение, поскольку они непосредственно используются человеком. Группы химических продуктов – удобрения, моющие средства и хлорированные

растворители (химчистка) – также важны, поскольку они широко потребляются и в больших количествах.

Другим типом классификации химических продуктов является деление их на природные и несвойственные окружающей среде вещества (*ксенобиотики*). Ксенобиотиками называют вещества, по своей структуре и биологическим свойствам чуждые биосфере и полученные исключительно в результате химического синтеза. Степень «несвойственности» таких химических веществ в природе различна, так как по своей структуре они могут быть совсем близкими к природным веществам или полностью отличаться от них (например, идентичные природным ароматические вещества, выпускаемые промышленностью; близкие к природным инсектициды – синтетические пиретроиды, в противоположность соединениям с новой структурой, созданной человеком). Эти качественные показатели *a priori* не характеризуют вредность этих веществ.

Особую группу химических продуктов составляют радиоактивные вещества. Это химические элементы или их соединения – источники ионизирующего излучения, которое возникает при их распаде и оказывает сильное биологическое действие. В этом случае биологическое воздействие на окружающую среду вызвано не химическими или биологическими свойствами этих веществ, а их излучением.

Доза излучения измеряется в единицах, соответствующих биологическому действию излучения, в бэрах (биологических эквивалентах рентгена, 1 бэр = 0,01 Дж/кг). Для химического воздействия такой единицы измерения не существует.

Воздействие излучения не специфично для состава излучающего вещества, являющегося объектом облучения, а зависит лишь от вида излучения и его энергии. Для оценки радиоактивных веществ в окружающей среде следует учитывать характер их распределения в окружающей среде и организмах, так как это распределение коррелирует с поглощенной дозой излучения, а характер распределения радиоактивных веществ зависит от их природы.

В результате испытаний ядерного оружия, при которых в окружающую среду поступило большое количество радиоактивных веществ и повысилась доза поглощенного излучения, проведены подробные исследования воздействия излучения на экосферу. Полученные при этом результаты, включая разработку национальных и международных правил и соглашений о предельных значениях параметров излучения, могут служить примером для организации аналогичных работ по проблемам воздействия химических продуктов на окружающую среду.

На основе эпидемиологических исследований и многочисленных экспериментов с животными очевидно, что многие химические вещества сопряжены с высокой степенью риска для здоровья человека и могут

нанести непоправимый вред живым организмам, если их концентрация в окружающей среде будет возрастать. К таким химическим продуктам относятся различные тяжелые металлы, асбест, полициклические углеводороды и нитрозоамины. Для многих химических веществ не имеется достаточных экспериментальных данных об эффектах их длительного воздействия на организм, что не позволяет сделать никаких выводов о степени потенциального риска при их использовании.

Ориентировочно, в настоящее время во всем мире производится около 80 тысяч видов химических продуктов. В ФРГ – около 40 тысяч продуктов. Каждый год на рынок поступает еще более тысячи новых соединений. Однако лишь немногие из них действительно обновляют перечень продукции, так что доля фактического изменения номенклатуры продуктов составляет несколько процентов в год.

Кроме того, если учесть, что во всем мире используется около 250 млн. т органических химических продуктов, значительная часть которых после использования бесконтрольно попадает в окружающую среду, то становится очевидным, что данные продукты сами по себе могут изменить материальный состав окружающей среды во всем мире.

Под понятием *материальный состав окружающей среды* понимается химический состав окружающей среды, т. е. материальный состав биосферы (литосферы, гидросферы и атмосферы с находящимися на них живыми существами). Материальный состав окружающей среды в принципе устанавливается аналитическими методами. Понятие качество материального состава окружающей среды включает также и оценку этой среды, т. е. принимается во внимание непосредственное состояние экосистемы – воды, воздуха и почвы, а также продуктов питания и жилья человека.

Значение состава окружающей среды для человека определяется различным объемом суточного потребления – в среднем около 10 кг воздуха, двух литров воды и 1 кг твердых продуктов питания. Естественно, что изменения материального состава, изменения концентрации веществ в этих средах, а также изменения их возможного биологического использования приводят к изменению качества окружающей среды. Следует учитывать также влияние изменений в соответствующих средах на *биологическое использование* этих веществ. Под биологическим использованием понимают количество вещества, поступившее в организм за какое-то время и участвующее в обмене веществ. Пути проникновения вещества в организм (через кожу, органы дыхания или пищеварительный тракт) соответствуют различным возможностям его биологического использования.

7.2. Различные концепции и их обоснование

Различные точки зрения на систематизацию проблем загрязнения

окружающей среды привели к различным подходам к классификации химических продуктов и вредных веществ.

Для разработки мероприятий по защите окружающей среды от сомнительных в экологическом отношении веществ, а также для оценки качества окружающей среды исследования проводятся в определенном порядке. Подробно изучается первично загрязненная природная *среда – переносчик вещества.* В качестве примеров можно назвать исследование *реакционноспособных углеводородов* в воздухе, *органических соединений, разлагающихся в воде (биологическое потребление кислорода)* или *веществ, загрязняющих питьевую воду.* Затем изучается (преимущественно классическими аналитическими методами) загрязнение природных *сред экосферы* – воды, почвы, воздуха, а также живых организмов. Преимущество такого подхода, который обеспечивает получение данных о загрязнениях или способности природной среды к их компенсации на основе ограниченного количества экспериментов, состоит в возможности определения предельных значений допустимой эмиссии веществ.

При оценке результатов исследований различных природных сред необходимо учитывать разное техническое состояние имеющихся в нашем распоряжении приборов для анализа различных химических продуктов. Для многих групп веществ и материалов методы количественного анализа недостаточно чувствительны и надежны. Кроме того, имеются вещества, например хлорированные углеводороды, методы определения которых на несколько порядков более чувствительны, чем пороговая доза любого известного химического вещества при его воздействии на биологические объекты. Но даже такие следовые концентрации, не оказывающие воздействия на живые организмы, с химической точки зрения следует рассматривать как загрязнение посторонними веществами. Однако недопустимо на основании данных об их присутствии в малых количествах делать вывод о вредном их воздействии, что часто приводит к безответственным и искажающим фактическое положение дел заявлениям в прессе, рассчитанным на неподготовленного читателя.

Исследования, ориентированные только на изучение природной среды, усложняются тем, что природные среды вносят различный вклад в состояние биосферы. Так, до последнего времени, например, не проводились исследования загрязнений почвы за исключением ее загрязнения химическими продуктами, используемым в сельском хозяйстве. Кроме того, обменные процессы на границах раздела сред, оказывающие существенное влияние на долгосрочные изменения качества окружающей среды, при таком подходе учитываются крайне односторонне. Например, рассматривая проблему чистоты воздуха, следует помнить, что на всем земном шаре через границу воздух – вода океана связывается около 50% всего антропогенного CO. Возможное изменение материального состава океана за счет такого дополнительного поглощения углекислого газа следует рассматривать

отдельно – уже с точки зрения качества гидросферы.

Наряду с концепциями исследования среды распространения вредных веществ, комплексное изучение химических продуктов должно включать рассмотрение технологии их производства в различных отраслях промышленности. При этом польза от применения различных видов химических продуктов (например, инсектицидов в сельском хозяйстве, добавок к пищевым продуктам, отбеливателей в моющих средствах) обязательно должна сопоставляться с риском, связанным с их производством и применением.

При разработке технологии производства химического продукта до настоящего времени не проводилось исследований возможного загрязнения окружающей среды этим продуктом. К тому же следует учитывать, что один и тот же продукт может применяться для различных целей, что приводит к появлениям нескольких источников изменения материального состава окружающей среды при производстве одного и того же продукта. Так, например, одни и те же отбеливатели используются не только в моющих средствах, но и при изготовлении бумаги. Полихлорированные бифенилы используются как пластификаторы различного назначения, а также в качестве диэлектрика в конденсаторах и трансформаторах и негорючих теплоносителей в радиаторах отопления. Критерий *области применения* в экологической химии классифицирует данное химическое вещество по всем видам его применения.

Необходимо установление зависимости экологических свойств вещества от его структуры. Прогноз нежелательных эффектов воздействия вещества на основании его структурных признаков в настоящее время возможен только для немногих групп веществ, – в частности для нитрозаминов и реакционноспособных углеводородов.

В концепции *изучения отдельного вещества* основное внимание уделяется изучению не только его полезных свойств, но и его поведению при воздействии на окружающую среду. При этом исследуется его предполагаемая или реально создаваемая концентрация, а также ее воздействие на материальный состав окружающей среды. Такой подход возможен и необходим только в отношении отдельного вещества или товарного продукта, состав которого можно считать известным. Важно знать перед применением основные составляющие товарного продукта, а также загрязняющие компоненты (в концентрациях до млн$^{-1}$), так как они могут влиять на материальный состав окружающей среды. Побочные продукты, содержащиеся в товарном продукте, очень важны для определения области его применения.

При методологии исследований, ориентированных на вещество, необходимо составление долгосрочного баланса распределения в окружающей среде применяемых химикатов. В этом балансе учитывается их количество, области применения, перенос вещества в средах и между

ними, способность химического продукта к разложению, а также его накопление. На основе такого баланса выявляется емкость окружающей среды, т. е. способность разложения (удаления) химиката, что позволит прогнозировать на длительный срок возможные изменения материального состава окружающей среды.

Подобным же образом, экотоксикологическое исследование направлено на количественную оценку потенциальных воздействий на видовой состав, плотность популяции и сообществ живых организмов в экосфере.

7.3. Направления исследований

В соответствии с современным уровнем знаний основная задача экологической химии состоит в исследовании взаимоотношений между химическими продуктами, живыми и неживыми составляющими экосферы:

- выявление загрязнения окружающей среды;
- снижение загрязнения окружающей среды и изучение возможных последствий этого.

При исследовании загрязнений окружающей среды, следуя медицинской терминологии, также пользуются термином *экодиагноз.* Можно выделить этапы исследований:

- содержание химиката в окружающей среде и объем производства;
- области применения;
- распространение в окружающей среде;
- поступление и накопление в окружающей среде;
- экотоксичность и токсичность;
- устойчивость и способность к разложению;
- реакции дальнейших превращений.

Объем производства и содержание химического продукта в окружающей среде – основные аргументы для определения методологии и объема первоочередных исследований. Знание областей и методов применения химического продукта позволяет оценить характер и направление его распространения в окружающей среде. Нет никакого сомнения в том, что все распроданные химические продукты в конечном итоге оказываются в окружающей среде. В отношении «распространения в окружающей среде» и «поступления и накопления в окружающей среде» важна подвижность (мобильность) химического продукта в окружающей

среде. Этап «снижение загрязнений окружающей среды и последствия», пользуясь медицинской терминологией, можно назвать *экопрофилактикой* и *экотерапией* (или *экосальватологией).* Этот этап содержит следующие разделы:

– снижение вредных выделений в процессе производства;
– снижение техногенных загрязнений;
– улучшение методов применения;
– замена нежелательных химических продуктов на продукты, экологически совместимые с окружающей средой;
– улучшение переработки отходов производства;
– улучшение почв на основе специальных мероприятий (физико-химических или биологических).

7.4. Практические основы экологической химии

Всестороннее изучение материального состава окружающей среды является задачей, которую решают многочисленные научные дисциплины, – естественные науки, геологические, сельскохозяйственные и медицинские. Ниже сопоставляются природные процессы, происходящие в экосфере, и ее изменения, связанные с деятельностью человека, а также вкратце обрисованы возможности и границы антропогенного влияния на материальный состав окружающей среды.

Для изучения и оценки изменений материального состава окружающей среды предлагается несколько параллельных схем:

– сопоставление изменений, связанных с чисто природными процессами (биогеохимия, химическая экология) и с деятельностью человека;

– выяснение временного масштаба изменений: быстрые (краткосрочные) или очень медленные (порядка геологических периодов).

Понятия *краткосрочные* или *долгосрочные* относительны. Для естественных процессов эволюции изменения в течение нескольких тысячелетий можно было бы назвать краткосрочными, в то же время антропогенные изменения в течение десятилетий можно считать долгосрочными.

– пространственное распространение изменений содержания веществ – локальное, региональное, глобальное; так как экосистемы открыты, большие *локальные* изменения в *долгосрочном* плане приводят к *региональным* изменениям;

– классическая классификация по изменениям качества сред экосферы.

7.5. Изменения во времени

Естественные (природные) изменения. Изменения геохимических, геофизических и метеорологических параметров за геологические периоды времени, эволюция живых организмов, обитающих в воде и на суше, а также изменения гомогенности биосферы в климатическом, химическом и биологическом отношении характеризуют качественный и количественный масштаб не антропогенных долгосрочных изменений на земле.

В соответствии с законами термодинамики вся вселенная стремится к состоянию с большей разупорядоченностью, а установление состояния с большим порядком (меньшей термодинамической вероятностью) связано с затратами энергии. Для земли с большой степенью вероятности принимается непрерывное увеличение энтропии. В соответствии с физико-химическими свойствами элементов для нашей планеты этот процесс идет постепенно, а поступление солнечной энергии еще в большей степени замедляет этот процесс.

Геохимические и геофизические процессы, которые на протяжении всей геологической истории планеты привели ее к современному химическому, биологическому и энергетическому состоянию, включают в себя как упорядочивающие процессы, связанные с затратой энергии, так и диссипативные процессы, сопровождающиеся ее выделением.

Землетрясения за короткий промежуток времени изменяют картину окружающего мира. Хотя причины их возникновения не полностью изучены, их можно было бы объяснить химическими реакциями, протекающими при нагревании и повышении давления в горных породах, а именно при выделении гидратной воды определенными минералами, а также возникающими при этом изменениями упругости при фазовых переходах, вызванных изменениями температуры и давления.

Вулканическая деятельность внесла большой вклад в многообразие геологических формаций и гетерогенность земной коры в ходе геологической истории земного шара. С высокой степенью вероятности можно полагать, что большая часть океанической воды и газов атмосферы появилась в результате вулканических извержений. Типичные вулканические газы содержат (по объему) 79% водяного пара, 12% $C0_2$, 7% $S0_2$, 1% N_2 и 1% в сумме CO, H_2S, HC1, CH_4 и Ar.

В результате этих длительных изменений земной коры сформировалась весьма разнообразная по своему составу твердая оболочка земли. Из-за различия в составе первичных геологических пород, влияния времени и воздействия климатических факторов стали возможными *локальные колебания концентрации отдельных* элементов на три и более порядка.

Выветривание, эрозия и *осадочные процессы* в течение по крайней

мере миллиарда лет определялись также *периодическими изменениями климата.* Особенно большое влияние оказывали в последние 250 млн. лет ледниковые периоды с промежуточными теплыми и влажными периодами, а следовательно, изменяющимися условиями протекания химических реакций.

Хотя вода в современных океанах медленно перемешивается (например, на большой глубине коэффициент вертикального перемешивания составляет около 10 $см^2/с$) и поэтому океаны значительно гомогеннее, чем твердая земная кора, вода в различных частях океана различается по содержанию солей из-за 1) разной концентрации солей и твердых веществ в водах, поступающих в океаны, 2) вертикального перепада температуры, 3) различия в скоростях испарения, 4) образования льда и его таяния, 5) различного количества осадков над различными районами океана, а также из-за 6) постоянных океанических и морских течений. Эти факторы обусловливают локальные различия и в составе донных осадков.

Предполагается, что глобальные скорости эрозии и седиментации (осаждения) в настоящее время выше, чем миллионы лет назад. *Эрозия* распадающихся горных пород за всю геологическую историю планеты оценивается в $2 \cdot 10^{18}$ т, т. е. примерно 300 $кг/см^2$ земной поверхности. Годовое количество растворенных веществ, которое реки выносят в моря всего мира, составляет на сегодня около 4 млрд. т. Примерно 1 млрд. т солей каждый год поступает в атмосферу в результате попадания вместе с каплями воды на поверхности морей и океанов. При этом в процессе рециркуляции около 90% этих солей снова поступает в океан. Ежегодно, например, 100 млн. т натрия (соответственно 300 млн. т морской соли) переносится по воздуху на сушу. В то время как годовое накопление осадков *(седиментация)* в океанах принимают равным примерно 4 млрд. т, в краткосрочном плане расход – поступление растворенных солей в океанах находится в относительном равновесии. Однако в контексте всей геологической истории земли накопление осадков не является необратимым процессом. Океанические донные осадки содержат на данный момент только от 15 до 24% материалов, которые откладывались на дно океанов с момента их возникновения. В долгосрочном плане процессы эрозии – седиментации представляют собой круговой процесс.

Доля *атмосферы* в общей массе земли составляет лишь 1 $млн^{-1}$ (или примерно 1/300 часть гидросферы), и около 80% от нее составляет *тропосфера* (средняя высота 11 км, над экватором 18 км, над полюсами 8 км). Свободный от пыли и воды чистый воздух на уровне моря на 99,99% по объему содержит азот, кислород, аргон и диоксид углерода. Все другие элементы и соединения вместе составляют по объему лишь 30 $млн^{-1}$.

Тропосфера настолько хорошо перемешивается ветрами и воз-

душными течениями, что за исключением временных локальных изменений концентрации она в основном гомогенна, что справедливо также и для элементного состава *стратосферы* (до 50 км) и всей атмосферы в целом. Обмен между стратосферой и тропосферой происходит значительно медленнее, чем внутри этих слоев атмосферы из-за наличия промежуточного слоя тропопаузы. Время жизни аэрозолей составляет, например, в тропосфере от нескольких дней до месяцев, а в стратосфере – годы.

Хотя по содержанию основных компонентов стратосфера полностью гомогенна, на высоте от 20 до 50 км она содержит определенное *количество* озона, который благодаря большому коэффициенту поглощения в УФ-области (максимум при 255 нм) практически полностью поглощает излучение в диапазоне волн 210–290 нм. По абсолютной величине количество озона очень невелико – на высоте от 25 до 30 км его объемная доля составляет около 10 млн $^{-1}$ (в тропосфере около 6,04 млн $^{-1}$).

В то время как в тропиках тропосфера содержит около 4% воды по массе, в стратосфере концентрация воды составляет лишь 3 млн$^{-1}$.

Уже по этой весьма упрощенной картине *структуры и реакций в атмосфере* можно представить себе определенные возможности ее долгосрочных изменений. Изменения *солнечной активности* (с периодами 11 лет и 250 млн. лет), *космическое излучение* (91% протонов, 8% ядер гелия, остальное – самые разнообразные атомные частицы) и *вулканическая пыль* (до высоты 120 км) влияют не только на процессы в нижних слоях атмосферы. В настоящий момент едва ли можно оценить, какое долгосрочное влияние оказывают эти воздействия на состояние земли.

В ходе геологической истории земли происходят долгосрочные, до некоторой степени ритмичные изменения ее климата. Так как климат представляет собой результат сложного взаимодействия многих факторов, специфическое влияние которых до настоящего времени выяснено не полностью, специфические причины изменений климата в ходе геологической истории земли нельзя считать достоверно известными.

Для расчета баланса излучения принимается, что в среднем поглощенное земным шаром солнечное излучение и отдаваемая системой земля/атмосфера в космическое пространство энергия равны, при этом в процессе теплообмена между атмосферой и поверхностью земли поглощаемая и отдаваемая энергии также равны. В данном случае не учитываются долгосрочные изменения энергетического состояния земли.

Энергообмен биологических процессов на земном шаре составляет в среднем 1,55 Дж/см^{2}·сут, т. е. лишь 0,2% суммарного баланса излучения на единицу поверхности земли. Доля потоки энергии из глубины земли к ее поверхности составляет примерно треть от биологической энергии, 0,55 Дж/см^{2}.сут в среднем по планете. Обе эти величины лежат в пределах довольно большой погрешности в определении глобального баланса энергии, и ими можно пренебречь. В среднем за год около 20% теплового

излучения земли затрачивается на нагревание атмосферы. Очевидно, эта энергия представляет собой разность между полученной землей солнечной энергией и излучением земли в космос.

Рассмотренные выше химические процессы, происходящие в ходе геологической истории земного шара, касались прежде всего неорганических материалов. На превращения *органических веществ,* хотя они иногда и пересекаются с неорганическими процессами, существенное влияние оказывают совсем иные факторы. Поэтому их следует обсудить отдельно, тем более что органические вещества имеют большое значение для решения проблем экологической химии. В этой связи особое внимание следует уделить *многообразию реакций* органических соединений в окружающей среде, учитывая, что все продукты реакции обладают разными свойствами, устойчивостью и биологической активностью. В противоположность этому реакции неорганических элементов, ионов и радикалов в окружающей среде легче наблюдать ввиду ограниченного набора исходных веществ.

В настоящее время наши знания об органо-химических и биохимических процессах, происходивших более чем 600 млн. лет назад (пракембрий), более скупы, чем о неорганических и физических процессах. Правда, предполагается, что первичная материя, из которой образовалась земля, содержала свыше 5% органических веществ (в основном метана, так как из-за высокой температуры в то время могли существовать лишь неорганические вещества). В этих условиях окислительно-восстановительные реакции в большей мере были благоприятны для восстановления оксидов металлов и окисления органических веществ. Существуют различные, частично основанные на экспериментах теории возникновения пробиотических органических веществ после соответствующего охлаждения земной коры. Так как об условиях, в которых проходили эти реакции, мы имеем очень мало данных, на основании лабораторных экспериментов нельзя сделать окончательных выводов о характере реакций, действительно имевших место в то время, но можно показать вероятность осуществления пробиотической эволюции органических соединений и как следствие этого – появление жизни. Так как материальный состав окружающей среды в значительной мере определяет условия жизнедеятельности, очень важным является знание физико-химических предпосылок возникновения жизни. Теории и гипотезы о химических процессах, приводящих к возникновению жизни, а жизнь характеризуется *обменом веществ* и *размножением,* – освещают лишь отдельные аспекты этих явлений и мало убедительны вследствие трудностей в постановке длительных экспериментов. Следует подробнее остановиться на процессе появления в атмосфере кислорода и увеличения его содержания до современного уровня вследствие большого значения этого процесса для биосферы. Кроме того, с химической точки зрения появление кислорода в

атмосфере в существенной степени изменило состояние окружающей среды в тот момент. Если основываться на современных представлениях о праатмосфере и химических процессах, которые протекали примерно 1,8–2 млрд. лет назад, то в настоящее время не должно было бы существовать свободного кислорода и, следовательно, не было бы возможно кислородное дыхание. С другой стороны, если предположить, что условия солнечного излучения не изменились, то разложение воды под действием УФ-излучения происходило бы в том же объеме, как и сегодня, и даже в большей степени из-за отсутствия поглощения высокоэнергетического УФ-излучения кислородом и озоном. Возникавший при этом кислород в полном объеме тратился бы на окисление газов в атмосфере (H_2S, SO_2, NH_3, CO) и на окисление выветривающихся горных пород. То же относится и к кислороду, образовавшемуся за эти же 1,8 млрд. лет в результате *фотосинтеза.* Примерно к этому времени появляется избыточное количество кислорода, т.е. кислорода образуется больше, чем затрачивается на окисление неорганических материалов. Избыточный кислород биотического и абиотического происхождения, остающийся после его абиотического потребления и использования живыми организмами (появившимися примерно 1,3 млрд. лет назад) в процессе кислородного дыхания, постепенно медленно накапливался примерно до раннего палеозоя (400 млн. лет назад) до его содержания в атмосфере около 11%. Затем избыток кислорода существенно увеличился, и его концентрация в атмосфере стала более резко возрастать. Поглощающий УФ-излучение озоновый слой, вероятно, существует по крайней мере 600 млн. лет и является важным фактором, определяющим развитие биосферы в тот период.

Огромное влияние на материальный состав окружающей среды в глобальном масштабе оказали накопление свободного молекулярного кислорода в атмосфере (и растворенного в гидросфере), а также снижение температуры (при зарождении жизни глобальная температура составляла еще около 80°С).

В настоящее время уровень образования кислорода в процессе фотосинтеза оценивают в $6{,}8 \cdot 10^{15}$ моль ежегодно. Однако основная масса образовавшегося кислорода связывается снова в неорганические соединения в процессе кислородного дыхания животных и гниения их остатков. Ежегодно остается неиспользованной незначительная часть биотического кислорода, примерно $3 \cdot 10^{10}$ моль. Если учесть, что в настоящее время около 90% этого кислорода затрачивается на естественное неорганическое окисление (выветривание), атмосфера имеет положительный баланс $3 \cdot 10^{9}$ моль или около 100000 т кислорода ежегодно. Значит, потребовалось бы около 10 млрд. лет для того, чтобы достичь современного уровня содержания кислорода в атмосфере, которое составляет 10^{15} т ($3{,}7 \cdot 10^{19}$ моль). Однако если принять меньшую скорость минерализации органических веществ в ходе геологической истории земли

(седиментация составляла лишь 1/10000 от современного уровня), то для такого накопления кислорода потребовалось бы 1,8 млрд. лет.

Другой подход к составлению баланса кислорода на земле исходит из предпосылки, что средняя концентрация *органических горючих ископаемых* в осадочных породах составляет в глобальном масштабе 0,4%. При этом в $2 \cdot 10^{18}$ т осадочных пород аккумулировано $8 \cdot 10^{15}$ т углерода из биотических остатков, накопившихся с момента зарождения жизни. Для образования такого количества углерода необходимо фотосинтетическое восстановление $29 \cdot 10^{15}$ т CO_2. Баланс биосинтеза кислорода и его минерализации (т. е. расходования на окисление) приводит к избытку кислорода $21 \cdot 10^{15}$ т. Для обеспечения современного содержания кислорода в атмосфере достаточно менее 5% от этого количества. Остальные 95% используются для естественного окисления неорганических соединений. Еще один расчет баланса кислорода возможен на основе нетто-энергетического потребления биосферы 1,55 Дж/см^2•сут и теплоты сгорания ископаемого углерода.

Имеется несколько возможностей провести глобальные ретроспективные расчеты, имея в виду известный результат, однако на их основе нельзя сделать никаких заключений о действительных количественных закономерностях, поскольку даже небольшие ошибки в оценках (например, на 10^{-2} %) седиментации веществ биологического происхождения (с $4{,}4 \cdot 10^{-4}$ % на 10^{-2} %) полностью изменяют результаты расчетов. Более убедительными являются аналогичные расчеты материального баланса на более короткие периоды времени.

По оценкам только 1/1000 часть ископаемого углерода и его соединений образуют $6{,}5 \cdot 10^{12}$ т месторождений, доступных для эксплуатации. При их полном сгорании было бы использовано $6{,}5 \cdot 10^{12} \cdot 8/3 = 17{,}3 \cdot 10^{12}$ т кислорода, что соответствует 1,7% имеющегося в атмосфере кислорода, иными словами, его содержание в атмосфере упало бы с 20,9 до 20,6%.

Определенная граница между веществами в окружающей среде, которые подвергаются глобальным изменениям в долгосрочном плане, и веществами, запасы которых могут истощиться за десятилетия или столетия, могла бы быть установлена на уровне потребления кислорода при сгорании всех доступных для эксплуатации запасов горючих ископаемых, т.*е.* около $20 \cdot 10^{12}$ т. Это означает, что возможны краткосрочные глобальные изменения вещества в количестве менее $20 \cdot 10^{12}$ т, независимо от того, вызваны они природными явлениями или связаны с деятельностью человека. *По порядку величины* 10^{12} т такая верхняя граница мировых запасов, изменяющихся под влиянием деятельности человека, кажется весьма реалистичной (например, глобальное повышение концентрации CO_2 в *атмосфере); сжигание горючих ископаемых практически в полном объеме – это антропогенный фактор.*

Природные краткосрочные изменения материального состава окружающей среды являются следствием землетрясений и вулканической

деятельности, постоянно идущей эрозии, а также эрозии, вызванной бурями и наводнениями. Климатические явления, такие как засухи, морозы, колебания уровня рек, имеют общеизвестные последствия. В результате этих процессов изменения состава окружающей среды имеют локальный, региональный и даже глобальный характер, они могут быть кратковременными, но могут оказывать влияние и в течение геологически значимых периодов времени.

7.6. Антропогенные изменения

Имеется тесная причинно-следственная связь между возможностью или необходимостью антропогенных изменений в окружающей среде и численностью населения. Более значительное увеличение численности населения Земли связано с индустриализацией. В то время как рождаемость с момента возникновения человечества до настоящего времени если и снижалась, то очень медленно, в промышленно развитых странах произошло резкое падение рождаемости, которое, несмотря на значительное увеличение продолжительности жизни, явилось причиной низкого роста численности населения. Напротив, в менее развитых странах благодаря улучшению медицинского обслуживания, импорту медикаментов и проведению эпидемиологических мероприятий начиная с 1850 г., а особенно с 40-х годов нашего столетия, продолжительность жизни также увеличилась, а рождаемость снизилась незначительно или осталась на прежнем уровне.

Вызванное этим увеличение численности населения земного шара примерно на 2% в год, а за последние 25 лет с 2,5 до более , чем 4 млрд. человек имеет совсем иной характер, чем прежде, когда увеличение населения мира происходило более или менее постепенно; оно привело в первую очередь к интенсивному *воздействию на окружающую среду.* Резкий рост, например, потребления воды, энергии, некоторых промышленных продуктов – более чем на 2% в год – не способствует с глобальной точки зрения повышению жизненного уровня населения, так как требует сверхпропорционального использования материальных ресурсов и технологических средств. Так, увеличение производства продовольственных товаров на 34% с 1951 по 1966 г. потребовало увеличения внесения фосфорных удобрений на 75%, азотных удобрений на 14%, пестицидов на 300%.

7.7. Рост мировой экономики

При наращивании за последние два десятилетия мирового хозяйственного потенциала ежегодно на 5–6% влияние человека на

окружающую природу *удваивается* каждые 13 с половиной лет (экологический запрос – ecological demand). За 35 лет, в течение которых при нынешнем росте численности населения Земли народонаселение возрастет в два раза, связанное с этим общее изменение окружающей среды увеличится в шесть раз. Так как прирост производства, в частности органических химических продуктов, за период 1960–1970 гг. составил более 9% в год, сохранение этой тенденции в течение 35 лет привело бы к изменению определенных параметров окружающей среды более чем в двадцать раз.

Пределы допустимых глобальных изменений все в большей мере становятся видны по мере расширения деятельности человека; для некоторых неорганических веществ эти изменения уже превысили влияние аналогичных природных процессов, что касается органических продуктов – ксенобиотиков, то их применение создает неизвестную нам новую «природную» ситуацию.

7.8. Сельское и лесное хозяйство

В теоретическом аспекте примерно 80% поверхности земли, свободной от льда, пригодны для сельского хозяйства. В настоящее время площадь, занимаемая лесами, составляет на всей земле 40 млн. км^2, лугами и степями – 30 млн. км^2, а площадь, используемая под пашню – свыше 14 млн. км^2. Изменения характера использования земли, например вырубка леса под сельскохозяйственные угодья, означает для соответствующей территории изменение материального состава окружающей среды; аналогичные изменения происходят при переходе к культурному земледелию в пустынях и полупустынях. Эти изменения проявляются не только в биологическом плане, но по виду и количеству продуктов фотосинтеза, а также в геохимическом и метеорологическом отношении. Применение химических препаратов для интенсивного земледелия представляет собой лишь один из многих факторов изменения состава окружающей среды.

Благодаря применению современной техники, интенсивных методов выращивания растений, удобрений и средств защиты растений современное сельское хозяйство может быстро изменять материальный состав окружающей среды.

Преобразование большей части среднеевропейских лесов в сельскохозяйственные угодья привело к увеличению *альбедо*, т. е. отражательной способности поверхности земли, а следовательно, к снижению нетто-баланса солнечного излучения, и как следствие – к осушению территории. В свою очередь это способствовало разогреву атмосферы ИК-излучением, исходящим от поверхности земли. В результате современный климат

оказался более сухим и теплым, чем 4000–5000 лет назад.

Биологические изменения в процессе сельскохозяйственной деятельности, т. е. превращение естественных биотопов в искусственные, закономерно привели к изменениям микроклимата (согласно биоклиматическим картам, фенологии растений).

Использование *артезианской воды,* которое в глобальном отношении в свое время имело лишь второстепенное значение, привело к увеличению водопотребления по крайней мере на 50%, а в будущем, особенно в пустынях, приведет к увеличению потребления грунтовых вод, которые накапливались в земной коре 20–25 тысяч лет во время последнего оледенения. Эта вода не восполняется осадками, а следовательно, ее потребление представляет собой *необратимое изменение природы.*

В то время как окультуривание пустынных и засушливых земель в материальном плане связано главным образом с проблемой их обводнения, расширение сельскохозяйственных территорий за счет лесов и саванны влажных тропиков с их большой потенциальной урожайностью создает значительные экологические проблемы по сохранению качества почв. Чтобы сохранить продуктивность лабильных культурных ландшафтов, необходимо дальнейшее воздействие на окружающую среду, – с одной стороны, это увеличение уровня внесения искусственных удобрений, что совсем не обязательно приводит к ухудшению состояния окружающей среды (например, в результате их вымывания), с другой – очевидно, необходимость более широкого применения средств для сохранения и улучшения качества почвы. Такие мероприятия приводят к значительному изменению материального состава окружающей среды за счет *количества* внесенных химических веществ и *площади* обрабатываемых земель; однако, если удастся снизить *эрозию почвы,* будет решена одна из важнейших проблем сельского хозяйства. Такого рода изменения природной среды, как результат долговременного развития, представляют собой прогрессивное явление не только с антропоцентрической точки зрения.

7.9. Горнодобывающая и другие отрасли промышленности

Промышленное производство, включая выработку энергии, строительство и транспорт, влияет на окружающую среду значительно больше, чем сельское хозяйство.

Кроме очевидных изменений окружающей среды, смены ландшафта и локальных изменений, наибольшее значение в глобальном масштабе имеют добыча и переработка сырьевых природных материалов, что и обусловливает антропогенное изменение состояния окружающей среды. Наиболее ярко это проявляется в районах с высокой плотностью

населения. Исключение из этого правила составляют объекты горнодобывающей промышленности, которые обычно расположены в малонаселенных районах, но приводят к значительным изменениям окружающей среды.

В принципе такие проблемы ухудшения окружающей среды существовали уже в доиндустриальное, и даже доисторическое время. Жители пещер в древности подвергались воздействию дымовых газов, которые образовывались при работе их примитивных обогревательных устройств. Серьезные трудности возникли с плохим санитарным состоянием средневековых городов, а также с проблемами водоснабжения и «качества» питьевой воды. Знаменитый *лондонский туман «смог»* не был непосредственно связан с индустриализацией. Его появление было отмечено еще в XI в., что послужило непосредственно причиной издания тогда *первого* известного нам *закона о защите окружающей среды.* Этим законом было запрещено кузнечное производство – главная причина, как тогда полагали, появления таких туманов. Издание этого закона показывает, что уже многие столетия назад были попытки бороться с ухудшением состояния окружающей среды, вызванным урбанизацией и появлением ремесленных производств, в конкретном случае против появления пыли и диоксида серы. Принципиальные различия в локальных проблемах доиндустриального города и современного промышленного района состоят в *количественных отличиях* и увеличении многообразия химических процессов, выясняющихся по мере развития химической технологий. Еще и сегодня локальные изменения, связанные с работой промышленности, рудников, ремесленного производства и домашнего хозяйства, ограничены потенциальными краткосрочными воздействиями. Более глубокой, чем определение локальных воздействий, является оценка глобальной индустриальной активности человека, потенциальной возможности и меры материальных изменений природной среды в результате внедрения современных технологий.

В горнодобывающей промышленности имеют место такие объемы перемещения и превращения веществ, которые для многих неорганических соединений не только заметно изменяют природные химические процессы, но и превышают их в количественном отношении. По данным на 1967 г. при ежегодном росте продукции горнодобывающей промышленности на 5% современный уровень добычи повысился бы более чем на 50%; отсюда следует, что «целенаправленная» антропогенная ежегодная скорость эрозии соответствующих элементов оказывается выше, чем в природных процессах. При рассмотрении локальных или региональных накоплениях элементов их список можно было бы расширить, например, включив в него серу (SO_2), кремний (высотное и подземное строительство) и т. д.; в сельском хозяйстве речь

пойдет об элементах, потеря которых почвой оказывается меньше, чем поступление их с удобрениями.

Сама по себе переработка материалов в промышленном производстве приводит непосредственно лишь к минимальному поступлению этих веществ в окружающую среду (отходы производства). Однако в процессе и после их применения все продукты (частично после химических превращений) поступают в окружающую среду. Имеется несколько исключений, когда после использования некоторые материалы можно снова вернуть в производственный процесс *(вторичная переработка, рецикл*). В принципе вторичная переработка и повторное использование в качестве сырья возможны только для продуктов, поддающихся сбору после их применения. Практически реальное значение имеет вторичное использование отходов для немногих ценных (например, Hg, Cu, Pb) или массовых сырьевых продуктов (железный лом), легко собираемые отходы (бумага, текстиль), а также, например, отработанное масло, для сбора которого созданы специальные системы, необходимые и для защиты водных ресурсов. Важными являются различия в *дисперсии (рассеянии)* промышленных продуктов в промышленности и сельском хозяйстве. Первичная сельскохозяйственная продукция естественным образом распределена на большой площади, которая занимает более 10% всей суши. Напротив, для промышленных предприятий, потребляющих сырье, энергию и руды, требуется лишь незначительная, малая часть поверхности земли. Например, все городские территории мира занимают площадь, менее чем в два раза превышающую площадь ФРГ. Продукты сельского хозяйства, производимые во всем мире, приводят к все увеличивающемуся масштабу изменений материального состава окружающей среды. Это объясняется тем, что продукты сельского хозяйства потребляются в районах их накопления, и их отходы не могут равномерно распределяться и возвращаться в почву, что приводит к избытку питательных веществ в почвенных водах. Совсем иное положение с промышленными продуктами. Они производятся локально в больших масштабах и с помощью широкой торговой сети распространяются и потребляются «дисперсно» – рассеянно. Поэтому они большей частью не используются вторично и в конце концов поступают в виде отходов в окружающую среду. Массовое содержание скота в сельскохозяйственных районах по своим последствиям сравнимо с промышленным производством.

7.10. Пространственные изменении (локальные, региональные, глобальные)

Критериями оценки природных и антропогенных веществ по степени их воздействия на изменения материального состава окружающей

среды являются, кроме прочих, их количество и объем запасов, частота появления и распространенность. Классификация изменений состава окружающей среды с учетом их локального, регионального и глобального распространения облегчает оценку риска при их использовании, идентификацию источников их появления и устанавливает *de facto* политическую основу для мероприятий по снижению таких изменений. Классификация по пространственному распространению является составной частью оценки и описания изменений состава окружающей среды.

Выше рассматривались *локальные* краткосрочные естественные изменения окружающей среды, например в результате землетрясений, наводнений, бурь; кроме того, происходят флуктуации плотности популяций различных видов экосистемы, изменения микроклимата и т. д. Региональными природными краткосрочными изменениями являются, например, засухи и извержения вулканов.

Антропогенные локальные изменения материального состава окружающей среды можно рассматривать как результат непосредственной деятельности человека по изготовлению, применению, а следовательно, и эмиссии (выделении в окружающую среду) химических продуктов на некоторой ограниченной или поддающейся ограничению территории. Накопленные локально концентрации веществ могут оказывать нежелательные и тяжелые воздействия на человека и живые организмы. Если этот вред известен, он должен тщательно контролироваться на технологическом уровне. Если риск применения оказывается выше, чем полученная польза, необходимо немедленно прекратить локальное загрязнение путем соответствующих технологических мероприятий.

При экологохимическом исследовании отдельных веществ следует, прежде всего установить, вызывает ли данное вещество только локальные изменения, т. е. сохраняется ли оно на месте в соответствии с его физико-химическими свойствами или ограниченным объемом использования, или, напротив, оно рассеивается в региональном или глобальном масштабе.

Различие между локальным и региональным накоплением продуктов довольно четкое, если ограничиться рассмотрением только по виду их применения. К локальным приводит большинство аварий на предприятиях, а также диоксиновые катастрофы.

Локальные и региональные изменения вызывают вещества, относительно широко распространенные и используемые на больших территориях, например сельскохозяйственные препараты. К ним же относятся также аварии, при которых в воздух или воду выбрасываются (эмитируется) одновременно большие количества химических продуктов, например, как при авариях нефтетранспортирующих танкеров вблизи побережья.

Региональные изменения материального состава окружающей среды,

исключая определенные изменения, вызванные сельскохозяйственным производством (культурный ландшафт), в общем плане *нежелательны.* Как следует рассматривать воздействия веществ – в региональном или в глобальном плане, – зависит в основном от их поведения в соответствии с эколого-химическими критериями, рассматриваемыми ниже.

Идентификация и анализ локальных изменений содержания веществ вполне возможны и относительно доступны. Оценка таких изменений на региональном и глобальном уровне прежде всего зависит от *чувствительности (предела обнаружения)* аналитических методов определения химических веществ. Оценка доли антропогенной деятельности в региональном и глобальном накоплении природных веществ затрудняется тем, что содержание этих веществ в различных географических зонах значительно отличается. Кроме того, эта доля антропогенного воздействия зависит от таких естественных и непредсказуемых факторов, как, например, климатических изменений, которые могут за короткий срок сильно повлиять на масштабы накопления химических материалов. Оценка содержания веществ в окружающей среде на региональном и особенно глобальном уровне проводится только для отдельных веществ, для которых невозможно это сделать на основе анализа взаимосвязей между структурой вещества и его свойствам. Для оценки накопления какого-либо вещества необходимо определить локальные его источники по областям применения. Основой для определения возможных региональных или глобальных влияний являются оценки локальных накоплений веществ.

Однако при *дисперсии (рассеянии)* возможно загрязнение всей окружающей среды и биосферы, при этом даже на незначительные концентрации веществ (после их разбавления в результате дисперсии) возможны воздействия на особенно чувствительные виды организмов, например, после аккумулирования загрязняющих веществ в пищевых цепях.

Глава 8

КОНЦЕПЦИИ И КРИТЕРИИ ИЗУЧЕНИЯ ВЕЩЕСТВ

Эколого-химическая концепция, направленная на изучение веществ, особенно эффективна для прогнозирования региональных и глобальных изменений окружающей среды, вызванных применением химических продуктов.

Ниже рассматриваются критерии, их взаимосвязь и химические реакции в окружающей среде как следствие влияния человека на региональное и глобальное состояние окружающей среды.

Концепция оценки веществ по их свойствам в экологической химии пригодна как для органических, так и для неорганических веществ. Тем не менее, имеются принципиальные различия в применении этой концепции к органическим и неорганическим соединениям. Так как в отличие от органических веществ поведение обычно присутствующих в экосфере неорганических ионов хорошо известно, можно с большой степенью достоверности прогнозировать причинно-следственные связи между неорганическими веществами, если они не переходят в органические, как, например, ртуть – в метилртуть.

Известно, что поведение элементов и соответствующих ионов в окружающей среде прогнозируется более надежно, чем привнесенных извне органических соединений, однако определение их количественных соотношений и потоков оказывается более затруднительным. В то время как объем промышленной продукции точно указывается в статистической отчетности, характер использования ионов и объем биопродукции природных веществ во времени и пространстве можно вычислить лишь из аналитических данных. Тем самым оказывается очень трудно количественно оценить циклические биогеохимические процессы, протекающие в окружающей среде. Для того чтобы оценить влияние человека на эти процессы, необходимы данные, характеризующие за длительный период естественное развитие биосферы, флуктуации, химические факторы окружающей среды, а также интенсивность биологических процессов.

Следовало бы также рассмотреть различные аспекты органической палеогеохимии и палеобиохимии, и в частности долговременные природные изменения и кратковременные антропогенные изменения.

В концепции экологической химии, основанной на изучении химических продуктов, в качестве критериев изменения материального состава окружающей среды можно использовать следующие шесть параметров:

- объем производства;
- области применения;
- распространение в окружающей среде;
- устойчивость и способность к разложению;
- превращения;
- экотоксикологические свойства.

На основе этих параметров может быть охарактеризовано значение и дана оценка количественного влияния отдельных веществ на окружающую среду.

Ниже разъясняется смысл этих параметров и их значение для оценки накопления и влияния на окружающую среду привнесенных химических продуктов.

8.1. Объем производства

Этот критерий поставлен в начале перечня лишь потому, что он *наиболее доступен* для определения, а не потому, что наиболее значим для изменения состава окружающей среды.

Любой материал или процесс его превращения, независимо от того, производится ли человеком или происходит в результате природных явлений, отражает изменение качества среды. Насколько такие изменения велики, желательны или нежелательны, зависит от масштаба и длительности применения и от свойств материала в окружающей среде. Легче всего это показать на примере органических ксенобиотиков, объем производства которых прямо пропорционален масштабам изменений окружающей среды, связанных с ними. Объем производства как один из критериев эколого-химической концепции, основанной на изучении химических материалов, должен включаться в оценку антропогенного использования и оборота неорганических веществ, а также органических веществ природного происхождения; на фоне глобальных природных процессов объем антропогенного использования и оборота веществ можно определить лишь с малой степенью достоверности.

Следует подчеркнуть, что обсуждаемые здесь критерии состояния окружающей среды относятся только к определенным химическим продуктам и смесям веществ, которые можно оценивать и по другим перечисленным выше критериям, т. е. все параметры следует учитывать в совокупности: Например, бетон, камень, цемент и сталь, оказывают химическое воздействие на окружающую среду только в том отношении, что их производство сопровождается вредными выбросами, и для их производства используются некоторые химические продукты.

Во всем мире ежегодно производится 300 млн. т химических продуктов. Примерно 90% органических химических продуктов производится из нефти. Ежегодная мировая продукция средств защиты растений составляет 640 000 т.

Важность данных об объеме производства и потреблении как критерия потенциальных изменений материального состава окружающей среды признана национальными и международными органами, в том числе и такими, как OECD (Organisation of Economic Cooperation and Development – Организация экономического сотрудничества и развития) и EPA (Environmental Protection Agency – Агентство охраны окружающей среды) в США. Так, из изученных 50 химических продуктов, характеризующихся наибольшим объемом производства, почти половина признана опасными веществами, загрязняющими сточные воды (Федеральный акт о контроле за загрязнением воды). Для того чтобы выявить влияние *побочных продуктов* и *отходов производства* на окружающую среду, необходимо знание технологической схемы производства товарного

продукта, включая используемые исходные промышленные материалы, например соответствующие фракции нефти, смол и т. п. Количество чистых промежуточных продуктов, подвергающихся превращению на последующих стадиях производства, не имеют эколого-химического значения. В то же время побочные продукты и отходы производства поступают в окружающую среду и являются экологически значимыми.

Целый ряд товарных и промежуточных продуктов почти сразу же полностью *потребляется,* например, *растворители.* По некоторым оценкам из 73 млн. т. мировой продукции органических химических продуктов примерно 20 млн. т. (из них 10 млн. т. растворителей, гликолей и моющих средств) непосредственно без всякой переработки поступают в окружающую среду.

Загрязнения (примеси) промышленных химических продуктов, естественно, зависят от способа их производства (метода синтеза). Зная схему производства и условия синтеза, легко определить возможные примеси и степень загрязнения целевого продукта вредными компонентами на каждой стадии производственного процесса. В качестве примера можно привести производство пентахлорфенола (мировая продукция в 1984 г. составила от 35 до 40 тыс. т.), который содержал до последнего времени около 13% примесей, преимущественно изомеров тетрахлорфенолов.

Этот пример наличия нежелательных примесей показывает, что данные об объеме производства большого числа химических органических препаратов необходимо подвергать экспериментальной проверке. Для некоторых пестицидов, используемых уже в течение десятилетий, к настоящему времени выделены и идентифицированы лишь основные компоненты (для альдрина такой анализ был проведен лишь несколько лет назад). Из пестицидов, состав которых еще не полностью известен, можно назвать, например, токсафен и технический хлордан. Так как одни и те же соединения могут содержаться в разных продуктах, например, фторированные дибензофураны в хлорфеноле и хлорированных бифенилах, с практической точки зрения (идентификация источников нежелательных изменений) было бы целесообразно учитывать не только основные химические продукты, но и их примеси.

Для поступающих в окружающую среду веществ, которые могут иметь как природное происхождение (продукты жизнедеятельности живых организмов), так и производиться человеком, интересно провести сравнение эмиссии (выделения) их из природных объектов и эмиссии, связанной с деятельностью человека. В табл. 8.1 приводится такое сравнение. Из таблицы видно, что в соответствии с современным состоянием наших знаний доля веществ, образующихся в результате деятельности человека, составляет значительно менее 50% за исключением лишь диоксида серы. Так, например, CO продуцируется водорослями, а углеводороды – лесной растительностью и

микроорганизмами. К 2600 млн. т. углеводородов, указанным в табл. 8.1, которые, по нашим оценкам, продуцируются растительностью и микроорганизмами, следует добавить метан, который в больших количествах образуется при анаэробном разложении органических веществ (см. следующие главы). Вследствие низкой химической активности метана, а следовательно, длительного срока существования, его содержание в атмосфере оценивается в 4800 млн. т, а средняя естественная концентрация в атмосфере – примерно 1,5 млн$^{-1}$. Жвачные животные ежегодно прибавляют к этому количеству несколько миллионов тонн, поскольку примерно 7% потребляемой ими энергии выделяется в виде метана. Терпеновые углеводороды выделяются главным образом лесной растительностью. Их характерной особенностью является способность к агрегированию (полимеризации) в аэрозоли. Антропогенным прямым выделением углеводородов в воздух является использование ископаемого горючего в качестве топлива.

Таблица 8.1

Глобальные эмиссии из природных источников и в результате человеческой деятельности

Вид эмиссии	Природные источники, млн. т/год	Человеческая деятельность	
		млн. т/год	% общей эмиссии
CO_2	600 000	22 000	3,5
CO	3 800	550	13
Аэрозоли[а]	3 700	246	6
Углеводороды[б]	2 600	90	3
CH_4	1 600	110	6
NH_3	1 200	7	0,6
NO, NO_2[в]	770	53	6,5
Соединения серы [г]:	304	150	33
из них SO_2	20	150	88
N_2O	145	4	3

а – включая тонкую пыль; б – без метана; в – рассчитано на NO_2; г – рассчитано на SO_2.

Подобное сравнение природного и антропогенного перемещения металлов вследствие эрозии и деятельности горнодобывающей промышленности дает совершенно иную картину: для одиннадцати металлов показано, что антропогенное перемещение металлов

существенно больше, чем естественная эрозия. Аналогичны результаты сравнения при перемещении азота вследствие эрозии и деятельности добывающей промышленности. Данные об объеме производства тесно коррелируют с другими критериями, рассматриваемыми в следующих главах, что особенно значимо для химических продуктов, производимых в больших объемах, Например, исследованные в США 50 химических продуктов, которые можно рассматривать как 50 наиболее распространенных в мире веществ, вследствие высокой их концентрации могут превысить уровень содержания, обеспечивающий способность природных сред к самоочищению, характерную для соответствующей структуры соединений, а также снизить эффект биологической очистки и системы подготовки питьевой воды. Таким образом, эти и другие обсуждаемые ниже критерии нужно исследовать, учитывая объемы производства соответствующих химических продуктов.

8.2. Области применения

Изучение критерия «объем производства» непосредственно подводит к проблемам применения химических продуктов. Понятие «области применения» имеет различные толкования, которые мы поясним ниже на отдельных примерах. «Области применения» понимают как *количественный учет использования отдельных химических продуктов на конечной стадии их потребления.* Технологическое применение в домашнем хозяйстве, промышленности, сельском хозяйстве, продуктах питания и т. д. определяет направления распространения химических веществ в окружающей среде.

Знания областей применения химических продуктов, отчасти соответствующих отраслям их производства (например, пластмассы, пигменты, поверхностно-активные вещества и т.д.), и тех природных сред, в которые они поступают, является основой для оценки возможных изменений окружающей среды. С этой точки зрения было бы целесообразно подразделить воздействие получаемых пестицидов не только при использовании по целевому назначению как инсектицидов, гербицидов и фунгицидов, но и по применению в сельском хозяйстве и в службе здравоохранения. Применение в сельском хозяйстве можно в свою очередь подразделить на защиту запасов при хранении (зерна, овощей и т. п.) и защиту растений, а в здравоохранении – применение в борьбе против вредных насекомых в зданиях и при противоэпидемических мероприятиях, например при обработке больших площадей против переносчиков малярии.

Знание количественных данных о применении отдельных химических соединений позволяет рассчитать и оценить степень первичного

загрязнения окружающей среды. При этом важное значение имеет характер применения, является ли такое применение *закрытым* и тем самым *контролируемым* (т. е. позволяющим в случае необходимости осуществлять повторное использование или уничтожение химического продукта) или *открытым* (т. е. имеется возможность распространения химического продукта в окружающую среду).

С этой точки зрения весь объем производимых перхлорэтиленов можно было бы разделить на применяемые для очистки (химическая чистка, обработка текстильных изделий, очистка металлов) и используемые в качестве полупродуктов в различных синтезах. В данном случае химическая чистка и очистка поверхности металлов являются доминирующими среди областей их применения. Во многих странах для химчистки используется до 90% всего объема производимых перхлорэтиленов. В обоих случаях речь идет об открытом применении, которое приводит к загрязнению окружающей среды. Применение полихлорированных бифенилов необходимо подразделить по характеру использования на применение в трансформаторах и больших конденсаторах и в небольших объемах в качестве пластификаторов. Таким образом, критерий «области применения» прежде всего дает представление о первичном, часто локальном накоплении исследуемого химического продукта, например фторхлоруглеводородов (в воздухе), детергентов – моющих средств (в воде), пластификаторов (воздух и отходы производства) и т. д. Одновременно складываются основные представления об их дальнейшем экологическом поведении. Таким образом, основным этапом экологохимических экспериментальных исследований фторхлоруглеводородов должно быть изучение их химического поведения в атмосфере.

На схеме рис. 8.1 раскрыто содержание понятия «области применения» на различных стадиях использования человеком этих продуктов. Все указанные стадии важны, поскольку содержат информацию о причинах изменений материального состава окружающей среды.

На некоторых примерах поясним смысл и различные подходы к критерию «области применения».

Благодаря биоцидным свойствам ряд химических веществ различной структуры и экологических свойств можно рассматривать как пестициды различного назначения. Основную часть среди них занимают гербициды. Следует раскрыть также понятие «области применения» с пространственной (географической) точки зрения.

В качестве примера важности этого понятия может служить *гексахлорбензол* (ГХБ). Гексахлорбензол известен как вещество, повсеместно распространенное в окружающей среде в течение многих лет. Оно относительно легко анализируется наряду с другими липофильными хлоруглеводородами. Благодаря фунгицидным свойствам гексахлорбензол

применяется для протравливания зерна, особенно пшеницы. Одно время он применялся и в качестве материала, понижающего горючесть пластмасс. В Австралии, например, в 1968 г. для протравливания пшеницы было использовано 200 т технического ГХБ.

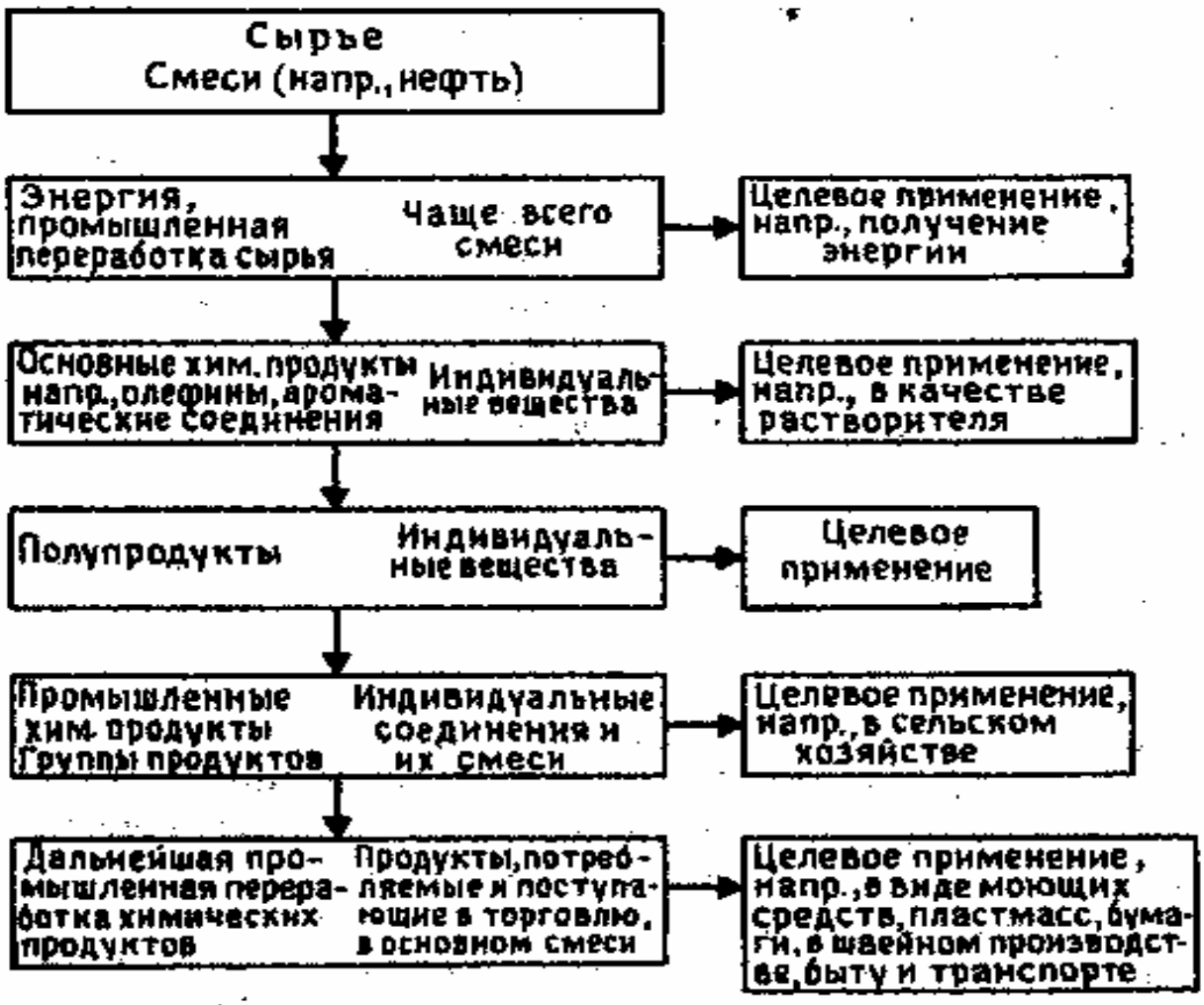


Рис. 8.1. Стадии и области применения химических продуктов

Хотя отсутствуют глобальные данные об использовании гексахлорбензола как фунгицида, можно полагать, что в таком качестве привносится лишь небольшая доля ГХБ, содержащегося в экосфере.

Для выявления основных источников его поступления необходимо знать количество ГХБ, присутствующего в *качестве примеси* в других пестицидах, например в пентахлорфеноле и пентохлорнитробензоле, а также его содержание в сточных водах производства хлора и процессов хлорирования, при обеззараживании воды хлором, а также при сжигании некоторых отходов. Перечисленные здесь источники загрязнения ГХБ показывают, что отходы производства, также как и продукты производства

следует рассматривать в соответствии с критерием «области применения». Этот критерий дает нам сведения о первично загрязненных объектах окружающей среды, а *отходы* следует в соответствии с этим же критерием классифицировать по их видам (стоки, отходящие в атмосферу газы, твердые отходы).

Таким образом, на примере гексахлорбензола становится очевидной связь между критерием «области применения» и обсуждаемыми ниже проблемами.

8.3. Распространение в окружающей среде

Рассмотренные выше критерии «объем производства» и «области применения» раскрывают технологические предпосылки появления химических продуктов в окружающей среде. Излагаемые в данном разделе подходы к оценке *распространения в окружающей среде* касаются, прежде всего, естественных природных процессов. Сюда входят физико-химические свойства веществ, физические процессы, связанные с их переносом, биологические процессы, принимающие участие в глобальных процессах круговорота веществ в природе, а также в циклических процессах, происходящих в отдельных экосистемах.

Причиной неконтролируемого глобального и регионального накопления химических продуктов является *их тенденция к распространению,* т. е. свойство выходить за пределы района их применения и тем самым появляться во всей окружающей среде. Это приводит к их непреднамеренному и, как правило, нежелательному накоплению. Насколько просто обосновать важность этих процессов для состояния окружающей среды, даже не принимая во внимание характер применения химических продуктов, настолько сложны и многообразны физические, химические и биологические механизмы, которые обусловливают такие процессы распространения.

Скорость первой стадии распространения, а именно *выход за пределы района применения,* зависит от вида применения, насколько оно является открытой или закрытой системой; кроме того, от физико-химических процессов, которые происходят на месте применения, от естественных процессов обмена между районом применения и прилегающей территорией, а также от химической структуры исследуемого вещества.

В этой связи в понятие «применение» входит также технология применения, например, осуществляется распыление пестицида с земли или с помощью авиации (соответственно техника с большим или малым хранилищем распыляемого вещества), наносится слой краски распылением или просто кистью. За счет таких отличий в технологии применения изменяется количество вещества, поступающее в

окружающую среду с места применения. Выход вещества за пределы места применения происходит также в виде твердых отходов или газов, уходящих в вентиляцию.

После того как химические материалы вышли за пределы района их применения, происходит их дальнейшее распространение, которое можно представить как негомогенное распределение. При открытом применении этот процесс зависит в основном от объема производства и устойчивости химических продуктов, что определяет обнаружение этих веществ повсеместно в результате *природных* процессов переноса.

Важными стадиями, определяющими подвижность и распределение посторонних в окружающей среде веществ, являются перенос (транспорт) между различными природными средами (водой, почвой и воздухом), их потребление и накопление в организмах, а также перенос веществ в этих средах, в частности живыми организмами.

8.4. Перенос между различными средами

На рис. 8.2 представлена схема процессов переноса веществ в экосфере. Распределение химических соединений между воздухом, водой и почвой происходит в соответствии с их физико-химическими свойствами, причем, разумеется, факторы окружающей среды играют здесь решающую роль. В настоящее время с помощью более или менее сложных математических моделей предпринимаются попытки заранее рассчитать концентрации этих веществ в соответствующих средах. В этих моделях учитываются такие физико-химические свойства химических веществ, как молекулярная масса, давление пара и растворимость в воде. Для прогноза концентрации в соответствующей среде вводится понятие *фугитивности* (летучести). Фугитивность определяют, как тенденцию вещества выйти из той фазы, в которой оно находится в данный момент; измеряют фугитивность в единицах давления (Па). Предполагается существование равновесия между химическим веществом, находящимся в различных контактирующих средах, что представляется маловероятным при взгляде на реальное положение в окружающей среде. В настоящее время имеются математические уравнения процессов перехода веществ из одной среды в другую, которые позволяют на основании физико-химических свойств веществ при определенных внешних условиях дать количественную оценку концентраций веществ и полупериода процесса переноса.

Перенос почва – вода. Перенос химических продуктов, загрязняющих окружающую среду, на границе раздела почва – вода играет важную роль в процессе загрязнения вод в результате применения химических препаратов или их поступления в почву с дождем, в

результате искусственного орошения и собственно переноса этих веществ в почве, например, в виде водных растворов. Загрязнение вод может происходить как водой, стекающей по поверхности почвы, так и водой, проникающей на всю глубину почвы при загрязнении грунтовых вод. Для всех переходов химических продуктов через границу почва – водная фаза основную роль играют процессы адсорбции.

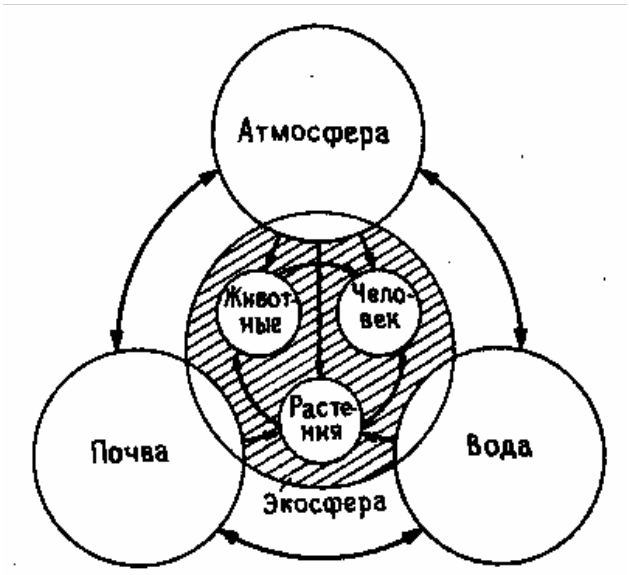


Рис. 8.2. Схема процессов переноса веществ в экосфере и вблизи ее

Адсорбцией, как известно, называют связывание молекул или атомов жидкой или газообразной фаз на поверхности твердых тел. *Коэффициент адсорбции* почвы определяется как отношение концентрации адсорбированного вещества на твердом теле к его концентрации в водном растворе в равновесном состоянии. Адсорбцию химических соединений в почве можно описать двумя способами – с помощью уравнения Ленгмюра и уравнения Фрейндлиха.

Уравнение адсорбции Ленгмюра (изотерма адсорбции) первоначально было предложено для описания адсорбции газов на твердых материалах; зависимость адсорбции от концентрации адсорбируемого вещества записывается следующим образом:

$$x/m = K_1 K_2 c_e / (1 + K_2 c_e), \qquad (8.1)$$

где x/m – отношение массы адсорбированного вещества к массе адсорбента,

K_1 и K_2 – константы, характеризующие рассматриваемую систему, c_e – равновесная концентрация вещества в растворе.

При выводе уравнения Ленгмюра предполагается, что теплота адсорбции не зависит от степени заполнения поверхности, иначе говоря, поверхность адсорбента предполагается однородной в энергетическом отношении. При выводе уравнения Фрейндлиха, напротив, предполагается, что вследствие гетерогенности адсорбирующей поверхности по мере увеличения заполнения адсорбента теплота адсорбции падает. *Уравнение изотермы адсорбции Фрейндлиха* записывается следующим образом:

$$x/m = K\, c_e^{1/n} \qquad (8.2)$$

Здесь *К* – безразмерная константа адсорбции, или коэффициент адсорбции. Показатель степени 1/n дает возможность оценить интенсивность адсорбции. Адсорбция многих органических соединений в почве подчиняется в большей степени уравнению Фрейндлиха; зависимость по Ленгмюру наблюдается значительно реже. Если представить уравнение Фрейндлиха графически в логарифмических координатах по оси *x*, то зависимость *x/m* от концентрации становится прямолинейной с наклоном *1/n*, а константа *К* определяется точкой пересечения этой прямой с осью ординат.

Поскольку в адсорбции в значительной мере участвует органическая составляющая почвы, часто оказывается целесообразным определение коэффициента адсорбции, отнесенного к органическому углероду, содержащемуся в почве (ОУ). Такой коэффициент адсорбции $К_{ОУ}$ записывается следующим образом:

$$К_{ОУ} = (К \cdot 100) / (\%ОУ). \qquad (8.3)$$

Однако загрязняющие окружающую среду химические соединения адсорбируются не только на органическом материале почвы, но и на минеральной фракции, причем эта часть суммарной адсорбции зависит от свойств почвы и структуры адсорбирующегося химического соединения. Адсорбция осуществляется не только связыванием поверхностью или взаимодействием между веществом и структурным скелетом почвы. В понятии адсорбции объединяются различные стадии процессов локализации химического вещества на отдельных участках поверхности и распределение адсорбирующегося вещества в объеме (водная фаза и органическое вещество почвы).

Когда надо подчеркнуть, что вещество полностью распределяется в объеме поглощающего сорбента, например в жидкой фазе, то применяют термин «абсорбция». Распределение поглощаемого вещества по поверхности внутренних пор в сорбенте описывают законами адсорбции.

Примером этого является древесный активированный уголь. Для увеличения пористости уголь пропаривают, удаляя смолообразные вещества, получая так называемый активированный уголь, который используют, например, в противогазах. Высвобождение связанного вещества называют десорбцией.

Десорбция адсорбированных веществ водой или солевыми растворами никогда не идет до конца. Это означает, что адсорбция обычно не полностью обратима. Расстояние между изотермами адсорбции и десорбции называют гистерезисом. Недесорбирующаяся часть состоит из прочно связанных молекул, которые можно снять с поверхности только интенсивной экстракцией органическими растворителями, и «неэкстрагируемого остатка». Последние могут быть, например, химическими веществами, которые получаются в результате реакций загрязняющих веществ с гуминовыми компонентами почвы с образованием ковалентных связей и их включением в полимерные макромолекулы гуминовых компонентов. Также может происходить необратимое встраивание загрязняющих веществ в слоистую структуру глинистых минералов или в пустоты гуминовых макромолекул.

В настоящее время предпринимаются попытки рассчитать коэффициент адсорбции химического вещества, пользуясь известной корреляционной зависимостью между коэффициентом адсорбции и коэффициентом распределения химических веществ в смесях *н*-октиловый спирт/вода (последние обычно используют в качестве меры полярности вещества). Такого рода корреляция, разумеется, верна только для тех адсорбированных химических соединений, которые в результате „распределения" обратимо накапливаются в липофильной органической составляющей почвы, и не пригодна для тех веществ, которые сорбируются минеральной фракцией почвы или ковалентно связываются гуминовой фракцией почвы. Поэтому корреляционные кривые между коэффициентами адсорбции и коэффициентами распределения *н*-октиловый спирт/вода, отнесенные к общей адсорбции, часто дают существенные отклонения.

Как известно, адсорбция играет основную роль в процессе *перемещения химических соединений в* почве, а также при их испарении из почвы и поглощении растениями. Адсорбция замедляет массоперенос в почве. Массоперенос растворенных химических веществ является функцией диффузии, конвекции и дисперсии веществ, а также их разложения абиотическими и биотическими реакциями.

Диффузия (диффузионный массоперенос) является физическим процессом, в ходе которого молекулы, атомы или ионы в результате теплового движения (броуновское движение) перемещаются из области большей концентрации в меньшую. Этот процесс происходит независимо от течения воды. Диффузионный массоперенос растворенных веществ в

свободном объеме жидкости представляет собой произведение (со знаком минус) коэффициента диффузии и градиента концентрации в направлении, перпендикулярном некоторой воображаемой плоскости раздела.

Коэффициент диффузии измеряется в $м^2/с$ и зависит как от молекулярных свойств растворенного вещества (например, относительной молекулярной массы и молярного объема), так и от свойств воды и других внешних условий. В пористом объеме почвы диффузия идет медленнее, чем в свободной жидкости. Сумма всех замедляющих диффузию факторов количественно оценивается *импедансом.* Последний является коэффициентом пропорциональности между коэффициентами диффузии, измеренными в почве и в свободной жидкости. Он изменяется в зависимости от вида растворенных молекул и типа почвы.

Конвекция (конвективный массоперенос) представляет собой принудительное перемещение растворенных веществ потоком воды. Она оценивается как произведение объемного потока воды (скорость фильтрации) и концентрации растворенных веществ в воде.

Дисперсией (дисперсионный перенос) называют перераспределение (соответственно перемешивание) растворенных веществ в движущейся в порах воде, вызванное неоднородностью поля скоростей потока в каждом отдельно взятом объеме воды в поре. Наряду с конвекцией дисперсия вносит свой вклад в общий массоперенос химических веществ в грунтовых водах, причем этот вклад зависит от скорости перемещения почвы. Дисперсия определяется как произведение (со знаком минус) объемного содержания воды в почве, градиента концентрации в перпендикулярном направлении к воображаемой плоскости раздела и дисперсионного коэффициента ($м^2/с$). Последний зависит от средней скорости движения воды в порах; коэффициент пропорциональности называют *дисперсионностъю* (м).

Сумму дисперсионного коэффициента и коэффициента диффузии в поровом пространстве почвы называют *гидродинамическим дисперсионным коэффициентом.*

Можно учесть также дополнительные, однако более сложно вычисляемые параметры, учитывающие подвижность химических соединений, определенную из натурных испытаний, например:

- сток, сопровождающийся смещением в сторону;
- подъем воды из глубины почвы, вызванный испарением с поверхности;
- проявления трехфазных равновесий между самим веществом, его водным раствором и тем же веществом, адсорбированным на различных компонентах почвы;

– перенос (транспорт) вдоль трещин, ходов дождевых червей и других макропор.

Эти параметры, зависящие от сложной комплексной структуры почвы, значительно затрудняют прогноз перемещения химических веществ через почву, например, в грунтовые воды. Это особенно относится к переносу через макропоры, называемому преимущественным потоком. Для каждого загрязняющего почву вещества, вымываемого из почвы, он (этот перенос) составляет определенную долю, не зависящую от, казалось бы, оказывающих влияние факторов.

Так как химические соединения, прежде чем они оказываются в фильтрационных или грунтовых водах, находятся в непосредственном контакте со структурными составляющими почвы, весьма вероятно, что в ней появляются водо-растворимые продукты превращений, образовавшиеся на основе ферментативных или абиотических реакций, причем их присутствие даже более вероятно, чем самого исходного вещества. Этот факт еще недостаточно учитывается при проведении анализа грунтовых вод. Поэтому перед анализом грунтовых вод на содержание какого-либо загрязняющего среду химического соединения необходимо выявить и провести анализ полярных продуктов превращений этого вещества, происходящих в почве.

Перенос вода – воздух. Переход вещества в природных условиях из водного раствора в атмосферу называют *летучестью;* этот процесс осуществляется в результате диффузии, обратный перенос называют *сухим осаждением* в воду; оба понятия относятся не к равновесным, а к динамическим процессам.

Скоростью улетучивания называют поток массы вещества, проходящий через границу вода – воздух; она определяется как количество вещества, проходящее через единицу площади в единицу времени. Эта скорость пропорциональна разности концентраций соответствующего вещества в обеих фазах

$$F = K \cdot c\,, \qquad (8.4)$$

где F – поток вещества, выраженный в единицах массы за единицу времени на единицу площади; с – разность концентраций вещества в воде и газовой фазе. Коэффициент пропорциональности K называют *общей скоростью переноса* (в литературе встречается также определение – *коэффициент общего переноса)*, он имеет размерность скорости, например см/с или м/ч. Если обозначить исходную концентрацию вещества в воде c_Q, а начальную концентрацию в воздухе принять равной нулю – ситуация, которая наблюдается в случае однократного загрязнения вод, то концентрация в водном растворе экспоненциально уменьшается во времени в соответствии с

кинетическим уравнением реакции 1-го порядка

$$c = c_o \exp(-Kt / L) \ , \qquad (8.5)$$

где L – глубина относительно поверхности воды; t – время.

Предпосылкой такого поведения является то обстоятельство, что концентрация в газовой фазе заведомо значительно ниже, чем в водной фазе, что практически всегда имеет место в открытых системах окружающей среды. Определяемое из уравнения (8.5) «время полупревращения» $t_1/_2$ представляет собой количественную оценку летучести, так как оно не зависит от исходной концентрации. Величину, обратную скорости общего переноса *К, называют сопротивлением общего переноса* R; оно представляет собой сумму всех сопротивлений процесса переноса вещества через поверхность раздела фаз. *Сопротивление жидкой фазы* r_1 является обратной величиной по отношению к *скорости переноса в жидкой фазе* k_1

$$r_1 = 1 / k_1 \ . \qquad (8.6)$$

Сопротивление газовой фазы равно

$$r_g = (R \cdot T) / (k_g \cdot H) \ , \qquad (8.7)$$

где R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура; k_g – *скорость переноса в газовой фазе;* H – константа Генри.

Таким образом, скорость общего переноса К равна

$$K = (1 \backslash k_1 + RT / k_g H)^{-1} \ . \qquad (8.8)$$

Константа Генри H играет важную роль при описании процесса испарения вещества из водного раствора. Обычно она определяется как отношение концентраций в газовой и водной фазах и является безразмерной величиной. Однако в литературе указывается, что константу Генри можно приближенно вычислить как отношение давления насыщенного пара вещества к его максимальной растворимости в воде, поскольку эти величины довольно легко измерить. Это относится также и к величине H в уравнениях (7) и (8). Заменив концентрацию в газовой фазе на давление, получим приближенную константу Генри в размерности (давление)•(объем)•(моль)$^{-1}$. Разумеется, такое приближение

верно только в случае ограниченной растворимости в воде и при соблюдении условий выполнения законов идеальных газов (случай большого разбавления).

Эту приближенную константу Генри в уравнениях (8.7) и (8.8) можно заменить на произведение безразмерной константы Генри и RT.

Если значение приближенной константы Генри превышает 500 Па·м^3/моль, что свойственно, например, веществу с высоким давлением пара и/или низкой растворимостью в воде, то правое слагаемое в скобках уравнения (8) становится существенно меньше левого, и летучесть зависит только от значения k_1, т. е. *определяется только жидкой фазой.* Этому случаю соответствуют, например, легколетучие растворители. Так как k_1 мало зависит от свойств вещества, а определяется в основном внешними условиями, летучести веществ, контролируемые жидкой фазой, при одинаковых внешних условиях мало отличаются друг от друга, даже если давление их пара отличается на порядок. Однако, если константа Генри ниже 0,5 Па·м^3/моль, что характерно для веществ с низким давлением пара и/или высокой растворимостью в воде, левый член уравнения в скобках (8) становится малым по сравнению с правым, что равносильно тому, что летучесть *контролируется газовой фазой* и в значительной мере определяется константой Генри, т. е. давлением пара и растворимостью в воде.

Скорости переноса k_l и k_g зависят от внешних условий окружающей среды, особенно от скорости ветра и турбулизации воды, а k_l – также и от температуры. Их зависимость от свойств вещества сводится главным образом, как и в случае диффузии, к зависимости от молекулярной, массы и молярного объема. Эти величины для органических соединений редко отличаются более чем на несколько порядков, вследствие чего зависимость скорости переноса от свойств вещества резко ограниченна. Количественное выражение зависимости k_l и k_g от коэффициентов диффузии, скорости ветра, турбулизации и т. п. может быть дано на основе различных физических моделей, которые мы здесь не рассматриваем.

С помощью установленных выше физических закономерностей вместо экспериментальных измерений летучесть многих химических веществ из водного раствора можно достаточно точно рассчитать. Для получения приближенных данных необходимо знать только максимальную растворимость и давление насыщенного пара, так как ввиду малых вариаций для широкого спектра веществ скорости переноса можно получить экстраполяцией по известным значениям параметров модельных веществ (кислорода, диоксида углерода, воды). Однако экспериментальное определение летучести становится необходимым, если:

– растворимость в воде и/или давление насыщенного пара с трудом поддаются экспериментальному определению;

– вещество полностью растворимо, но при этом легко улетучивается из воды (например, ацетон);
– можно ожидать взаимодействий с другими содержащимися в воде веществами.

Сухое осаждение химических соединений из воздуха в воду происходит в соответствии с теми же закономерностями, что и для летучести, только в противоположном направлении.

Наряду с летучестью веществ из воды и их сухого осаждения из атмосферы в воду существуют еще и другие пути для материального обмена между водой и воздухом, – например, разбрызгивание ветром воды в море, влажное осаждение и удаление из атмосферы с дождем. Доля таких путей переноса в общем обмене химическими веществами между водными бассейнами и атмосферой зависит от географического положения и климатических условий, а также от физико-химических свойств этих веществ.

Перенос почва – воздух. В отличие от рассмотренных выше путей переноса транспортные процессы между почвой и воздухом оказываются самыми сложными, так как здесь большое значение имеют обменные процессы жидкость/твердая фаза, жидкость/газ и твердая фаза/газ.

Переход вещества из почвы в атмосферу путем диффузии в природных условиях называют *летучестью из* почвы, а обратный процесс – *сухим осаждением в почву.*

Прежде чем начать обсуждение процесса летучести химических веществ из почвы, следует вкратце рассмотреть *летучесть самих этих веществ.* Улетучивание идет аналогично улетучиванию химических соединений из водных растворов, уравнения (8.4) и (8.8), причем сопротивление жидкой фазы l/k_{i} принимается равным нулю, растворимость в воде (s, моль/м^3) – равной 10^6, а разность концентраций (c, г/м^3) – равной 10^6. Тогда летучесть чистого вещества равна

$$F = k_{\mathrm{g}}\, p\, M_{\mathrm{r}} / \mathrm{R\,T}\ , \qquad (8.9)$$

где k_g – скорость переноса в газовой фазе, p – давление насыщенного пара; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура; $M_г$ – молекулярная масса. Накопление чистого вещества в окружающей среде происходит довольно редко, так что уравнение (8.9) в такой форме применяется мало.

Для химических веществ, *адсорбирующихся на сухой поверхности почвы,* уравнение (8.9) применимо, если вместо давления насыщенного пара чистого вещества подставить давление пара адсорбированного вещества. В области очень малых концентраций (млн.$^{-1}$) давление пара адсорбированных

почвой веществ заметно снижено; с увеличением концентрации увеличивается и давление пара, причем при некоторой концентрации, величина которой зависит от природы вещества и почвы, это давление пара становится равным давлению насыщенного пара чистого вещества. Если потеря вещества с гладкой плоской поверхности с равномерным заполнением постоянна во времени, то для почвы такая закономерность не выполняется, так как почва шероховата и обладает сложной структурой, ее заполнение веществом неравномерно, и снижение концентрации в почве может привести к снижению давления пара. Летучесть химических соединений из почвы происходит, поэтому так же, как и из водных растворов, в соответствии с кинетическим уравнением первого порядка.

Летучесть с влажной поверхности почвы существенно выше, чем с сухой. В настоящее время показано, что это явление нельзя свести к соиспарению, которое происходит при более высоких температурах и концентрациях благодаря взаимному влиянию воды и испаряющегося вещества. Вынос молекул воды и химического соединения из почвы происходит независимо друг от друга. Это легко обнаруживается благодаря тому, что скорость летучести химического продукта не изменяется, в то время как летучесть воды в атмосферу, насыщенную парами воды, подавляется; при этом поверхность почвы должна оставаться влажной. Увеличение летучести из влажной почвы по сравнению с сухой в большей степени объясняется частичной десорбцией химических соединений при их вытеснении водой. Этот факт указывает также на то, что летучесть химических соединений с влажной поверхности почвы происходит преимущественно из жидкой фазы.

Химические вещества, которые *внесены в толщу* почвы, переносятся из более глубоких слоев к обедненному слою, и этот процесс становится фактором, лимитирующим скорость испарения, если испаряющееся вещество имеет относительно более высокую константу Генри (например, линдан). Для веществ с малой константой Генри (например, прометокс), напротив, происходит обогащение им поверхности почвы. При переносе растворенных посторонних окружающей среде веществ из нижних слоев почвы в верхние диффузия играет существенную роль только в том случае, если речь идет о газах и легколетучих веществах. Большей частью перенос вверх происходит за счет конвекции и капиллярных сил. Этот эффект называют «фитильным».

Летучесть химических веществ из почвы в атмосферу, разумеется, зависит и от других условий окружающей среды, например свойств почвы, температуры и скорости ветра. Сухое осаждение химических веществ из атмосферы на почву происходит по тем же законам, что и испарение из почвы.

Другим путем уноса вещества из почвы в атмосферу является перенос с пылью (ветровая эрозия), а в обратном направлении – влажным

осаждением, например при их осаждении из воздуха дождем. Так же, как в случае перехода вода/воздух, доля каждого направления переноса зависит от физико-химических свойств вещества, а также типа почвы и климатических условий.

8.5. Поступление и накопление в живых организмах

В принципе любое химическое вещество поглощается и усваивается живыми организмами. Равновесное состояние или состояние насыщения в процессе усвоения достигается в том случае, если его поступление и выделение из организма происходят с одинаковой скоростью; установившаяся при этом в организме концентрация называется концентрацией насыщения. Если она выше наблюдающейся в окружающей среде или продуктах питания, говорят об *обогащении* или *аккумуляции* (накоплении) в живом организме.

Обогащение организмов элементами или веществами по отношению к их содержанию в окружающей среде является одной из основных функций любого живого организма. Ее характер зависит от вида организма и является одним из важных свойств, определяющих разнообразие живых организмов в биосфере. В качестве примера такой биоаккумуляции веществ в табл. 8.2 представлены данные о концентрации ряда элементов в тканях рачка *Calanus finmarchicus* с их содержанием в окружающей среде – воде.

Под *коэффициентом обогащения* или *аккумуляции,* вообще говоря, понимают отношение концентрации вещества в организме к концентрации того же вещества в окружающей среде или в пище. Коэффициент аккумуляции ниже 1 можно представить себе как абиотическое накопление данного вещества в окружающей среде.

Коэффициент аккумуляции более 1 указывает, как видно из представленного выше примера, на обогащение живого организма. Из всех представленных в таблице элементов наибольшее обогащение *Calanus finmarchicus* наблюдается по фосфору.

Не используемые организмами природные вещества либо не активны и не потребляются организмом, либо в ходе эволюции у организма сложились механизмы его синтеза или выделения, либо вещества хорошо усваиваются организмом, но образуют в нем индифферентный балласт. В высших организмах не существует специфических механизмов количественного удаления органических ксенобиотических соединений, поэтому возможно отложение, например, липофильных веществ в жире. Аккумулирование вредных веществ является нежелательным процессом, так как может оказать отрицательное воздействие на человека и другие живые организмы. Ниже будут обсуждены процессы аккумуляции

водными и наземными живыми организмами.

Таблица 8.2

Сравнение содержания химических элементов в морской воде и теле рачка *Calanus finmarchicus*

Химические элементы	Морская вода, масс.%	*Calanus finmarchicus*, масс.%	Коэффициент обогащения	
Кислород	85,966	79,99	0,93	Меньше у *Calanus*
Водород	10,726	10,21	0,95	
Хлор	1,935	1,05	0,54	
Натрий	1,075	0,54	0,50	
Магний	0,130	0,03	0,23	
Сера	0,090	0,14	1,6	Больше у *Calanus*
Кальций	0,042	0,04	1,0	
Калий	0,039	0,29	7,4	
Углерод	0,003	60	2000	
Азот	0,001	1,52	1500	
Фосфор	<0,0001	0,13	20000	
Железо	<0,0001	0,007	1500	

Водные организмы. Ниже приводятся понятия, используемые при обсуждении процессов усвоения и накопления химических веществ в водных организмах:

– *биоконцентрирование* – обогащение химическим соединением организма в результате прямого восприятия из окружающей среды, без учета загрязнения питания;

– *биоумножение* – обогащение организма химическим соединением непосредственно в результате питания. В природной водной среде этот процесс идет одновременно с биоконцентрированием;

– *биоаккумуляция* – обогащение организма химическим веществом путем его потребления из окружающей среды и питания;

– *биоконцентрирование, биоумножение и биоаккумуляция* оцениваются соответствующими *коэффициентами обогащения*;

– *экологическое обогащение* – прирост концентрации какого-либо вещества в экосистеме или цепи питания при переходе от низкого к более высокому трофическому уровню.

Кинетика *биоконцентрирования* химических веществ из водной среды живым организмом описывается следующими уравнениями:

$$dC_A/dt = K1 \cdot c_w - K_2 \cdot c_A ; \quad (8.10)$$

$$C_{At} = K_1/K_2 \cdot c_w(1-e^{-K_2 t}) ; \quad (8.11)$$

$$C_{At} = K_1/K_2 \cdot c_w = КБК \cdot c_w , \quad (8.12)$$

где C_A – концентрация вещества в организме (нг/г); t – время (сут); K_1 – константа скорости потребления (сут. $^{-1}$), c_w – концентрация вещества в воде (нг/г); K_2 – константа скорости выделения (сут.$^{-1}$); C_A – равновесная концентрация вещества в организме (нг/г); КБК – коэффициент биоконцентрирования.

На рис. 8.3 представлено изменение концентрации вещества в водном организме в зависимости от времени. Концентрация представлена как процент от равновесного значения, время выражено $t_{1/2}$ – временем полупревращения.

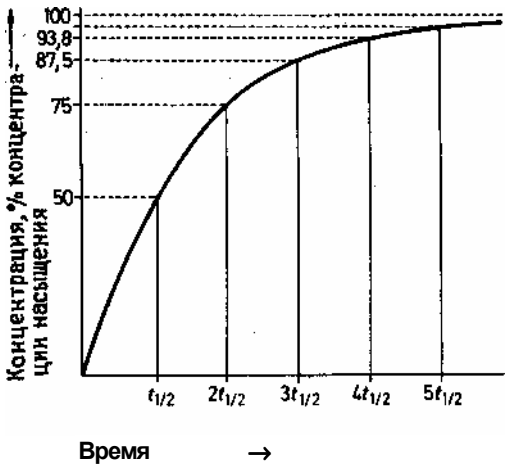


Рис. 8.3. Зависимость концентрации вещества в организме при его усвоении из воды от времени, выраженная как доля (%) концентрации насыщения относительно времени, где $t_{1/2}$ – время полупревращения

Коэффициенты биоконцентрирования различных химических соединений в водных организмах различаются по крайней мере на 5 порядков (т. е. в 100000 раз) в зависимости от физико-химических свойств соответствующего соединения. Важнейшим из них является коэффициент распределения в смеси *н*-октиловый спирт/вода, коррелирующий с

коэффициентом биоконцентрирования. Важнейшим свойством живого организма, связанным с биоконцентрированием является содержание в нем липидов. На рис. 8.4 показан пример корреляции коэффициента биоконцентрирования 1,2,4-трихлорбензола и содержания липидов у различных видов, рыб. Эта прямая зависимость указывает на то, что коэффициент биоконцентрирования у всех видов рыб примерно один и тот же, если отнести его не к общей массе рыб, а только к содержанию в ней липидов. Логарифм этого коэффициента биоконцентрирования, отнесенного к содержанию липидов, примерно равен логарифму коэффициента распределения в смеси *н*-октиловый спирт/вода. Хотя биоконцентрирование определяется и другими факторами, такими как специфическими биохимическими реакциями и селективной проницаемостью мембран, представленные здесь примеры указывают на то, что процессы накопления липофильных химикатов из воды в основном представляют собой процесс распределения между водной фазой и липидной фракцией организмов.

Биоумножение, т. е. обогащение веществом из загрязненного питания, в водных средах играет подчиненную роль по сравнению с биоконцентрированием. Вследствие этого в водных средах не было выявлено *экологического обогащения,* т. е. обогащения организмов с повышением трофического уровня в различных звеньях цепи питания. Если в конце цепи питания (например, у хищных рыб) обнаруживают более высокие концентрации некоторых вредных веществ, чем в начале такой цепи (в фитопланктоне), то это можно объяснить видоспецифическими различиями процесса биологического концентрирования веществ из воды.

Наземные организмы. В отличие от водных организмов у наземных животных биоаккумуляция происходит в основном за счет питания.

Усвоение химических веществ из почвы *дождевыми червями* не всегда приводит к обогащению их организма химикатами. Вследствие тесного контакта внешней поверхности дождевых червей с почвой химические вещества усваиваются ими не только орально (через пищевой тракт). Процесс поступления веществ из почвы через поверхность тела происходит, вероятно, из почвенных растворов и описывается аналогично процессу накопления у водных организмов. Насколько усвоение вредных веществ приводит к обогащению ими организмов, зависит как от физико-химических свойств веществ, так и от окружающей среды, и в особенности от типа почвы.

У наземных *высших животных* коэффициенты накопления, установленные в модельных опытах, при изучении концентрации постороннего вещества, добавленного в питание, его концентрации в организме в целом и отдельно в жировых тканях также коррелируют с коэффициентом распределения этого вещества в смеси *н*-октиловый спирт/вода. Однако на корреляционной кривой наблюдается

значительный разброс данных вследствие некоторых превращений веществ в организме. Для человека также существует такая корреляция. Она была установлена при анализе полного дневного рациона (исследование совокупной диеты), при сопоставлении концентрации посторонних веществ в продуктах питания и жировых тканях человека.

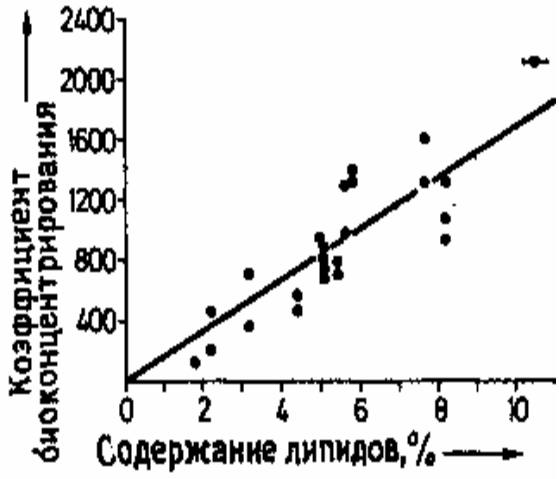


Рис. 8.4. Корреляционная зависимость коэффициента биоконцентрирования от содержания липидов, отнесенного к массе рыб, для трихлорбензола по результатам исследований восьми видов рыб

Экологическое обогащение, т. е. повышение обогащения в каждом трофическом звене цепи питания, для наземных животных также сомнительно, поскольку, как уже упоминалось для водных животных, повышение содержания посторонних веществ в конце цепи питания, возможно, обусловлено различиями видоспецифических механизмов усвоения и выделения. Для диких животных очень трудно выяснить хотя бы состав их ежедневного питания, которое изменяется в зависимости от времени года, возраста, размеров животного и его жизненного пространства. Соответственно еще сложнее оценить содержание посторонних веществ в их питании. Однако также трудно проводить опыты с контролируемым кормлением животных пищей с известной концентрацией вредных веществ. Предположение о том, что высокое содержание хлорированных углеводородов в тканях птиц, питающихся падалью, прямо связано с их положением по цепи питания, встретило ряд возражений.

У наземных высших растений установлено обогащение за счет химических веществ, содержащихся в почве. Однако это оказалось

верным только для некоторых химических соединений и видов растений. В отличие от обогащения водных организмов за счет поглощения из водной среды здесь коэффициент аккумуляции варьирует не более чем на порядок. Тем не менее этот процесс имеет большое значение в накоплении химических веществ в растительных продуктах питания, их усвоении растительноядными животными и возможным экологическим усилением обогащения. Пути усвоения химических веществ растениями из почвы весьма многообразны. Существует несколько путей усвоения и перераспределения химических веществ из почвы в высшие растения:

– усвоение корневой системой и перенос в наземную часть растения сокодвижением;
– усвоение листьями летучих химических веществ, выделившихся из почвы;
– усвоение листьями химических веществ из частиц почвы и пыли.

Средняя концентрация в растении представляет собой результат комбинации различных путей поступления в него посторонних веществ.

Каждый из упомянутых путей по-разному связан с физико-химическими свойствами вещества. Усвоение корнями положительно коррелирует с веществами, растворенными в жидкой фазе почвы, и отрицательно – с адсорбционными коэффициентами почвы и коэффициентом распределения *н*-октиловый спирт/вода, т. е. проявляется влияние типа почвы на характер усвоения. Однако перенос растворенного вещества из корневой системы положительно коррелирует с коэффициентом распределения в системе *н*-октиловый спирт/вода, иначе говоря, неполярные вещества легче усваиваются из почвенного раствора, чем полярные. Перенос усвоенных корневой системой веществ в наземную часть растения происходит легче всего для химических соединений средней полярности. Усвоение листьями из воздуха веществ, выделившихся из почвы, определяется липофильными свойствами тканей, что опять-таки положительно коррелирует с коэффициентом распределения в смеси *н*-октиловый спирт/вода. Корреляция общего аккумулирования, которое представляет собой сумму всех стадий процесса, таким образом, зависит от физико-химических свойств вещества, вклада каждой стадии в процессе усвоения и вида растения. Суммарное аккумулирование также хорошо коррелирует с молекулярной массой вредного вещества (например, в случае ячменя). Таким образом, необходимо еще более глубокое исследование законов усвоения химических веществ растениями из почвы для того, чтобы можно было прогнозировать содержание химических веществ в растительных продуктах питания, зная их концентрацию в почве.

8.6. Географический и биотический перенос

После того как произошло распределение поступивших в окружающую среду химических веществ между воздухом, водой и почвой необходимо проследить их дальнейший перенос на более или менее далекие расстояния в результате действия различных физических факторов. Такой перенос называют *географическим.* Наряду с ним имеется также *биотический перенос* живыми организмами, в которых прошло биологическое накопление вредных веществ. В большинстве случаев географический перенос преобладает над биотическим и осуществляется главным образом через атмосферу и воду.

Атмосферный перенос – важнейший путь перемещения химических веществ в окружающей среде. Процессы перемешивания и переноса в тропосфере происходят быстро; обмен между тропосферой и стратосферой длится в течение нескольких лет. Атмосферный перенос локального масштаба происходит в течение минут, регионального – от часов до нескольких суток, а для глобального переноса необходимо время от нескольких суток до нескольких недель. Количественная оценка и прогноз переноса в воздухе на расстояние местного масштаба возможны, если имеется информация о вертикальной структуре атмосферы и господствующих ветрах. При этом должен также учитываться перенос пыли. Для регионального переноса этого уже недостаточно, так как за тот период времени, который необходим для переноса химических веществ на расстояние порядка нескольких сот километров, погодные условия могут измениться. Здесь следует привлечь общие циркуляционные модели, которые, правда, до настоящего времени не разработаны на таком уровне, чтобы на их основе можно было бы сделать точные расчеты. Глобальный перенос еще труднее оценить количественно; здесь можно привлечь лишь данные о средних скоростях перемешивания в больших регионах. Время полного перемешивания в пределах полушария составляет от половины до трех месяцев, а перемешивание между полушариями длится примерно один год.

Нормальная *океаническая циркуляция* имеет определенное значение для глобального переноса, однако только на периоды порядка нескольких лет. *Водный перенос реками* не имеет существенного значения для регионального распределения, в то время как поверхностные и подпочвенные воды необходимо учитывать при оценке локального распределения вредных химических веществ в окружающей среде; перенос тонких частиц осажденных веществ водой также следует учитывать для подобного рода исследований.

Перенос химических соединений в почве по сравнению с переносом в воздухе и воде происходит очень медленно. Так как он осуществляется

главным образом в водных средах, мы уже рассматривали его ранее.

Биотический перенос химических веществ организмами после их потребления и аккумулирования происходит в результате активного перемещения животных, а также при передаче по цепи питания (см. главу 1). К этому процессу относится и вторичное перемещение водными червями веществ, оказавшихся в донных осадках, и деятельность человека, в особенности если рассматривать хозяйственно важные материалы, так, например, сельскохозяйственные продукты перемещаются на локальные и региональные расстояния.

8.7. Устойчивость и способность к разложению

Понятие «устойчивость» в зависимости от контекста можно трактовать различным образом. Впервые оно было использовано для так называемых хлоруглеводородных пестицидов, а также применялось ФАО/ВОЗ без специального определения при разъяснении понятий, связанных с определением различных остатков пестицидов. Обычно под устойчивостью понимают *устойчивость* (стабильность, стойкость) *органических соединений в окружающей среде.* Для каждой специфической среды экосферы устойчивость характеризует свойство вещества, определяющее длительность его пребывания в этой среде, прежде чем оно физически выводится из нее или претерпевает химические превращения. «Устойчивыми» принято считать такие вещества, которые не разлагаются при проведении рекомендованного БЭС теста на «быструю разлагаемость».

В принципе необходимо различать целевую, желательную, и нежелательную устойчивость вредного вещества. *Целевая устойчивость* химического вещества является предпосылкой для его технологического применения. Так, в определенных областях применения ее повышают, например, введением стабилизаторов в смазочные материалы. При различных технологических применениях устойчивость обязательно должна сохраняться на тот период времени, который совпадает с установленным сроком применения. Например, для пластмасс, лаков и красок, используемых в строительстве, желательна как можно большая устойчивость, т. е. минимальные химические изменения под влиянием окружающей среды, а вот поверхностно-активные вещества должны обладать наименьшей устойчивостью в процессе применения. Разумеется, желательна по возможности высокая устойчивость всех материалов на период их хранения перед применением.

Нежелательная устойчивость свыше срока применения в принципе различна для неорганических и органических веществ. Все неорганические химические продукты вследствие абсолютной

устойчивости их элементов в соответствии с приведенными выше критериями являются нежелательно устойчивыми, если их назначенный срок применения ограничен во времени.

Для пестицидов в 1971 г. IUPAC было определено понятие *нежелательная устойчивость*: «Вещество имеет нежелательную устойчивость, если его измеримые количества продолжают существовать в какой-либо химически определяемой форме». Оптимальный химический продукт, очевидно, имеет только такую устойчивость, которая обеспечивает выполнение его функций, а затем вещество разлагается, не оставляя после себя никаких остатков. Ввиду того что такое условие труднодостижимо, всегда необходимо сочетать периодичность применения с длительностью действия.

Для всех антропогенных посторонних веществ справедлив принцип, в соответствии с которым *устойчивость продуктов превращения* является составной частью устойчивости самого продукта. Так как превращения в биотических и абиотических условиях рассматриваются отдельно, здесь следует лишь упомянуть, что устойчивость применяемого химического продукта желательна исключительно для какой-либо определенной цели его назначения.

Поскольку не существует какой-либо определенной меры устойчивости, можно лишь сравнительно оценивать эти характеристики химических продуктов. Важное значение имеет не только сумма для оценки относительной устойчивости органических химических веществ возможных биотических и абиотических воздействий окружающей среды, но и их структура.

Неразветвленные алкильные группы менее устойчивы, чем разветвленные, алкены менее устойчивы, чем алканы, а алканы менее устойчивы, чем ароматические соединения, причем с увеличением числа замещенных групп в ароматическом соединении их устойчивость возрастает; такие группы, как галогены в ароматических соединениях, в особенности фтор и хлор, повышают устойчивость соединения в большей степени, чем алкилы; триазиновые ядра оказываются более устойчивыми, чем бензольные и т.д.

Только *минерализация,* т. е. разложение органических соединений до диоксида углерода, воды и других небольших неорганических молекул, таких как CO, HC1, NH_3 и т. п., окончательно выводит их из окружающей среды. Насколько быстро и каким путем происходит минерализация органических продуктов после их применения и рассеяния, зависит не только от их химической структуры, качественной и количественной способности окружающей среды для их разложения, но, прежде всего от физических условий.

Основным путем полного разложения посторонних органических веществ является их биологическая минерализация в обычной почве и

водных средах, т.е. биохимическим способом. Почти всегда она осуществляется определенной группой микроорганизмов, которые оказываются способными включать эти посторонние вещества в свои метаболические процессы, т. е. использовать их в качестве единственного источника углерода для питания. Изменение во времени выделения диоксида углерода из органического вещества очень часто, особенно в почве, описывается сигмаобразной кривой. За периодом очень малой скорости разложения (*lag*-фаза), необходимым для адаптации микрофлоры к постороннему веществу, следует фаза быстрого разложения, подчиняющаяся кинетическому уравнению первого порядка. Ее сменяет третья фаза относительно медленного разложения, при котором концентрация субстрата уже недостаточна для поддержания микробного метаболизма. Диффузия субстрата в почву также может оказаться лимитирующим фактором во время третьей фазы разложения. Полная минерализация субстрата, по крайней мере в почве, почти никогда не достигается, всегда имеется остаточная концентрация, величина которой зависит от исходной концентрации.

В табл. 8.3 представлены данные о количестве диоксида углерода, выделяющегося в течение определенного времени из некоторых посторонних для окружающей среды веществ в процессе их минерализации. Можно видеть, что минерализация через пять дней может дойти до 70% (мочевина, анаэробные условия) и составить менее 0,1% (2,6-дихлорбензонитрил и гексахлорбензол). Разница в выделении CO_2 в аэробных и анаэробных условиях довольно мала. Однако следует иметь в виду, что в анаэробных условиях в качестве побочного продукта может образовываться метан, поэтому в анаэробных условиях скорость разложения может оказаться выше, чем это показано в табл. 8.3.

Минерализация органических веществ, загрязняющих окружающую среду, может происходить также абиотическим путем. Например, пески могут катализировать разложение адсорбированных хлорированных углеводородов. Эта реакция идет и в темноте, т. е. не относится к классу фотохимических реакций. Механизм реакции до настоящего времени неизвестен.

Подвижность и устойчивость посторонних веществ тесно связаны с процессами их превращений в биотических и абиотических условиях в окружающей среде, которые определяющим образом влияют на устойчивость и в значительной степени на тенденцию к рассеянию.

Таблица 8.3

Аэробное и анаэробное разложение химических продуктов, поступающих в окружающую среду, в почвенной суспензии

Вещество, введение по 15 мкг	Длительность опыта, сут.	Условия опыта	CO_2 через 5 сут, %*	CO_2 по окончании опыта, сумма, %	Остаток в воде после опыта, % *
Мочевина	5	Аэроб.	66,3	66,3	25,3
		Анаэр.	70,1	70,1	18,0
Метанол	5	Аэроб.	53,4	53,4	15,0
		Анаэр.	46,3	46,3	13,6
Анилин	56	Аэроб.	17,4	26,5	13,1
		Анаэр.	Не опр.	11,9	28,8
Додецилбензол-сульфонат	42	Аэроб.	13,8	40,6	7,5
		Анаэр.	26,0	51,9	20,2
Диэтилгексил-фталат	56	Аэроб.	5,6	11,6	14,4
		Анаэр.	2,9	8,1	14,3
Фенантрен	14	Аэроб.	3,0	7,2	0,1
		Анаэр.	4,2	6,3	0,4
Трихлорэтилен	14	Аэроб.	1,8	3,5	12,4
		Анаэр.	2,5	4,2	11,0
п-Хлоранилин	56	Аэроб.	1*	3,0	14,6
		Анаэр.	Не опр.	2,3	22,1
Линдан	42	Аэроб.	0,4	1,9	3,1
		Анаэр.	0,4	3,0	2,2
ДДТ	42	Аэроб.	од	0,8	2,4
		Анаэр.	0,03	0,7	2,0
Антрацен	14	Аэроб.	0,1	1,3	1,6
		Анаэр.	0,3	1,8	1,8
2,4-D (дихлорфенокси-уксусная к-та)	14	Аэроб.	0,1	0,5	89,1
		Анаэр.	0,2	0,7	83,4
2,6-Дихлорбен-зонитрил	42	Аэроб.	Не об.	0,5	38,9
		Анаэр.	Не об.	Не об.	36,8
Гексахлорбензол	14	Аэроб.	Не об.	0,4	1,9
		Анаэр.	Не об.	0,2	2,1

*** – %** указан относительно введенного количества.

8.8. Превращения

Превращения посторонних химических веществ – это изменения их химической структуры под воздействием факторов окружающей среды. Если речь идет об абиотических факторах воздействия (кислород, свет и т.д.), то говорят об *абиотических превращениях.* Если превращения вызываются живыми организмами или продуцируемыми ими ферментами, то говорят о *биотических* или *биотехнологических превращениях.* Биотехнологические превращения посторонних химических веществ часто называют в экологической химии «метаболизмом вредных веществ», а продукты превращения – метаболитами.

8.9. Абиотические превращения. Окислительные процессы

Абиотические окислительные процессы, которым подвергаются химические вещества в окружающей среде, – это реакции с молекулярным кислородом (автоокисление), но особенно реакции с «реакционноспособными кислородными радикалами», которые образуются и накапливаются в атмосфере и в водах при протекании фотохимических реакций, а частично при участии ферментов. Существуют атомы кислорода O, озон O_3, синглетный кислород O_2, радикал пероксида $HO_2\cdot$ и др. Перед тем как начать рассматривать реакции веществ с активными радикалами, следует вкратце остановиться на *автоокислительных процессах* с молекулярным кислородом.

Молекула кислорода, как известно, представляет собой бирадикал и реагирует с органическими соединениями, если для них выполняются определенные физико-химические условия по реакции

$$RH + O_2 = ROOH.$$

Этот вид *окислительных реакций,* которые могут идти в мягких условиях, называют автоокислением; реакции имеют следующий радикальный механизм

$$RH \xrightarrow{-H^{\cdot}} R^{\cdot}$$
$$R^{\cdot} + {}^{\cdot}O - O^{\cdot} \longrightarrow R - O - O^{\cdot}$$
$$R - O - O^{\cdot} + RH \longrightarrow R - OOH + R^{\cdot}$$

Обрыв цепной реакции происходит главным образом в результате взаимодействия радикалов – продолжателей цепи R• и R–O–O•. Автоокисление ускоряется пероксидами и следовыми количествами

ионов металлов. Каталитическое действие ионов металлов объясняется образованием радикалов при их взаимодействии с пероксидами

$$ROOH + M^{+} \longrightarrow RO^{\cdot} + OH^{-} + M^{2+}$$
$$ROOH + M^{2+} \longrightarrow ROO^{\cdot} + H^{+} + M^{+}$$

Селективность радикала пероксида вследствие его низкой реакционной способности ($D_{НОО\text{-}Н}$ = 375,9 кДж/моль) довольно велика. Он разрывает прежде всего менее прочные связи С–Н. В природе автоокисление наблюдается довольно часто, например при прогоркании жиров и масел, а также при старении каучука.

Автоокисление липидов может ускоряться посторонними для окружающей среды веществами (например, ДДТ). Автоокисление происходит также и в почве, где оно вызывает абиотическую поликонденсацию мономеров и предшественников гуминовых веществ. Если в этот процесс поликонденсации включаются посторонние вещества, то образуются так называемые связанные остатки.

Под влиянием коротковолнового УФ-излучения из молекулярного кислорода образуется *атомарный кислород* О. Этот процесс происходит в верхних слоях атмосферы (вне тропосферы). Минимальная энергия, необходимая для диссоциации, равна 501,9 кДж/моль и соответствует длинноволновой границе диапазона излучения 242 нм. Образовавшийся таким образом атомарный кислород находится в электронно-возбужденном состоянии $O(^1D)$ и при столкновении с другими молекулами (например, N_2) очень быстро возвращается в устойчивое основное состояние $O(^3P)$.

Образование атомарного кислорода в атмосфере вблизи от поверхности земли (здесь его концентрация оценивается как 10^{-8} млн.$^{-1}$) происходит в результате фотодиссоциации диоксида азота.

Реакции посторонних для окружающей среды веществ с атомами кислорода $O(^3P)$ происходит в атмосфере в очень небольшом объеме, в основном в соответствии с уравнением реакции

$$O + O_2 + M \rightarrow O_3 + M, \qquad K_2 = 2{,}1 \cdot 10^8 \ (M = N_2).$$

В качестве примера такой реакции следует упомянуть эпоксидирование циклодиенового инсектицида альдрина до дильдрина.

Озон O_3 играет в атмосфере особую роль. Предположение о том, что озон в атмосфере поглощает солнечное излучение в диапазоне волн 200-300 нм, было высказано еще в 1880 г. после лабораторных исследований поглощения УФ-излучения озоном. По сравнению с другими газами, входящими в состав атмосферы и пропускающими большую часть

солнечного излучения, озон поглощает излучение с длиной волны в диапазоне 200–300 нм. Озон – химически активный компонент атмосферы. В наибольшей степени он расходуется в реакциях с олефинами, NO и в незначительном объеме с NO_2.

Реакции посторонних химических веществ с озоном называют: *озонолизом.* Озонолиз – воздействие озона на кратные связи углерод–углерод таким образом, что при их разрыве оба атома углерода в продуктах реакции оказываются «заряжены» кислородом. Так, например, из олефинов в зависимости от их строения получаются альдегиды или кетоны и соответственно их производные или продукты последующих реакций окисления, например карбоновые кислоты.

Реакции озона с соединениями с галогенированными двойными связями (которые часто являются продуктами, посторонними для окружающей среды, например ДДЭ, циклодиеновые инсектициды, хлорэтены, хлорпропены и т. п.) характеризуются существенным снижением скорости с увеличением степени *хлорирования* двойных связей. Так, например, отношение скоростей реакции озона с этиленом к скорости реакции с цис-1,2-дихлорэтаном равно 25000:1. Это объясняется значительно большей электроотрицательностью хлора по сравнению водородом.

Стерическое влияние на скорость реакции становится заметным, если сравнить скорости реакции озона с тремя возможным изомерами дихлорэтена: транс-1,2-дихлорэтен реагирует в 16 раз быстрее, чем цис-1,2-дихлорэтен, а 1,1-дихлорэтен реагирует с наименьшей скоростью.

Молекула кислорода имеет в основном состоянии два неспаренных электрона, т. е. находится в триплетном состоянии ($^3O_2$); и является парамагнетиком.

Электронно-возбужденную молекулу кислорода называют *синглетным кислородом* O_2 ($^1\Delta g$). Он имеется как в атмосфере, так и в водных средах.

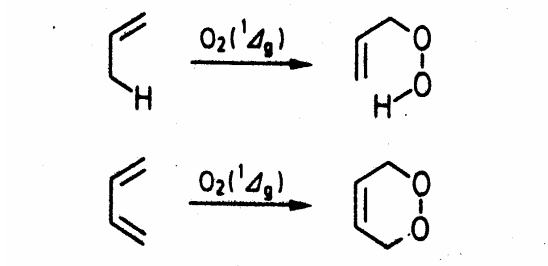


Рис. 8.5. Реакции посторонних для окружающей среды ненасыщенных веществ с синглетным кислородом

Реакции посторонних химических веществ с синглетным кислородом можно разделить на две группы (см. рис. 8.5):

– окисление олефинов с аллильным атомом водорода;
– окисление α,β - ненасыщенного соединения, приводящее к трансаннулярным пероксидам (реакция Дильса – Альдера).

Синглетный кислород не реагирует с многими посторонними веществами, например с соединениями, содержащими хлорированные и стерически заторможенные двойные связи.

Кроме того, синглетный кислород играет, видимо, важную роль в фотохимическом превращении NO и NO_2.

Радикал пероксида водорода HO_2 образуется в атмосфере из алкоксирадикалов, Н-атомов и радикалов НСО при окислении углеводородов

$$R_1 - {}^{\cdot}CH - OR_2 + O_2 \longrightarrow HO_2^{\cdot} + R_1 - \overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C} - R_2$$

$$H^{\cdot} + O_2 \longrightarrow HO_2^{\cdot}$$

$$HCO^{\cdot} + O_2 \longrightarrow HO_2^{\cdot} + CO$$

Радикал HO_2• в атмосфере реагирует с радикалами и в небольшом количестве с O_3, NO, NO_2 и OH^-. В водном растворе пероксид существенно ускоряет фотохимическое разложение органических веществ, поступающих в окружающую среду.

Окислительные реакции в почве катализируются не только ферментами, но и оксидами металлов. К окислительным реакциям, катализируемым оксидами, можно отнести также абиотическую минерализацию, например, песками.

8.10. Восстановительные процессы

Абиотическое восстановление протекает главным образом в анаэробной среде под действием осадочных материалов. Окислительно-восстановительная система Fe(II)/Fe(III), а также связанные с белками порфирины, освобождающиеся при распаде биологических материалов, способны к переносу электронов с восстановленного органического субстрата на вредные вещества, поступившие в окружающую среду. В качестве примера можно упомянуть восстановление нитрогрупп в пентахлорнитробензоле и паратионе до аминогрупп, восстановительное дехлорирование ДДТ и токсафена и полное дехлорирование и ароматизацию линдана до бензола (рис. 8.6). При этом следует указать на то, что в этих примерах доля абиотического и биотического восстановления точно не

известна, и этот процесс восстановления следует рассматривать как переходный от абиотического к биотическому превращению.

8.11. Гидролитические процессы

Известно, что многие *органические химикаты* в соответствии с их структурой очень легко *гидролизуются* до гидрофильных конечных продуктов. Хорошо исследовано, например, омыление пестицидов; гидролиз их в природных условиях приводит к потере токсических свойств. Поэтому *скорость гидролиза* многих пестицидов в водных системах является важным *критерием* определения *срока жизни этих химикатов в окружающей среде.*

Реакционная способность фосфорорганических инсектицидов в водном растворе значительно увеличивается с повышением температуры. Высокая скорость омыления этих соединений при pH > 6 указывает на то, что они легко разлагаются в щелочной среде. Среди большого количества хлоруглеводородных инсектицидов также имеются чувствительные к гидролизу соединения. Гептахлор – известный циклодиеновый инсектицид в водном растворе омыляется до бензогидроксихлордена. Скорость омыления этого соединения повышается при увеличении pH. Катионы металлов также ускоряют эту реакцию (рис. 8.7).

Влияние полярности на реакцию гидролиза исследовано на примере омыления замещенных эфиров бензойной кислоты.

Линеаризованную зависимость можно представить в следующем виде:

$$\log k = p\log K + C \quad . \qquad (8.13)$$

Для незамещенной бензойной кислоты и ее эфиров

$$\log k_0 = p\log K_0 + C \quad . \qquad (8.14)$$

Вычитанием получают так называемое *уравнение Гаммета*

$$\log k/k_0 = p\log K/K_0 = p\sigma \, , \qquad (8.15)$$

где σ – коэффициент, зависящий от заместителей; p – коэффициент, определяемый свойствами растворителя и температурой. Этим уравнением можно достаточно точно описать кинетику многих других аналогичных реакций.

8.12. Фотохимические реакции

Для органических молекул, которые не поглощают УФ-излучение при длине волны более 290 нм, теоретически следовало бы принимать во внимание только один тип фотохимических реакций. Фотоиндуцированные реакционноспособные частицы в тропосфере могут взаимодействовать с молекулой химиката определенной структуры и образовывать продукты внутримолекулярной реакции.

8.13. Фотофизические и фотохимические стадии

Если основной скелет молекулы или ее функциональные группы или их комбинация обеспечивает возможность поглощения УФ-излучения, то следует учитывать вероятность следующих фотофизических и фотохимических стадий процесса (рис. 8.8):

а) дипольные переходы;
б) безызлучательные переходы;
в) переходы с переносом энергии:
   – с излучением;
   – без излучений.

Дипольные переходы. При поглощении кванта излучения органическим соединением с завершенной электронной оболочкой происходит возбуждение молекулы из синглетного основного состояния (Soo) на колебательные уровни более высокого электронного состояния S_{nL} той же мультиплетности (процесс 1). Возможно также возбуждение до триплетного состояния (процесс 2), однако оно редко регистрируется из-за малого времени перехода (рис. 8.8).

Обратные реакции в процессах 3 и 4 вызывают *фосфоресценцию* или флуоресценцию. Флуоресценция может также происходить из триплетного состояния 7, причем переходы без излучения приводят на первый синглетный уровень. Непосредственно после этого процесса происходит нормальная флуоресценция (задержанная флуоресценция, процесс 5).

Безызлучательные переходы. Из состояния S_{10} (возбужденное синглетное состояние) молекула переходит без излучения в состояние S_{00}. Такой переход, не сопровождающийся излучением, между электронными состояниями с одинаковой спиновой мультиплетностью, называют *внутренней конверсией.* Процесс происходит в две стадии – собственно *внутреннего перехода,* т. е. перехода из возбужденного синглетного состояния S_{11} в квазивырожденное S_{01}

(процесс 6), с последующим переходом из S_{01} в S_{00} Вторую стадию называют колебательной релаксацией (процесс 7). Внутренний переход, который возможен между возбужденными триплетными состояниями, объясняется тем, что перекрываются гиперповерхности потенциалов обоих возбужденных состояний. Кроме того, следует упомянуть, что константа скорости процесса 6 равна $K_4 = 10^{12}$ c^{-1}. Напротив, процесс 7 из-за малой разности потенциалов протекает замедленно. Внутренние переходы являются причиной того, что в конденсированной фазе они происходят главным образом из первого синглетного или соответственно триплетного состояния („золотое правило Каша"). Процессы дезактивации в конденсированной фазе имеют бимолекулярную природу и поэтому протекают под диффузионным контролем. В последующей фотохимической реакции энергия активации очень невелика, поскольку после поглощения фотона молекула имеет большой избыток энергии. Реакция происходит при любом столкновении реагирующей молекулы, а скорость реакции, таким образом определяется только скоростью ее диффузии.

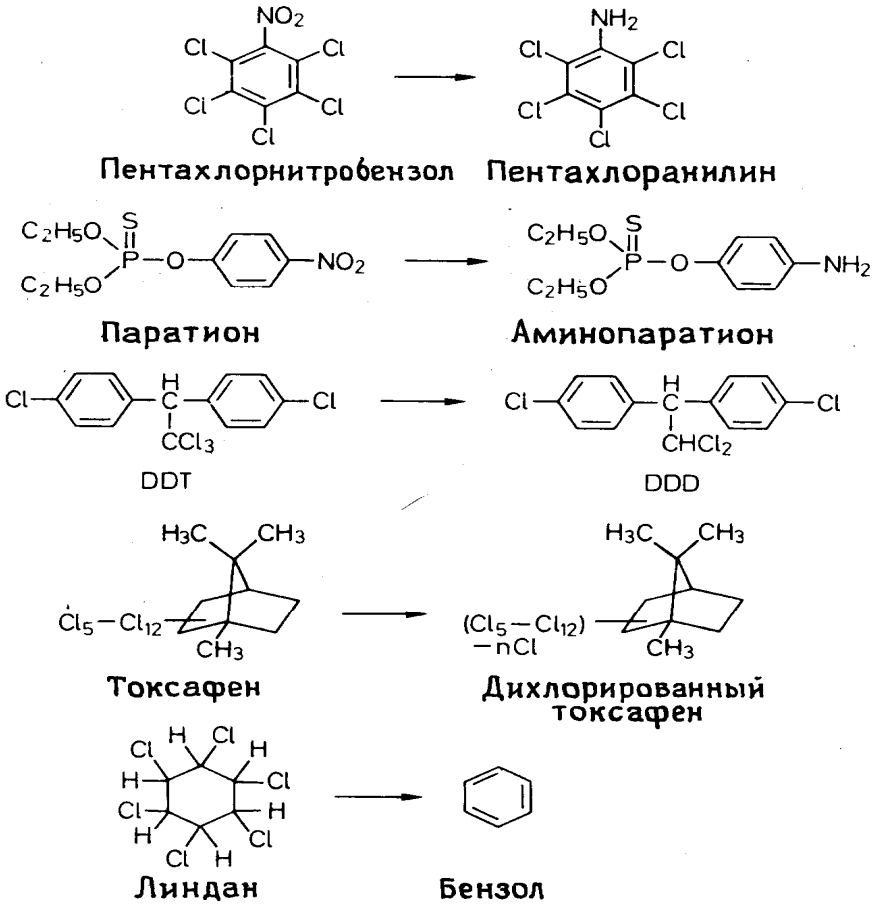


Рис. 8.6. Восстановительные реакции посторонних для окружающей среды веществ в анаэробных условиях

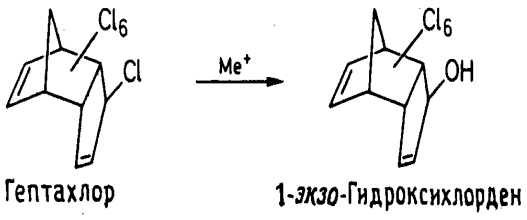


Рис. 8.7. Гидролиз гептахлора в окружающей среде

Безизлучательные внутренние переходы происходят только между электронными состояниями с одинаковой спиновой мультиплетностью. Если происходят превращения между состояниями с различной мультиплетностью (процесс 8), их называют межспиновым обменом. Стадия процесса 5 с задержанной *флуоресценцией* также является межспиновым обменом.

Переходы с переносом энергии. Перенос энергии, который играет особенно важную роль при фотохимических процессах, можно разделить на два вида:

– процесс 9, при котором возбужденная молекула-донор возвращается в основное состояние, а освободившийся фотон возбуждает молекулу-акцептор, при этом обязательно молекулы – донор и акцептор – взаимодействуют между собой. Требуется только, чтобы спектр излучения молекулы-донора и спектр поглощения молекулы-акцептора перекрывались в достаточно широкой области. Здесь перенос энергии происходит через излучение, поскольку в процессе участвует фотон,

– перенос энергии без излучения может происходить либо путем переноса энергии от синглетной возбужденной молекулы-донора (процесс 10) к молекуле-акцептору, которая в результате переходит в возбужденное синглетное состояние, либо молекула-донор в триплетном возбужденном состоянии передает свою энергию молекуле-акцептору, которая находится также в триплетном состоянии.

8.14. Фотореакции химических веществ в окружающей среде

Все рассмотренные выше механизмы относятся к переходам, которые с чисто химической точки зрения не приводят к какому-либо превращению вещества, а затрагивают лишь отдельные стадии процесса и являются упрощенными схемами сложных химических реакций. Если сосредоточиться на химических превращениях хлорорганических

соединений в тропосфере, то оказываются возможными следующие реакции:

– внутримолекулярные реакции, протекание которых контролируется только возбужденным состоянием. Для таких реакций не нужны другие участники. Поэтому они оказываются предпочтительными по сравнению с возможными межмолекулярными реакциями.

– межмолекулярные реакции, протекающие между различными активными и неактивными частицами в тропосфере; к ним можно отнести, например, процессы дехлорирования в присутствии доноров-протонов.

К внутримолекулярным реакциям относятся, например, реакции фотоизомеризации циклодиеновых инсектицидов. В качестве примера межмолекулярных фотореакций с посторонними химикатами в окружающей среде можно назвать реакции дехлорирования хлоруглеводородов.

Многие из реакций, относящихся к типу окислительных, также являются фотохимическими, как, например, реакции вредных веществ с активными частицами кислорода, поскольку последние образуются большей частью в результате фотохимических процессов.

Фотоминерализация представляет собой полное разложение посторонних для окружающей среды веществ до небольших неорганических молекул, например CO_2, CO, NO или HC1, под действием света. Фотоминерализация наблюдается главным образом для химических веществ, находящихся в адсорбированном состоянии; механизм этих процессов не ясен. Предполагают, что в нем участвуют различные реакционноспособные частицы кислорода.

8.15. Реакции посторонних для окружающей среды веществ с природными материалами

Реакции посторонних химических соединений с природными материалами могут катализироваться как абиотическим, так и биотическим путем. Такие реакции являются реакциями синтеза больших молекул. Если природный материал связывает постороннее вещество в более или менее неизмененном состоянии, то такой продукт реакции еще считается ксенобиотическим. Реакции такого рода в особенности характерны для почвы. В реакцию с вредным веществом вступают радикалы, которые в достаточном количестве имеются в почве, и реакционноспособные предшественники гуминовых веществ.

Дипольные переходы

1) $S_{00} + h\nu \rightarrow S_{hL}$ (синглет)

2) $S_{00} + h\nu' \rightarrow T_{1L}$ (синглет)

3) $S_{10} \xrightarrow{K_1} S_{0L} + h\nu''$ (флуоресценция)

4) $T_{10} \xrightarrow{K_2} S_{0L} + h\nu''$ (фосфоресценция)

5) $T_{10} \xrightarrow{K_3} T_{1x} \xrightarrow{K_4} S_{10} \xrightarrow{K_1} S_{0L} + h\nu''$ (задержанная флуоресценция)

Безызлучательные переходы

6) $S_{1L} \xrightarrow{K_4 > 10^{12}} S_{0x}$ (внутренние переходы, внутренняя конверсия)

7) $S_{0x} \xrightarrow{K_5} S_{00}$ (колебательная релаксация)

8) $S_{10} \xrightarrow{K_6} T_{1x}$ (межспиновый обмен)

Переходы с переносом энергии

9) $D^{\cdot} \rightarrow D + h\nu$
$h\nu + A \rightarrow A^{\cdot}$

10) $D^{\cdot}(S) + A(S) \rightarrow D(S) + A^{\cdot}(S)$

11) $D^{\cdot}(T) + A(S) \rightarrow D(S) + A^{\cdot}(T)$

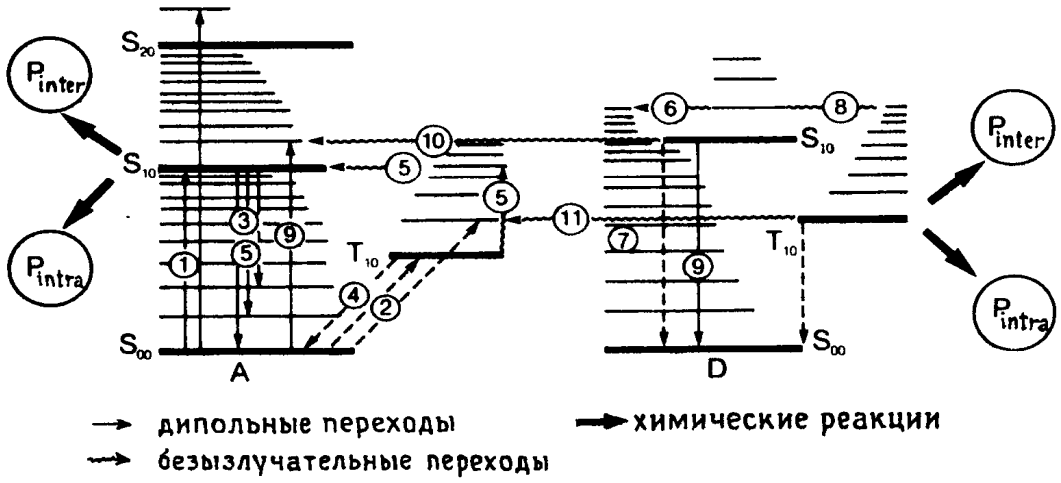


Рис. 8.8. Возможные фотофизические и фотохимические стадии превращений хлоруглеродов в тропосфере

Предполагается, что гуминовые вещества образуются в результате полимеризации природных фенолов, в особенности *о*- и *п*-дифенолов, которые в свою очередь являются продуктами распада отмерших растений или синтезируются микроорганизмами. Полимеризация сопровождается окислительными процессами. В таких реакциях полимеризации могут участвовать также природные амины. Хотя эти

реакции протекают самопроизвольно, высокий выход полимеров наблюдается только при наличии катализаторов. Наряду с ферментами микробного происхождения катализаторами могут быть также минералы, глины или оксиды металлов.

В этих реакциях вместо природных фенолов или аминов могут участвовать ксенобиотические соединения, например хлорированные фенолы или хлорированные анилины. В результате получаются низкомолекулярные продукты, например из 4-хлоранилина с пирокатехином или с 3,4-диметоксибензальдегидом и 1,4-бензохиноном. Сюда же относятся реакции присоединения хлоранилинов к мономерным гуминовым веществам. Эти продукты реакции можно рассматривать как строительный материал для высокомолекулярных гуминовых веществ. При меньшей степени полимеризации эти гуминовые вещества еще водорастворимы и более подвижны, что приводит к вымыванию связанного с ними постороннего вещества, даже если само по себе оно малорастворимо в воде. При высокой степени полимеризации гуминовые вещества нерастворимы и не экстрагируются из почвы. Тогда они образуют часть так называемого «связанного остатка» в почве. Поскольку в почве гуминовые вещества медленно разлагается, и перестраиваются в результате жизнедеятельности микроорганизмов, то небольшая часть связанных посторонних веществ освобождается и вновь становится биологически активной или вымывается из почвы.

8.16. Реакции между различными посторонними для окружающей среды веществами

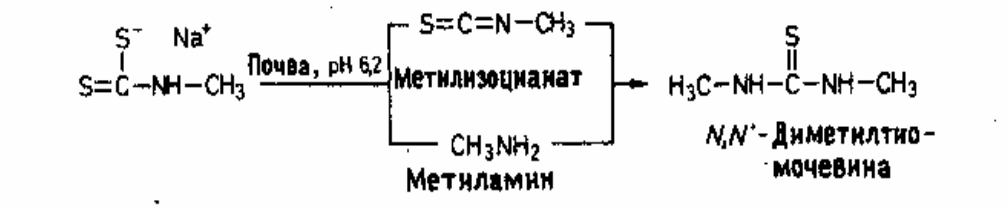
Различные химикаты, поступающие в окружающую природу, могут реагировать между собой в атмосфере и воде, образуя новые вредные соединения. Такие реакции осуществляются не часто, так как концентрации антропогенных химических веществ в окружающей среде в основном слишком малы и недостаточны для проявления реакционной способности. Однако в сильно загрязненном воздухе (смог) или в воздухе на складах с промышленными отходами их концентрация может настолько увеличиться, что вызовет образование новых веществ, загрязняющих окружающую среду.

Примером такой реакции в атмосфере может быть фотолитический цикл, в соответствии с которым NO_2 и озон реагируют с углеводородами. Кроме того, описана, например, реакция толуола с NO, приводящая к образованию нитрофенолов. В сточных водах химических производств и соответствующих осадках обнаружены бисфенолы, дифенохиноны и другие продукты димеризации, которые образовались, вероятно, при окислении фенолов до хинонов с последующей димеризацией.

Возможны также реакции хлора, используемого для дезинфекции воды, с содержащимися в воде химическими соединениями (фенолы, амины, бифенилы, бензол) с образованием соответствующих хлорированных производных. Установлено даже присутствие хлороформа.

Соответственно озонирование питьевой воды или сточных вод приводит к окислению посторонних веществ. Кроме того, можно предположить, что металлы на складах с отходами способны катализировать взаимодействие вредных веществ между собой. Установлено, что и в пахотных почвах пестициды могут реагировать между собой.

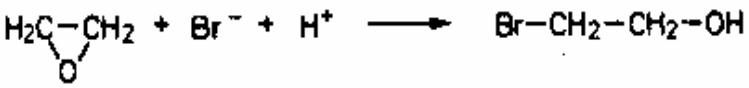
Фумигационное средство (для уничтожения вредных насекомых) натрий-N-метилдитиокарбамат (вапам) в почве разлагается на смесь продуктов, которые образуют новые соединения. Эти реакции протекают при концентрации исходного вещества около 500 млн.$^{-1}$



Этот же пестицид реагирует в почве с галогенированными углеводами, входящими в состав средств борьбы с нематодами:

$$H_3C{-}NH{-}\overset{\overset{\displaystyle S}{||}}{C}{-}S^- + Cl{-}R \rightarrow H_3C{-}NH{-}\overset{\overset{\displaystyle S}{||}}{C}{-}SR + Cl^-$$

Этиленоксид, применяемый как средство для стерилизации зерна, реагирует с бромидами, образующимися в результате предшествующей обработки зерна метилбромидом или этиленбромидом, с образованием токсичного этиленбромгидрина



Эти немногие примеры показывают, что даже при концентрации на уровне миллионных долей посторонние вещества реагируют между собой с образованием новых продуктов.

8.17. Биотические превращения

Реакции посторонних веществ, катализируемые ферментами, можно считать желательными или нежелательными в зависимости от того, какие продукты при этом образуются. Желательными можно считать вещества с

малой токсичностью *(детоксикация),* соответственно для органических веществ – полное разложение или возвращение в природную систему обмена веществ. Нежелательные конечные или промежуточные продукты биотических реакций имеют повышенную активность по отношению к экосистемам или человеку *(активация).*

8.18. Соединения металлов

Ранее мы уже упоминали о токсичности некоторых металлов и, в частности, ртути. В данном разделе будут обсуждены ферментативные превращения неорганических химических веществ на примере следовых количеств ртути, олова и свинца, а также – мышьяка. Накопление этих веществ в окружающей среде определяется не только антропогенными факторами, например, для серебра и свинца антропогенная доля поступления их из промышленных сточных вод и выхлопных газов примерно равна естественной. Накопление этих металлов в окружающей среде нежелательно, так как они являются вредными для человека и животных (острые и хронические отравления, цитотоксические свойства), а для растений не являются жизненно необходимыми. *Биотические превращения* металлов, т. е. включение ионов металлов в органические производные, в большинстве случаев повышают токсичность по отношению к теплокровным животным, т.е. являются нежелательными *реакциями активирования.*

$$HgS \rightarrow HgS0_3 \rightarrow HgSO_4 \xrightarrow{NADH+H^+} Hg^\circ$$

$$Hg^{+2} \rightarrow CH_3Hg^+ \longrightarrow \begin{cases} (CH_3)_2Hg \\ Hg^0 + CH_4 \end{cases}$$

Рис. 8.9. Основные реакции ртути в живых организмах в окружающей среде

В природном цикле *ртути* наиболее важными являются два микробиологических механизма превращения (рис. 8.9). При первом ионы ртути из нерастворимого природного сульфида ртути HgS после его окисления через стадию образования сульфита переходят в растворимый сульфат ртути. Ионы ртути Hg^{2+} восстанавливаются под действием восстановленного никотинамид-аденин-динуклеотида $NADH_2$ до металлической ртути, давление паров которой настолько велико, что

металл постепенно переходит в газовую фазу. По второму механизму Hg^{2+} метилируется до метил- и диметилртути. Биологическое метилирование происходит во всех организмах, включая человека. Некоторые микроорганизмы разлагают метилртуть, восстанавливая ее до металлической ртути и метана.

Различные почвенные, а также водные микроорганизмы переводят *дифенилртуть* в *фенилртуть*. Имеются сообщения о разложении метил-, этил- и фенил ртути до металла и соответствующего углеводорода устойчивыми к ртути бактериями псевдомонадами, а также об улетучивании ртути из шлама отстойников очистных сооружений, содержащего хлорид ртути и фенилртуть. Различные формы химического связывания ртути и физические свойства соответствующих соединений очень важны при ее превращениях в природных циклах. Так, например, металлическая ртуть и диметилртуть летучи, а метилртуть обладает липофильными свойствами и накапливается в жировых тканях. Неорганическая ртуть (Hg^{2+}) в организмах большей частью водорастворима.

Из упомянутых выше реакций ртути в окружающей среде важнейшей следует считать *метилирование,* так как оно приводит к значительному повышению *токсичности соединений для теплокровных животных* и способствует накоплению метилртути в цепях питания. Механизм этой реакции выяснен в результате лабораторных исследований, в которых было изучено также присоединение метильного радикала к палладию, таллию, свинцу, платине, золоту, олову, хрому, мышьяку, селену, теллуру и сере. Оказалось, что во всех этих процессах метилирования участвуют производные метилкорриноидов (метил-витамин B_{12}). Исследованы два основных вида реакций: тип 1, при котором металл является электрофильным, связь кобальт – углерод в корриноиде гетеролитически расщепляется и карбанион CH_3^- присоединяется к металлу, находящемуся на более высокой степени окисления; тип 2 – с характерной реакцией, при которой ион металла после гемолитического расщепления связи $Co–CH_3$ в метилкоррине (коррин – циклическая система из четырех колец витамина B_{12}) принимает метильный радикал. В этом случае ион металла находится в восстановленном состоянии (относительно окислительно-восстановительной пары).

Несмотря на то, что имеются подробные лабораторные исследования процесса метилирования, немногое известно о *биометилировании олова и свинца* в окружающей среде. Олово метилируется бактериями *псевдомонадами*. Метилолово действует отравляюще на центральную нервную систему высших организмов; накапливается ли оно в цепях питания, пока окончательно не выяснено. Свинец также метилируется биологическим путем. Для обоих металлов доказано превращение

тетраэтилметаллов в триэтилпроизводные, более токсичные, чем исходные соединения.

Биометилирование соединений мышьяка анаэробными микроорганизмами приводит к образованию диметил- и триметиларсинов – летучих и исключительно токсичных соединений. Эти арсины легко окисляются до значительно менее токсичных продуктов, например до какодиловой кислоты. Следует ожидать, что подобные биологические реакции протекают также с селеном и теллуром.

8.19. Органические посторонние вещества

При ферментативном взаимодействии организмов с органическими посторонними веществами в принципе можно представить два возможных процесса. В первом случае органическое вещество разлагается до неорганических продуктов, таких как диоксид углерода, хлориды и т. п., или до низкомолекулярных органических фрагментов, способных участвовать в природных циклах углерода. Такие превращения сопровождаются приростом биомассы соответствующих организмов, что указывает на то, что они получают в этих реакциях углерод и энергию для биосинтеза. Однако такого рода биологические превращения возможны лишь для небольшого числа химических соединений и живых организмов, прежде всего – для микроорганизмов почвы, воды или ила – шламов. Большинство химических соединений превращаются микроорганизмами, животными или высшими растениями по второму пути, называемому *кометаболизмом. С* его помощью организмы преобразуют ксенобиотические соединения, не получая из них ни углерода, ни энергии, т. е. этот процесс не обеспечивает их роста. Так как полное биоразложение (или минерализация почвенными микроорганизмами) уже рассматривалось в разд. «превращения», здесь будут обсуждаются только процессы кометаболизма. Образованные из ксенобиотических веществ продукты также являются химическими веществами, посторонними для окружающей среды, т. е. их тоже следует рассматривать как антропогенные вещества.

Специфические ферменты, воздействующие на посторонние вещества, существуют лишь в немногих штаммах микроорганизмов, полученных в результате мутаций и селекции. Поэтому на ксенобиотические вещества воздействуют преимущественно неспецифические ферментные системы. Первичными реакциями превращения являются *окисление, восстановление* и *гидролиз*. Вторичными реакциями являются конъюгация посторонних веществ или их первичных продуктов превращения в вещества, входящие в состав организма, или их *встраивание в макромолекулы природных орга-*

нических веществ (образование «неэкстрагируемых остатков»).

Окислительные процессы представляют собой наиболее распространенные ферментативные реакции изменения посторонних веществ в природе. В табл. 8.4 указаны некоторые примеры отдельных типов реакций посторонними веществами. Большинство приведенных примеров имеют место равным образом, как в организме животных, так и в растениях и микроорганизмах. В результате некоторых из этих реакций, например, эпоксидирования циклодиеновых инсектицидов, окисления фосфотионатов до фосфатов или гидроксилирования полихлорированных бифенилов (ПХБФ), образуются продукты, более биологически активные, чем исходные *(биологическая активация).*

Окислительные превращения посторонних веществ в *организме теплокровных животных* в отличие от других организмов исследованы сравнительно хорошо. Классические лабораторные методы исследования метаболизма лекарственных препаратов в принципе применимы и для исследования посторонних для окружающей среды химических веществ. Окислительные превращения происходят главным образом с помощью *многофункциональных оксигеназ* в эндоплазматическом ретикулуме клеток печени, в сети полумикроскопических трубчатых и пластинчатых мембран, которые пронизывают цитоплазму клеток и состоят из мембран с грубой поверхностью, содержащих рибосомы, и мембран с гладкой поверхностью, не содержащих рибосом.

Механизм действия многофункциональных оксигеназ в основном состоит в том, что один атом кислорода из молекулы O_3 встраивается в молекулу постороннего вещества, а другой восстанавливается до воды.

Для этой реакции необходим восстановленный никотинамид-аденин-динуклеотидфосфат $NADPH_2$. Предложен следующий механизм этой реакции, состоящий из трех нижеследующих стадий :

$$\text{NADPH} + \text{H+} + \text{Фермент-A} \longrightarrow \text{Фермент-AH}_2 + \text{NADP}^+$$

$$\text{Фермент- AH}_2 + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Фермент- AH}_2\text{-O}_2^*$$

$$\text{Фермент- AH}_2\text{–O}_2^* + \text{Постороннее вещество- H} \longrightarrow \text{Постороннее вещество} + \text{Фермент- A} + \text{H}_2\text{O}$$

$$\text{NADPH} + 0_2 + \text{Постороннее вещество-H} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{фермент}} \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{Постороннее вещество-OH}$$

В соответствии с этими уравнениями $NADPH_2$ восстанавливает компонент А фермента, который затем образует промежуточный комплекс с кислородом. Один атом такого активированного кислорода затем присоединяется к постороннему веществу, а другой восстанавливается с образованием воды.

Многофункциональные оксигеназы содержатся также в растениях и микроорганизмах.

Таблица 8.4

Окислительные ферментативные реакции посторонних веществ

Тип реакции	Примеры
С-гидроксилирование	Производные бензола, ПХБФ, бензапирен, ДДТ, диэльдрин,
Окисление метильной группы	Бромацил
Эпоксидирование	Циклодиеновые инсектициды
Образование кетонов	Карбофуран
β-Окисление	2,4-Дихлорфеноксиалкановые кислоты
Сульфоксидирование	Тиоанизол, карбоксин
Окисление фосфотионатов	Паратион (тиофос)
Расщепление углеродных связей	Циклодиеновые инсектициды, ПХБФ
С-дегидрирование	Гексахлорциклогексан
N-окисление	Хлорирование анилины

При *гидроксилировании производных бензола* многофункциональными оксигеназами предполагается участие в качестве нестабильных промежуточных соединений эпоксидов *(ареноксидов).* При возвращении к фенольной структуре может произойти сдвиг заместителей *(NIH-сдвиг* см. рис. 8.10). Нестабильный эпоксид, однако, может гидролизоваться обычным образом, с образованием неароматического дигидродиола.

Ароматические амины в почве подвергаются *одноэлектронному окислению,* которое катализируется пероксидазами. Образующиеся при этом радикалы-полупродукты представлены на рис. 8.11. Полупродукты могут реагировать между собой тремя различными путями: связыванием по N'—N' (путь 1), связыванием N'—C' (путь 2) и связыванием по C'—C' (путь 3). По пути 3 реакция идет только в том случае, если существуют стерические препятствия для осуществления путей 1 и 2. При низких концентрациях, характерных для условий окружающей среды, наблюдался только первый путь – N'— N'-сочетания. Образующиеся при этом азобензолы могут далее окисляться до азоксибензолов. К радикалам-полупродуктам могут присоединяться также и другие, имеющиеся в почве радикалы, например NO_2^-.

В *растительных тканях,* богатых пероксидазами и фенольными соединениями, по-видимому, должна проявляться высокая окислительная активность. Действительно, в растениях метаболиты посторонних для окружающей среды веществ – это преимущественно *продукты окисления.* Это значит, что в окружающей среде, и в особенности в продуктах питания, присутствуют окисленные вещества с повышенной биологической

активностью (эпоксиды, фенолы), но в то же время в результате последовательного окислительного разложения (расщепления связей С –С) устойчивых веществ с помощью растений происходит постепенное улучшение состояния окружающей среды.

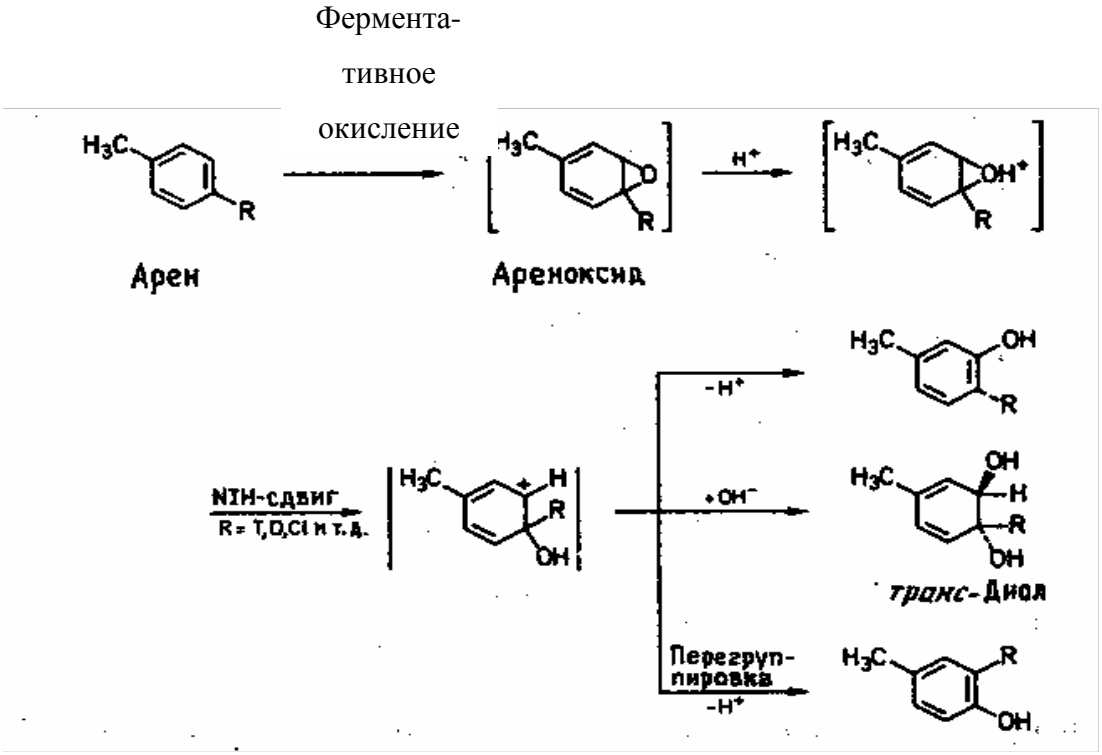


Рис. 8.10. Ферментативное окисление ароматических соединений с NIH- сдвигом

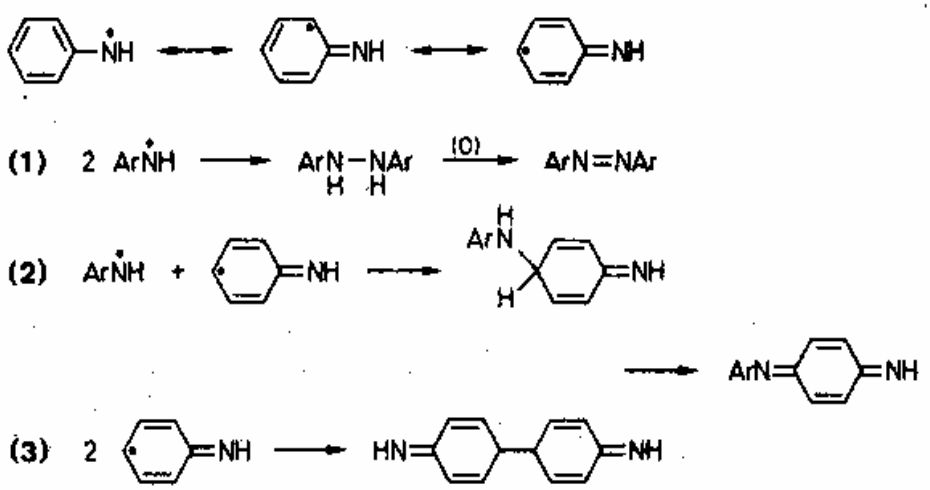


Рис. 8.11. Одноэлектронное окисление и димеризация анилинов в почве

Ранее было упомянуто гидроксилирование растительными ферментами ароматических соединений до фенолов, часто протекающее с «NIH-сдвигом».

С экологохимической точки зрения особенно интересно *окислительное расщепление углерод-углеродных связей,* которое происходит в растениях, а также в организмах животных и микроорганизмах. Образование карбоксильных групп с последующим декарбоксилированием может приводить к последовательному отщеплению атомов углерода и тем самым к полному разрушению молекулы.

На рис. 8.12 представлены схемы *окислительного бактериального расщепления ароматических кольцевых структур*. После двукратного гидроксилирования до *о*-дифенола может идти либо *орто*-расщепление между двумя гидроксильными группами, либо *мета*-расщепление рядом с ними. Конкретный путь расщепления и соответственно выбор ферментов определяются, видимо, «электроноотталкивающим» или «электронопритягивающим» эффектом заместителей. Все фенольные соединения с одним заместителем с +М - эффектом (CH_3, $-SCH_3$, $-OCH_3$ и $-SO-CH_3$) являются относительно хорошими субстратами для *мета*-расщепляющих ферментов. В обоих случаях образуются небольшие молекулы, которые могут входить в обычный обмен веществ, например, через взаимодействие с ацетил-коферментом А. Дальнейший путь разложения ароматических соединений идет через гомогентизиновую кислоту (см. рис. 8.13, 8.14), что наблюдается при разложении природных ароматических веществ, например ароматических аминокислот.

Примеры *восстановительных превращений* представлены в табл. 8.5, а гидролитических – в табл. 8.6.

.

Таблица 8.5

Восстановительные ферментативные реакции посторонних веществ

Тип реакции	Примеры
Восстановление кетогрупп	Ацетофенон
Восстановление азогрупп	Азобензол
Восстановление нитрогрупп	4-Нитробензойная кислота, пентахлорнитробензол, паратион (тиофос)
Восстановление N-оксидных групп	Никотинамид-К-оксид
Восстановительное дехлорирование	ДДТ, хлорированные производные бензола, токсафен
Восстановление двойных связей	DDMU (метаболит ДДТ)
Восстановление тройной связи	Бутурон

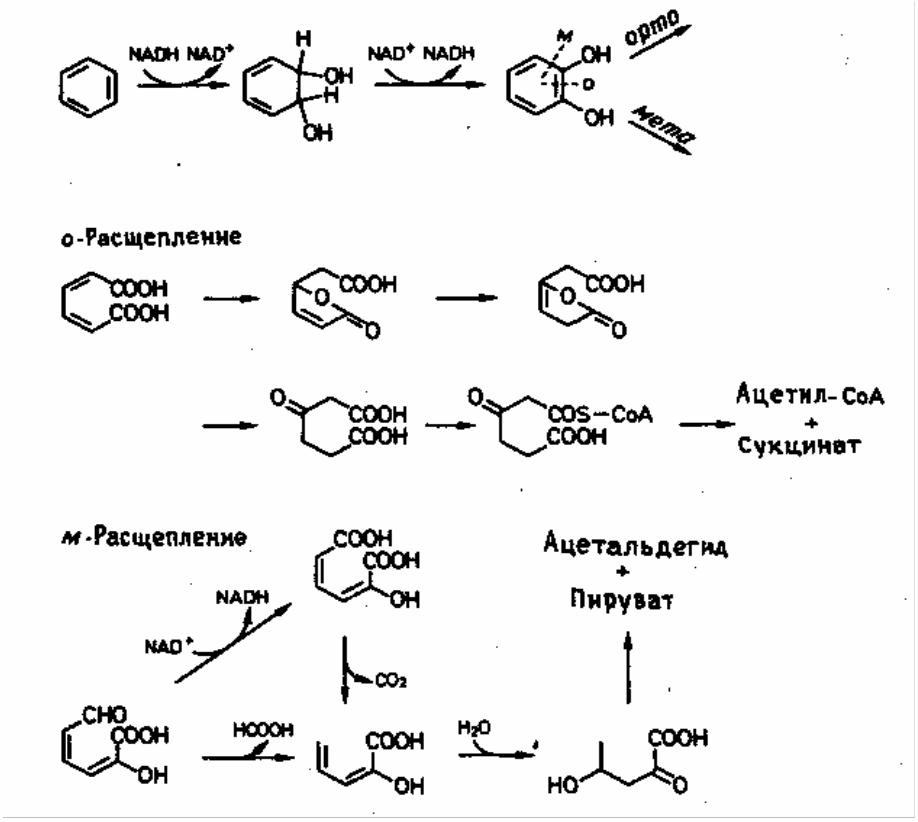


Рис. 8.12. Бактериальное расщепление ароматических колец

Таблица 8.6

Гидролитические ферментативные реакции посторонних веществ

Тип реакции	Примеры
Гидролиз эфиров карбоновых кислот	Малатион (карбофос), келеван, фталаты
Гидролиз нитрилов до амидов	2,4-Дихлорбензонитрил
Гидролиз амидов	N-ацетил-2-аминофлуорен
Гидролиз фосфатов	Триполифосфат, паратион (тиофос)
Гидролиз эпоксигрупп	Циклогексеноксид, диэльдрин
Гидролиз карбаматов	Карбарил

Вторичные процессы – это реакции, идущие с участием описанных выше первичных продуктов разложения, а также с исходными веществами, которые встраиваются в материалы, входящие в состав организма *(конъюгация).* В табл. 8.7 представлены вещества, наиболее часто

участвующие в реакциях конъюгации и получаемые при этом продукты.

Таблица 8.7

Конъюгация первичных метаболитов посторонних веществ

Партнер присоединения	Конъюгаты
Глюкуроновая кислота	Глюкуронаты
Глутатион	Глутатионаты
Сахар	Гликозиды
Пептиды, растворимые белки	Пептидные и белковые комплексы
Уксусная кислота	N-, O-Ацетаты
Метилгруппы	Простые и сложные эфиры, амины
Серная кислота	Сульфаты
Фосфорная кислота	Фосфаты
Малоновая кислота	Малонил-анилины
Макромолекулы	Неэкстрагируемые остатки

У животных процесс конъюгации, особенно с *глюкуронатами* и *сульфатами,* способствует повышению растворимости этих соединений, так что посторонние вещества легко выводятся из организма. Таким образом, происходит детоксикация отдельного организма, хотя экосистема остается загрязненной. С повышением водорастворимости связано изменение коэффициента распределения. Дальнейшее разложение осуществляется другими организмами, например растениями или микробами. В противоположность конъюгации с глюкуроновой кислотой или «серной» кислотой образование простых и сложных эфиров приводит к повышению растворимости в жирах и, следовательно, к снижению растворимости в воде. Соответственно изменяются их свойства относительно окружающей среды, а именно повышается их способность к накоплению в организмах. Растительные конъюгаты по большей части остаются в составе живых организмов.

В результате связывания посторонних веществ или их первичных продуктов превращения с *макромолекулами* образуются нерастворимые соединения, которые нельзя экстрагировать обычными растворителями из тканей, не разрушая структуру молекулы. В тканях животных доля таких связанных остатков ниже, чем в растительных; такими макромолекулами обычно являются белки или нуклеиновые кислоты.

В качестве примера связывания чуждого организму вещества с животными белками можно упомянуть присоединение толуилхлоридфенилгидразина к гемоглобину, которое осуществляется через фенилгидразиновый фрагмент, а также связывание хлорфеноксиуксусной кислоты альбумином.

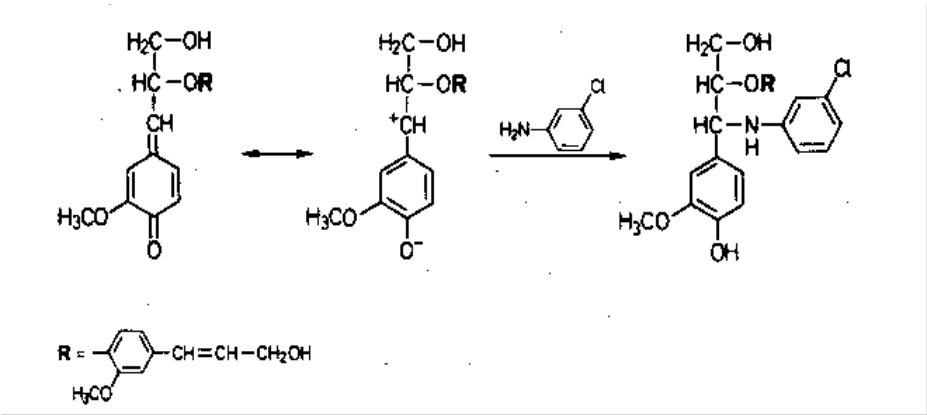


Рис. 8.13. Предлагаемый механизм встраивания ариламинов в лигнин

У растений в качестве связывающей макромолекулы чаще всего выступает лигнин. Наряду с нековалентным включением посторонней молекулы в макромолекулу лигнина образуются настоящие ковалентные связи (так, например, имеются доказательства включения анилина в полимерную структуру макромолекулы). На рис. 8.13 в качестве примера указанного механизма представлена схема присоединения хлоранилина к промежуточному соединению – хинон-метилу конифериловогo спирта – важнейшему мономеру лигнина.

В *почве* посторонние вещества и продукты их превращений также связываются в «неэкстрагируемые остатки», образованные нековалентными либо ковалентными связями. Последние встраиваются в макромолекулы гумина. Такой процесс частично происходит абиотически в результате окисления, а также катализируется микробными ферментами.

Окислительный, восстановительный, гидролитический и конъюгативный механизмы осуществляются при *биотическом дехлорировании* хлорированных посторонних химических веществ. Хотя соединения со связью углерод – галогены образуются в довольно больших количествах в природных условиях, прочность этой связи является основной причиной высокой устойчивости галогенированных соединений в окружающей среде, так как на нее могут воздействовать лишь немногие живые организмы. В связи с этим расщепление связи С–С1 является предпосылкой минерализации хлорированных посторонних веществ. Различные механизмы биотического расщепления связи С–С1 представлены на рис. 8.14.

Окислительный механизм установлен при дехлорировании 2-хлорбензола, *п*-хлорфенилацетата, а также при дефторировании некоторых соединений. При этом галоген замещается на две группы ОН, кислородные атомы которых образуются из кислорода воздуха (рис. 8.13).

При *восстановительном механизме* хлор либо замещается водородом, например, в процессе превращения ДДТ в ДДД (DDD) и ступенчатом дехлорировании пентахлорфенола, либо отщепляется от насыщенного соединения с образованием двойной связи C=C. Так, некоторые бактерии в анаэробных условиях (например, в донных осадках) полностью дехлорируют линдан до бензола. Для таких реакций обсуждаются также возможные абиотические механизмы (рис. 8.14).

При *гидролитическом механизме* хлор замещается гидрокси-группой, кислород которой образуется из воды. Примерами такой реакции могут быть дехлорирование 2-галогеналкильных кислот, хлорированных фенолов в *о*- или *п*-положении, а также дехлорирование атразина (рис. 8.14).

При *дегидрохлорировании* одновременно отщепляется по одному атому хлора и водорода с образованием двойной связи. Примерами такого рода реакции являются дегидрохлорирование ДДТ до ДДЭ (DDE) и линдана до 7-2,3,4,5,6-пентахлорциклогексена-1 и далее до трихлорбензола (рис. 8.14).

После *конъюгации* ксенобиотической молекулы с глутатионом атом хлора замещается тиометильной группой. Показанная на рис. 8.14 реакция дехлорирования фунгицида пентахлорнитробензола наблюдалась у дождевых червей.

Различные первичные и вторичные процессы превращения в одном и том же организме могут протекать последовательно или параллельно как конкурирующие реакции, причем они могут идти одновременно на различных участках молекулы, т. е. с различными заместителями. В качестве примера можно рассмотреть разложение ДДТ бактериями *Pseudomonas aeruginosa 640x*, которые встречаются в местах, длительное время подвергавшихся обработке ДДТ. Последовательность процесса разложения, установленная при лабораторных исследованиях, представлена на рис. 8.15.

Первым продуктом восстановительного дехлорирования ДДТ (I) является DDD (II). Это единственная реакция, приводящая далее к полному дехлорированию и частичному окислению до продукта разложения – бензгидрола (VIII) и протекающая без дополнительного субстрата. Для дехлорирования как алифатических, так и ароматических фрагментов молекулы требуются анаэробные условия, причем нитраты являются акцептором электронов, а лактат кальция или глицерин служат косубстратом.

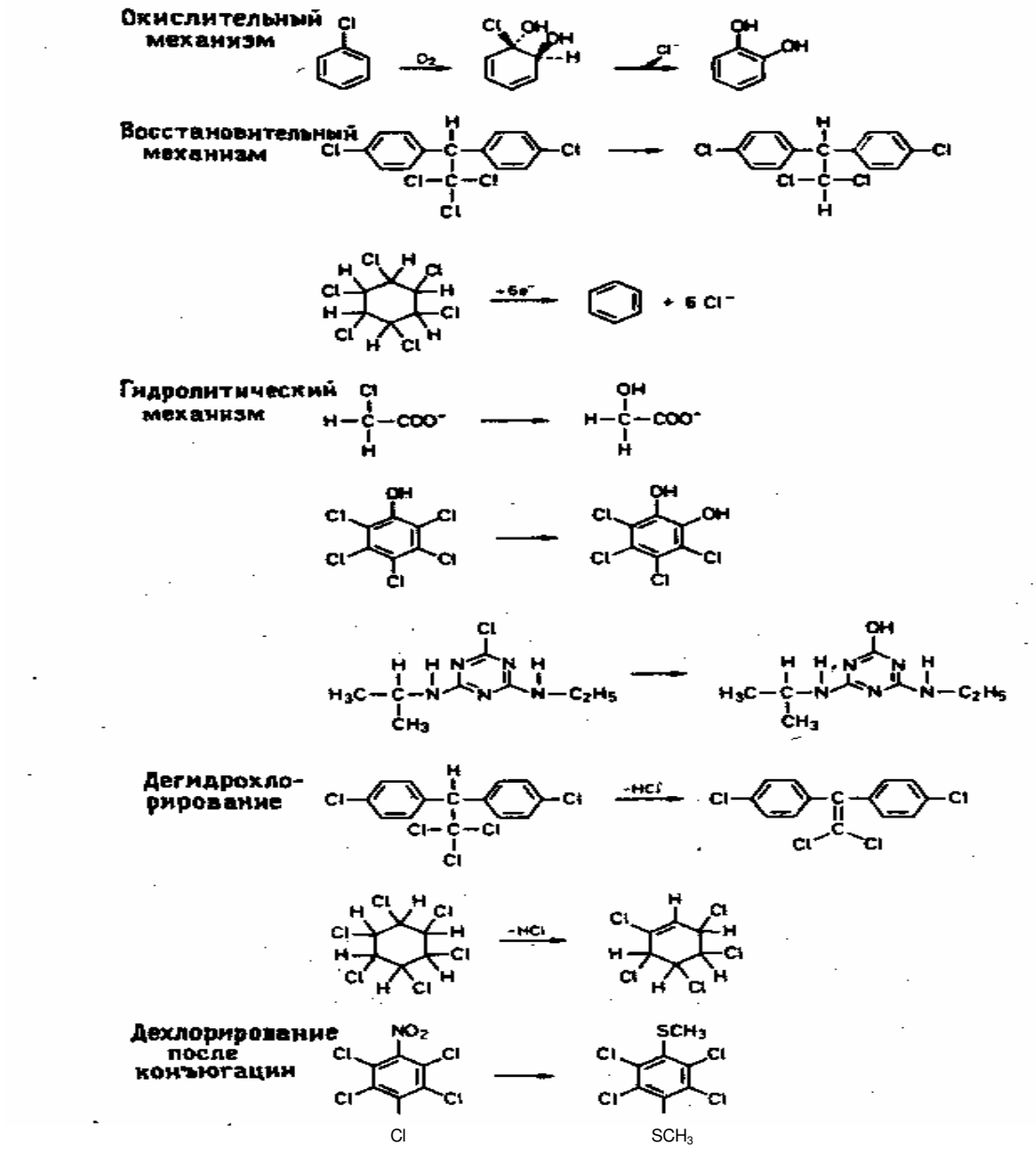


Рис. 8.14. Механизм биотического дехлорирования

Декарбоксилирование DDA (IV) протекает как в аэробных, так и в анаэробных условиях в зависимости от субстрата. В противоположность этому бензгидрол (VIII) и фенилуксусная кислота (XIII) могут использоваться микроорганизмами как единственный источник углерода, однако для их разложения требуются аэробные условия. Фенилуксусная кислота (XIII) гидроксилируется далее до 4-гидроксифенилуксусной кислоты (XIV), а последняя – до гомогентизиновой кислоты (XV); одновременно происходит сдвиг боковой цепи из положения 1 в положение 2. Гомогентизиновая кислота (XV) – полупродукт обычного процесса расщепления природных ароматических колец, например ароматических аминокислот. В результате окисления при участии

фермента оксигеназы кольцо разрывается между боковой цепью и *о*-гидроксигруппой, а полученная фумарилацетоуксусная кислота (XVI) гидролизуется с образованием фумаровой и ацетоуксусной кислот, которые вступают в основной обмен веществ.

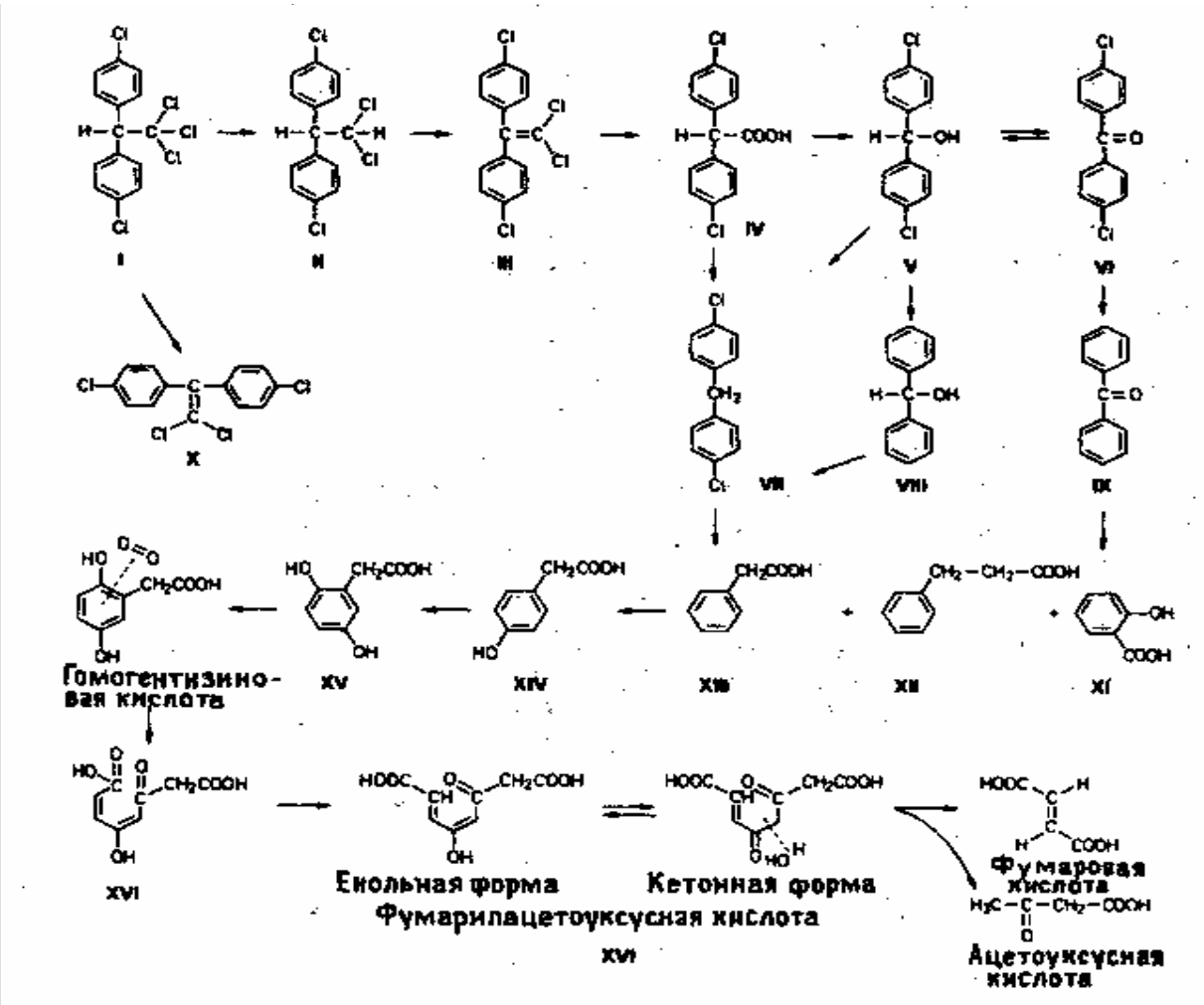


Рис. 8.15. Разложение ДДТ бактериями *Pseudomonas aeruginosa* 640 *x*

Из рассмотренной схемы следует, что бактерии в принципе способны полностью разрушить известный своей устойчивостью препарат ДДТ и ввести его в обычный круговорот веществ в природе. Следует, однако, иметь в виду, что различные стадии процесса расщепления требуют участия разнообразных субстратов и условий аэрации, т. е. сложных изменений условий окружающей среды, которые трудно поддерживать даже в лабораторных условиях и практически невозможно – в природных условиях. К тому же микроорганизмы, способные осуществлять эти реакции, встречаются в природе не так уж часто. Посторонние вещества могут оказаться очень устойчивыми в окружающей среде даже в том случае, если существуют природные ферменты, способные расщеплять их.

Подобные и даже более сложные процессы расщепления происходят также в организмах животных и растениях. В обоих случаях конечными продуктами являются конъюгаты.

Образовавшиеся в организме продукты превращения остаются в окружающей среде даже после их выхода из организма или его гибели и разложения, а также после включения в цепь питания. Эти продукты разлагаются далее абиотически или в других организмах. До того момента, когда они полностью разложатся до диоксида углерода и других продуктов минерализации или низкомолекулярных полупродуктов, вступающих в природный круговорот углерода, эти вещества следует рассматривать как посторонние и вредные для окружающей среды.

8.20. Предсказуемость биотических превращений по структуре химических соединений

Если для определенного класса соединений собрано достаточно данных об их превращениях в различных организмах, то на основе оценки соотношений между химической структурой исходных веществ, видом и количеством продуктов превращения можно сделать некоторые выводы и прогнозы о поведении в окружающей среде аналогичных или близких по химической структуре веществ. Для класса полихлорированных бифенилов (ПХБФ) можно, например, на основе многочисленных модельных опытов с животными, растениями и микроорганизмами, а также по результатам анализа проб окружающей среды, сделать вывод, что их биологическое разложение уменьшается с увеличением степени *хлорирования. Положение заместителя в молекуле* также играет существенную роль при ее расщеплении. Полихлорированные бифенилы метаболизируются теплокровными животными, если по крайней мере на одном кольце два соседних атома углерода не имеют заместителей: реакции идут особенно легко, если заместители находятся в *м*- или *п*-положении. Также *п,п'*-ДДТ вследствие одного свободного *п*-положения рядом с *м*-положением вступают в реакции легче, чем *п,п'*-изомер. Подобные результаты были получены при сравнительных исследованиях 37 аналогов ДДТ. Незамещенные химические соединения, а также такие, в которых только одно *п*-положение занято гидрокси-, амино- или метоксигруппой, легче разрушаются микроорганизмами, чем соединения с двумя замещенными *п*-положениями (заместители –ОН, –OCH_3 или –С1).

Для класса циклодиеновых инсектицидов присутствие эпоксигруппы вместо двойной связи (диэльдрин, эндрин, гептахлорэпоксид) оказывает стабилизирующее действие: *эндо-эндо-конфигурация* (изодрин) имеет большую устойчивость кольцевой структуры к окислительному расщеплению по сравнению с *эндо-экзо-конфигурацией* (альдрин). Изомеры ГХЦГ «гексахлорциклогексан» вследствие различий в конфигурации также

заметно различаются по скорости метаболического расщепления в организмах.

Радиус Ван-дер-Ваальса заместителей коррелирует с константами скорости реакции бактериального гидроксилирования ароматических соединений (фенолов до катехинов). Его можно использовать для прогноза скорости этой реакции данной группы соединений.

В ограниченном масштабе для предварительного расчета констант скорости микробиологических реакций, например гидролиза эфиров хлорированных карбоновых кислот, можно использовать *физико-химические свойства веществ,* например коэффициент распределения в смеси *н*-октиловый спирт/вода. Количественные данные о процессе гидролиза таких хлорированных эфиров бактериями хорошо коррелируют с коэффициентом распределения в системе *н*-октиловый спирт/вода при сравнении ряда эфиров с одним и тем же ароматическим ядром и алкильными заместителями различной длины. Степень корреляции снижается при сравнении ряда эфиров с одинаковыми алкильными заместителями и различным количеством замещенных атомов хлора. Из этих результатов следует, что гидролиз эфира происходит при проникновении молекулы эфира в клетку бактерии, т.е. вне клетки процесс гидролиза не идет.

Для новых соединений, которые постоянно поступают в окружающую среду (по аналогии с рассмотренными выше примерами), при сравнении их структуры с уже исследованными посторонними веществами можно сделать некоторые прогнозы об их биологической устойчивости.

Глава 9

ПОНЯТИЕ О ВЕЩЕСТВАХ-ЗАГРЯЗНИТЕЛЯХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Из сказанного в предыдущих главах следует, что в сбалансированной экосистеме существует почти замкнутый круг, по которому движутся вещества: например, экскременты и продукты распада одних организмов служат пищей другим и т. д. Однако экосистема по ряду причин может стать несбалансированной, когда нарушается нормальный круговорот. К примеру, продукты распада накапливаются в окружающей среде и не используются. В настоящее время наиболее часто в роли дестабилизатора экосистемы, как уже неоднократно упоминалось, может быть человек со своей практической деятельностью, когда в биосферу выбрасываются большие количества вредных веществ, новых веществ, а также веществ, казалось бы, безвредных (например CO_2), но в таких масштабах, что «забуференности» биогеохимических циклов становится уже недостаточно.

Таким образом, *веществами-загрязнителями* можно назвать такие вещества, которые характеризуются следующей совокупностью данных:

– попадают в биосферу в процессе человеческой деятельности;
– нарушают баланс веществ экосистемы, их цикличность, образуясь с большей скоростью, чем уничтожаясь;
– делают среду обитания менее благоприятной (некомфортной) как для самого человека, так и для многих его «соседей» по планете.

Следует иметь в виду, что вещества-загрязнители, попав первоначально лишь в один из компонентов окружающей среды, постепенно загрязняют, как правило, остальные компоненты (воздух, воду, почву). Перераспределение загрязнителей, пути миграции их в окружающей среде рано или поздно могут привести к прямому негативному воздействию на человека. На рис. 9.1 показаны перемещения веществ-загрязнителей в биосфере, причем наиболее мощные и значимые потоки выделены жирными стрелками.

Последствия загрязнения природной среды техногенными веществами настолько серьезны, что задача максимального сокращения поступления в биосферу отходов стала в настоящее время первоочередной и жизненно важной. При этом особый акцент делается на создание *безотходных технологий* производства и потребления, производство принципиально новых экологически чистых веществ и материалов, разработку и внедрение систем улавливания, утилизации и обезвреживания газообразных выбросов, сточных вод и твердых отходов. Синтезируя новые химические вещества для промышленных нужд, создавая новые приборы и машины, проектируя технологические линии и процессы, человек должен обязательно прогнозировать и объективно оценивать возможную степень воздействия всего созданного им на биосферу, на компоненты окружающей среды, на него самого, т. е. проводить *предварительную комплексную научно обоснованную независимую экологическую экспертизу,* об основных принципах которой уже говорилось в предыдущей главе.

9.1. Хемосфера

Все присутствующие в биосфере химические вещества, как природные, так и привнесенные в нее человеком, в сумме составляют **хемосферу.**

Множество природных соединений осуществляют в экосистемах важные функции. В то же время многие организмы вырабатывают токсичные вещества, которые, впрочем, также являются определенными хемомедиаторами, и их обращение в экосистемах находится под контролем природы и не приводит к каким-либо серьезным негативным последствиям.

Человеком синтезировано и выделено из природных источников свыше 6 млн. химических веществ. Эта цифра ежегодно возрастает на 5%. Причем здесь не учтены полимерные и олигомерные соединения, а также композиции и смеси. В США регистрируется только новых синтетических соединений около 120 тыс. в год. Все это говорит о том, что деятельность человека активно увеличивает потенциал хемосферы. Среди таких веществ антропогенного (от греч. *антропос* – человек + *генезис* – происхождение) характера есть *мутагенные* (порождающие мутации), *канцерогенные, тератогенные* (вызывающие уродства, от греч. *тератос* – чудовище) и т. д. Так, потенциальными канцерогенами признано сейчас около 25 000 соединений!

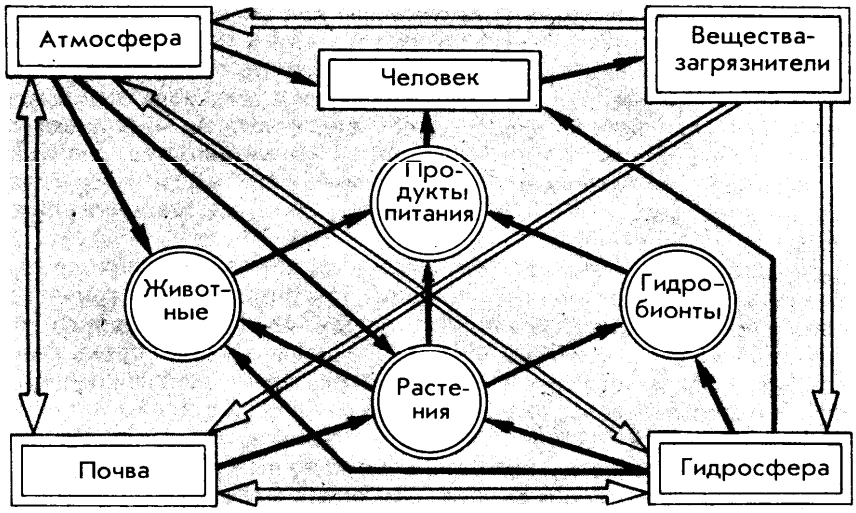


Рис. 9.1. Пути миграции веществ-загрязнителей в биосфере

Одними из важных вопросов химической экологии являются изучение тех превращений, которые претерпевают антропогенные вещества в экосистемах, их *биотрансформации* в живых организмах и механизмы их вредного воздействия на организмы, экосистемы и биосферу в целом. В экологической литературе встречаются нижеследующие термины.

Ксенобиотики (от греч. *ксенос* – чужой + *биос* – жизнь) – вещества, чужеродные по отношению к живым организмам и не входящие в естественные биогеохимические циклы. Их появление в биосфере прямо или косвенно связано с хозяйственной деятельностью человека.

Поллютанты (от лат. *поллюцио* – марание) – химические вещества, загрязняющие среду обитания; синоним – загрязнители.

Экзогенные вещества (от греч. *эксо* – снаружи + *генезис* – происхождение) – вещества, появление которых связано с деятельностью человека (термин подчеркивает неприродное происхождение соединения).

Экотоксиканты (от греч. *ойкос* – дом + *токсикон* – яд) – ядовитые вещества антропогенного происхождения, вызывающие серьезные нарушения в структурах экосистем.

Суперэкотоксиканты (от лат. *супер* – сверху, над) – вещества, обладающие в малых дозах мощным токсичным действием полифункционального характера. Для суперэкотоксикантов (СЭТ) фактически теряет смысл понятие *предельно допустимой концентрации* (ПДК). Кроме того, они резко повышают чувствительность живых организмов к другим, менее сильным (менее токсичным) ксенобиотикам, К суперэкотоксикантам относят диоксины, дибензофураны, бензантрацены, микотоксины, нитрозамины, нафтиламины.

Все вещества, составляющие хемосферу, можно условно разделить на четыре группы:

1. Безвредные для человека.
2. Действуют на человека опосредованно, делая менее благоприятной среду его обитания.
3. Могут прямо действовать на человека как на живой объект, отравляя его (токсиканты) или поражая каким-либо другим способом (например, радиоактивные вещества посредством излучения).
4. Вещества неопределенного характера действия. О многих из них нет достаточно полных сведений (токсичность, поведение в биосфере, а о других нельзя на сегодняшний день точно сказать, к какой группе они будут относиться, если концентрация их в экосистемах резко изменится в будущем).

Рассматривая вопросы влияния веществ-загрязнителей на состояние окружающей среды и живущие в ней организмы, необходимо учитывать следующие моменты:

вещества-загрязнители в экосистемах подвергаются воздействию комплекса биотических и абиотических факторов среды, в результате чего могут *трансформироваться;*

трансформация поллютантов и ксенобиотиков может осуществляться двумя параллельными и взаимосвязанными путями: 1) химическими превращениями под действием света, кислотно-основных свойств среды, температуры, радиации и т.п.; 2) биохимическими превращениями внутри живых организмов *(биотрансформация).*

Продукты трансформации могут играть измененную экологическую роль и биологическую активность по отношению к живому.

В качестве иллюстрации приведем примеры биотрансформации некоторых поллютантов и ксенобиотиков (рис. 9.2).

1. Окисление гербицида симазина в производное, канцерогенное для млекопитающих.

2. Взаимодействие диэтилметина с нитритами в среде желудочного сока у млекопитающих с образованием канцерогена диэтилнитрозамина.

3. Восстановление четыреххлористого углерода в печени млекопитающих с образованием трихлорметил-радикала, начинающего радикальные реакции, повреждающие печень.

4. Биогенное образование органических соединений олова при воздействии микроорганизмов на слаботоксичные формы олова.

5. Детоксикация поллютанта – бензойной кислоты у птиц, путем реакции связывания с аминокислотой орнитином; продукт выводится с экскрементами.

6. Детоксикация ксенобиотика пентахлорфенола растениями с помощью глюкозы (или рибозы).

7. Биодеградация дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) в дихлордифенилдихлорэтен (ДДЕ., не менее опасный ксенобиотик) некоторыми членистоногими.

Проходя биотрансформацию, загрязнители уже в других формах вновь попадают в экосистему с выделениями животных и с отмершими частями растений и могут претерпевать дальнейшую трансформацию. «Судьбу» ксенобиотиков в биосфере, таким образом, необходимо рассматривать в каждом конкретном случае, так как она определяется множеством различных факторов.

Можно предположить, что загрязнителем всегда является лишь то вещество, которого в природе, в экосистемах содержится очень мало. Однако это не всегда так! Все зависит от степени концентрации того или иного вещества в биосфере или в какой-либо ее части, а также от способности собственных сил природы справиться с этим загрязнителем, утилизировать его. Так, например, компонент древесины лигнин образуется в громадных количествах как отход целлюлозно-бумажной промышленности и потому он – серьезный поллютант.

По пространственному распределению (размеру охватываемых территорий) загрязнения подразделяют на:

– *глобальные (фоново-биосферные,* как, например, в случае с парниковыми газами CO_2, CH_4, хлорфторуглеродами и пр.);

– *региональные;*

– *локальные;*

– *точечные.*

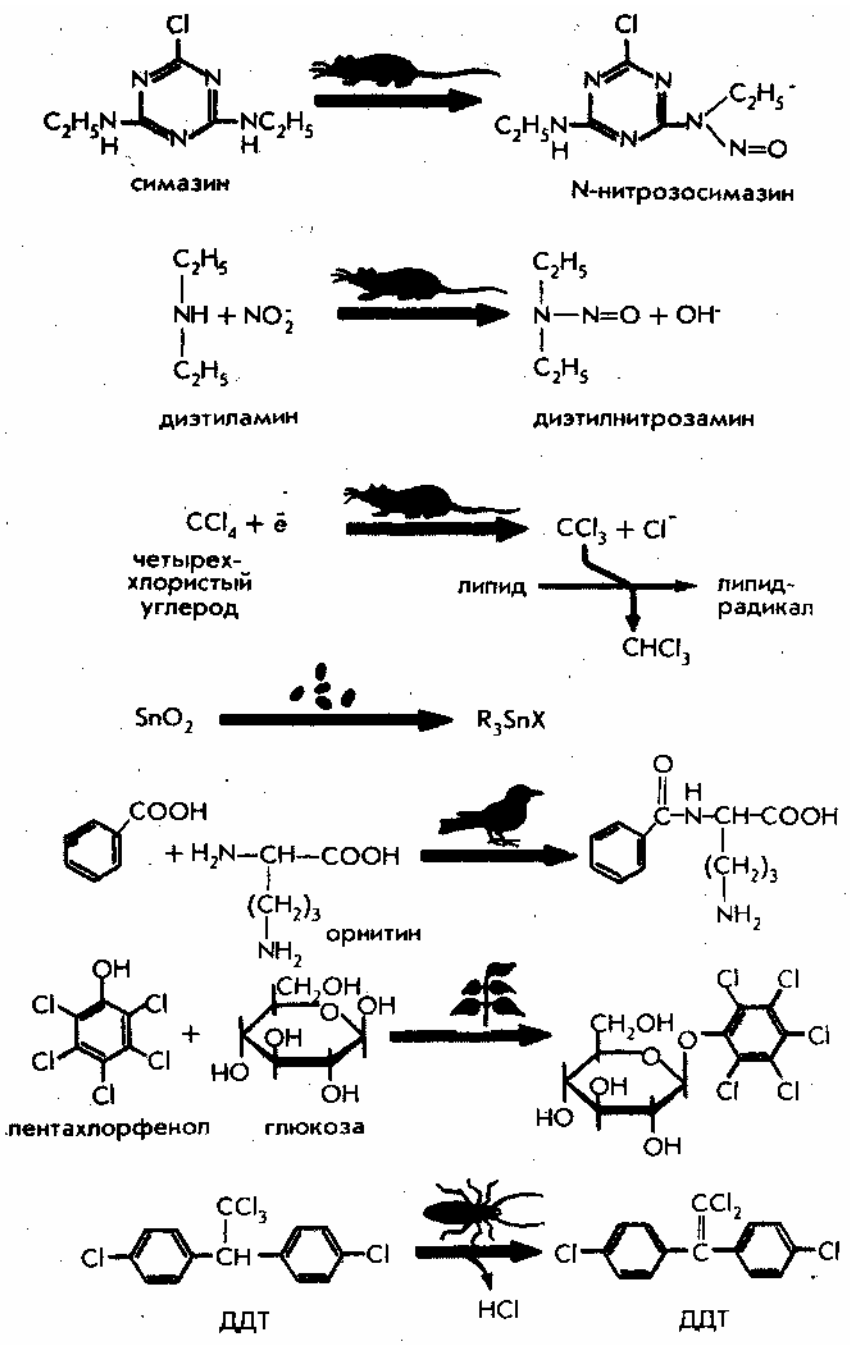


Рис. 9.2. Примеры биотрансформации поллютантов и ксенобиотиков

По силе и характеру воздействия на окружающую среду загрязнения бывают:

фоновые;

импактные (от англ. *импэкт* – удар, толчок; синоним – залповые);

постоянные (перманентные);

постепенно нарастающие и *катастрофические* (аварийные, например выброс нефти при аварии танкера в море).

По источникам возникновения загрязнители разделяют на:

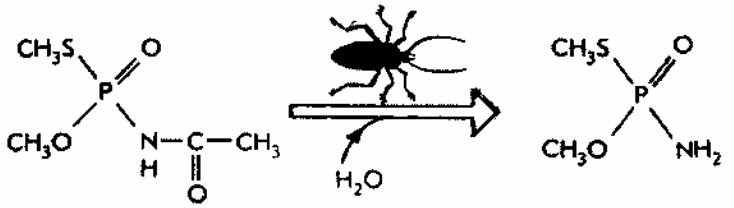
промышленные (например, SO_2);

транспортные (например, альдегиды выхлопов автомобилей);

сельскохозяйственные (например, пестициды);

коммунально-бытовые (например, детергенты синтетических моющих средств).

Явление биотрансформации можно использовать при создании более безопасных и экологически оправданных пестицидов. Так, слаботоксичный синтетический ацефат (пропестицид, т.е. предшественник пестицида) в организме вредящего насекомого превращается в токсичный, *избирательно действующий инсектицид* метамидофос (рис. 9.3).



ацетат (пропесцитид) метамидофос (пестицид)

Рис. 9.3. Пример биотрансформации слаботоксичного пропестицида в инсектицид в организме насекомого

Одна из проблем, связанных с появлением в экосистемах веществ антропогенного происхождения – нарушение поллютантами химической коммуникации между организмами. Так, появление в водной среде фенола с концентрацией 5 мг/л искажает реакцию карповых рыб (например, горчака) на собственный «феромон тревоги» (рис. 9.4). При концентрации фенола 20–30 мг/л наступает полная потеря чувствительности к феромону. Таким образом, загрязнители способны нарушать экологическое равновесие в экосистемах, разрывая «химические контакты» между организмами.

Явление разрыва «химического контакта» между организмами можно в некоторых случаях использовать и на благо человеку, например в борьбе с вредителями сельскохозяйственных культур и леса. Введение в экосистему искусственно полученных (экзогенных) веществ, имитирующих половые феромоны насекомых, приводит к *дезориентации* последних и нарушениям процессов спаривания. Так, синтетический аценол (смесь трех веществ – *цис*- и *транс*-додеценилацетатов и додеканола) успешно применяют для дезориентации нескольких видов плодожорок: сливовой, яблоневой и др. (рис. 9.5). Обнаружена возможность нарушения хемокоммуникации у жесткокрылых такими загрязнителями окружающей

среды, как гексанол, фенол, валериановая кислота и алканы с числом атомов углерода более 15.

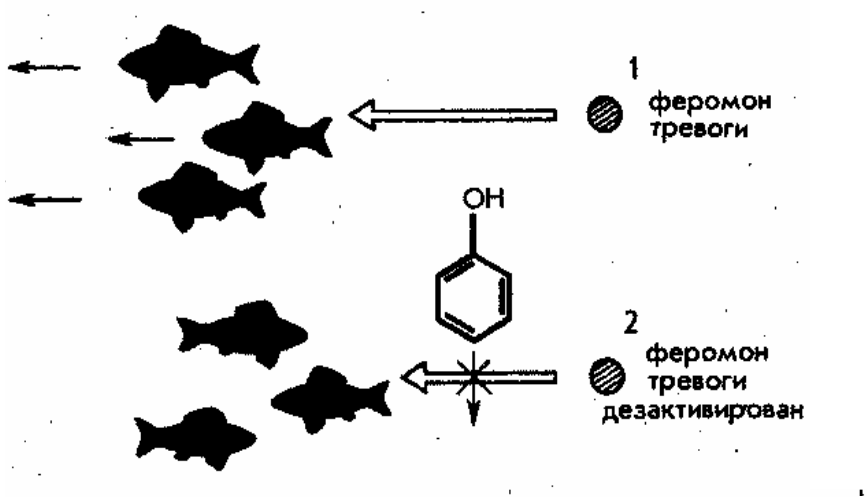


Рис. 9.4. Нарушение фенолом хемокоммуникации у горчака

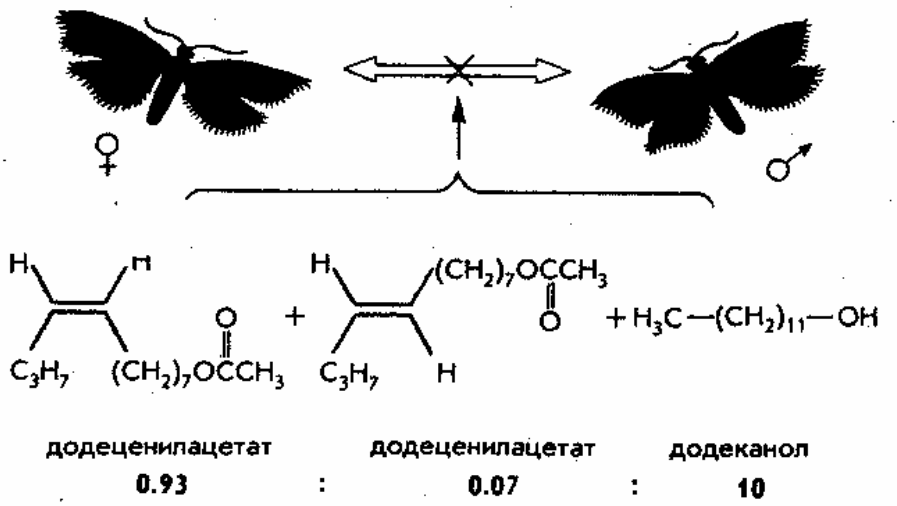


Рис. 9.5. Синтетическая композиция «аценол» приводит к дезориентации половозрелых особей вредящих бабочек-плодожорок

Однако существуют ксенобиотики, не подвергающиеся биотрансформации или разлагающиеся в природе очень медленно (так называемые *высокоперсистентные),* а также такие, которые в принципе не могут разрушаться (например, атомы металлов).

9.2. Токсичность. Стандарты качества окружающей среды

Токсичность – *свойство веществ вызывать отравление (интоксикацию) организма. Она характеризуется дозой вещества, вызывающей определенную степень отравления.*

При *ингаляционных* отравлениях доза равна произведению С, где С – концентрация паров или аэрозоля (в мг/м^3), *t* – время вдыхания (в мин).

При поражении другими путями (внутривенно, внутримышечно, через желудочно-кишечный тракт, кожу и пр.) доза оценивается количеством вещества в мг на 1 кг живой массы.

Различают:

среднесмертельные (летальные) дозы:

а) LCt_{50} – при ингаляционном отравлении;

б) LD_{50} ($ЛД_{50}$) – при других видах воздействия;

пороговые дозы:

а) PCt_{50} – при ингаляционном отравлении;

б) PD_{10} ($ПД_{10}$) – при других видах воздействия.

Цифра в индексе показывает вероятность (в %) гибели организмов для смертельных доз или появления признаков отравления для пороговых. Токсичность определяют, проводя опыты на животных с применением статистических методов.

Качество окружающей среды, его соответствие требованиям нормальной жизнедеятельности человека, характеризуется *экологическими стандартами.* Их подразделяют на собственно экологические и производственно-хозяйственные (рис. 9.6).

К стандартам первого типа относятся предельно допустимые нормы антропогенного воздействия на окружающую среду, превышение которых ведет к угрозе здоровью человека, отрицательно влияет на растения и животных. Среди таких характеристик наиболее часто используют:

ПДК – предельно допустимую концентрацию загрязняющих веществ, т. е. максимальное количество поллютанта в единице объема воздуха или воды, которое при ежедневном воздействии на организм человека в течение длительного времени не вызывает патологических (от греч. патос – страдание, болезнь) изменений или заболеваний, а также не нарушает нормальной жизнедеятельности;

ПДУ – предельно допустимый уровень вредного физического воздействия (шум, электромагнитные излучения и пр.).

Производственно-хозяйственными стандартами качества среды служат:

ПДВ – предельно допустимый выброс загрязняющих веществ каким-либо производством в окружающую среду (например, из одной заводской трубы в единицу времени);

ПДС – предельно допустимый сброс (то же для жидкого поллютанта);

ПДП – предельно допустимое поступление;

ПГП – предел годового поступления и т. д.

Таблица 9.1

ПДК некоторых веществ-загрязнителей в воздухе (в мг/м^3) и в водоемах хозяйственно-питьевого назначения (в мг/л)

Вещество	$ПДК_{р.з.}$	$ПДК_{с.с.}$	$ПДК_{м.р.}$	$ПДК_{водн.}$
Аммиак NH_3	20	0,04	0,2	2
Бензол C_6H_6	5	0,1	1,5	0,5
Гидразин N_2H_4	0,1	–	–	–
Фенол C_6H_5OH	5	0,1	1,0	0,001
Формальдегид CH_2O	0,5	0,012	0,035	0,01
Свинец Pb	0,01	0,007	0,007	0,005
Ртуть Hg	0,01	0,001	–	0,0005

Наиболее важный и часто используемый норматив – ПДК. ПДК подразделяют, в свою очередь, на следующие виды:

$ПДК_{р.з}$ – ПДК поллютанта в воздухе рабочей зоны (в мг/м^3). Рабочей зоной считается пространство высотой до 2 м над уровнем площадки, на которой находятся места постоянного или временного пребывания работающих);

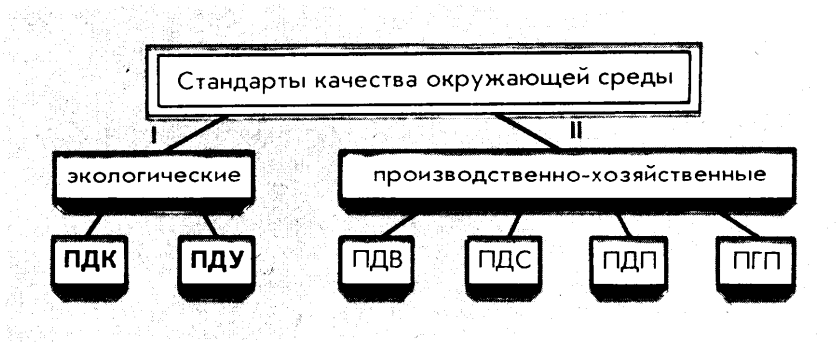


Рис. 9.6. Стандарты качества окружающей среды

$ПДК_{С.С}$ – ПДК поллютанта среднесуточная в воздухе городов (в мг/м^3);

$ПДК_{и.р}$ – ПДК поллютанта максимальная разовая в воздухе населенных мест (в мг/м^3);

$ПДК_{водн.}$ – ПДК загрязнителей в различных типах водоемов хозяйственно-питьевого, культурно-бытового, рыбохозяйственного назначения (в мг/л) и пр.

ПДК загрязнителя в рабочей зоне, где человек пребывает ограниченное время, выше, чем ПДК этого же вещества в воздухе населенных мест. Кроме того, ПДК различны для разных компонентов природной среды, например, для воздуха и водоемов (табл. 9.1).

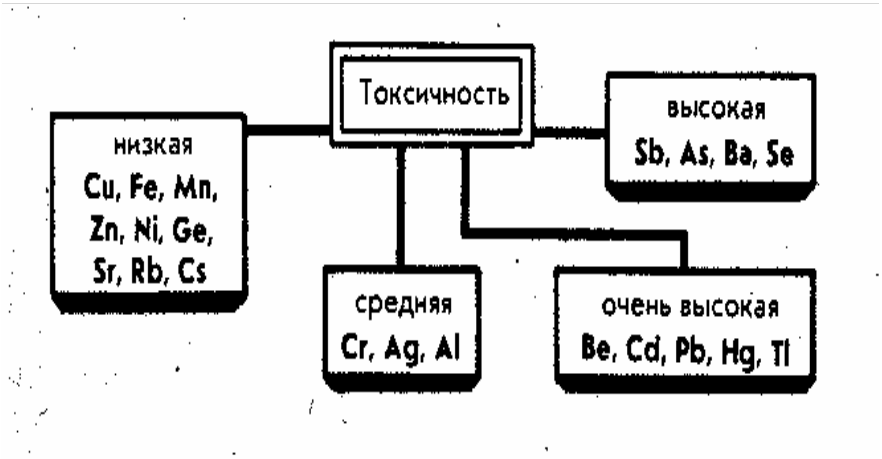


Рис. 9.7. Классификация элементов по их токсичности

«Лекарство в больших дозах – яд!» – об этом еще говорил известный врач и алхимик средневековья Т. Парацельс (1493 – 1541). Некоторые элементы токсичны даже в очень малых дозах (рис. 9.7), например ртуть и кадмий; для других токсичность проявляется лишь после превышения определенного уровня их содержания в пище, например для меди, цинка, никеля. Чрезвычайно токсичный селен тем не менее должен присутствовать в пище в дозе 0,1–0,2 млн. доли. При его отсутствии в кормах у животных развиваются мышечная дистрофия и некроз тканей печени, в то время как даже незначительное превышение допустимой дозы Se, попадающей в организм, приводит к тяжелым *токсикозам.* Алкилированные высокотоксичные соединения ртути, мышьяка, таллия, кадмия, селена могут быть смертельными для живого организма уже при нескольких нанограммах (1 нг = 10^{-9} г).

Токсичность зависит от химического состояния элемента, от формы, в которой он присутствует в живой клетке. Так, например, для ртути токсичность значительно возрастает в следующем ряду:

$$Hg_2Cl_2 < HgCl_2 < CH_3Hg+ < (CH_3)_2Hg.$$

Это объясняется тем, что алкилированные формы ртути лучше растворимы в биологических жидкостях (крови, лимфе), чем неорганические, а следовательно, эффективнее отравляют организм.

Металлическое олово практически нетоксично (оловянной посудой пользуются и сейчас), однако оловоорганические соединения являются общепризнанными *биоцидами* (от греч. *биос* – жизнь + лат. *цидо* – убиваю). Широко известны также *антисептические* свойства катиона Ag+ (от греч. *анти* – против + *сепсис* – гниение), например, в составе коллоидных золей или в растворе нитрата серебра, однако само металлическое серебро малоактивно.

«Смертельный» яд – фторацетат натрия $H_2CF–COONa$ имеет показатель $ЛД_{50}$ для крыс всего лишь 0,2 мг/кг (т. е. он почти в 10 раз сильнее известного фосфорорганического яда диизопропилфторфосфата). Однако, удивительно, что ион дифторацетата $HCF_2–COO^-$ вообще нетоксичен.

В целом можно сказать, что токсичный эффект обнаруживают не отдельные атомы того или другого элемента, а определенные комбинации (группы) разных атомов. Так, фтор, являясь необходимым микроэлементом, может оказывать сильные токсические действия, находясь в составе некоторых органических групп (например, типа –RF, где R – алкил, ацил).

В природных условиях относительно безвредное вещество может превратиться в токсичное. Некоторые поллютанты трансформируются в природе с образованием более устойчивых (персистентных) или токсичных продуктов. Так, например, полициклические ароматические углеводороды под действием ферментативных систем живой клетки превращаются в канцерогенные эпоксиды. Такое явление получило название *токсификации* (термин, противоположный термину «детоксикация», т. е. обезвреживание), (см. рис. 9.8).

Процессы детоксикации и токсификации являются яркими примерами влияния живого на неживое и наоборот, причем это влияние стимулировано чаще всего хозяйственной деятельностью человека.

Высокотоксичные алкилированные формы многих элементов могут образовываться в экосистемах биогенно, под действием чаще всего бактерий (как аэробных, так и анаэробных). Таким превращениям подвергаются, кроме упомянутой выше ртути, олово, таллий, свинец, селен, кадмий и мышьяк. Для последнего характерен следующий микробиологический путь:

$$As_20_3 \longrightarrow (CH_3)_3As$$

оксид мышьяка (III) триметилмышьяк

Многие токсичные элементы имеют определенное химическое сходство с биогенными элементами, и поэтому первые легко включаются в круговорот последних в экосистемах. Кроме того, токсичные элементы легко могут атаковать жизненно важные центры в клетках, например ДНК,

белки-ферменты, *конкурируя* с подобными им биогенными элементами и вытесняя их (рис. 9.9). Так, например, сильнотоксичный ион Cd^{2+} конкурирует с ионом Zn^{2+}, выполняющим в *металлоферментах* клеток человека роль кислоты Льюиса и создающим локальный положительный заряд около активного центра фермента. Замещение цинка на кадмий приводит к дезактивации (выключению) ферментов.

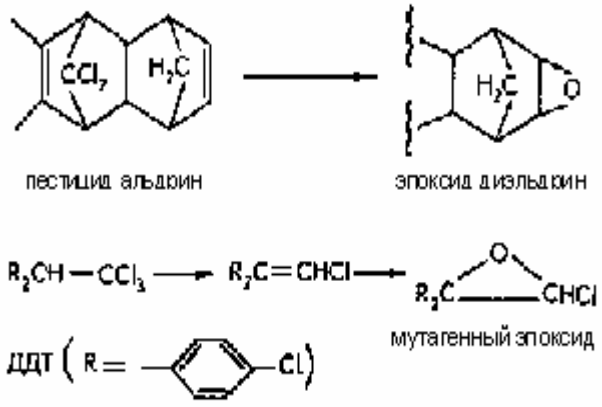


Рис. 9.8. Токсификация пестицидов под действием ферментов

Акватории многих портов мира в настоящее время отравлены оловоорганическими соединениями, образующимися при воздействии микроорганизмов на то олово, которое человек использовал в сплавах и припоях:

$$Sn \rightarrow R_3SnX$$

R – алкил

X – хлор, бром

Токсиканты и природные яды обладают разнообразными механизмами действия на живое. Именно изучение биохимического механизма отравления тем или иным соединением дает человеку ключ к решению проблемы защиты от ядов. Среди таких механизмов можно назвать блокаду передачи нервного импульса (например, у фосфорорганических соединений и нейротоксинов некоторых змей), гидролиз важнейших соединений организма (например, у токсинов-ферментов). Некоторые токсиканты, как было показано выше на примере кадмиевых соединений, подавляют активность жизненно важных ферментов, нарушая тем самым процессы обмена веществ в клетке. Другие способны подвергать лизису (разрушению) клеточные стенки и мембраны и т. д. Особо опасными следует считать те вещества, мишенью которых является генетический аппарат клетки, молекулы ДНК. Такие вещества относят к мутагенам, например, нитрозопроизводные мочевины, алкалоид колхицин и др.

Неудивительно поэтому, что многие мутагены (полихлорполициклические соединения, нитрозамины) являются суперэкотоксикантами.

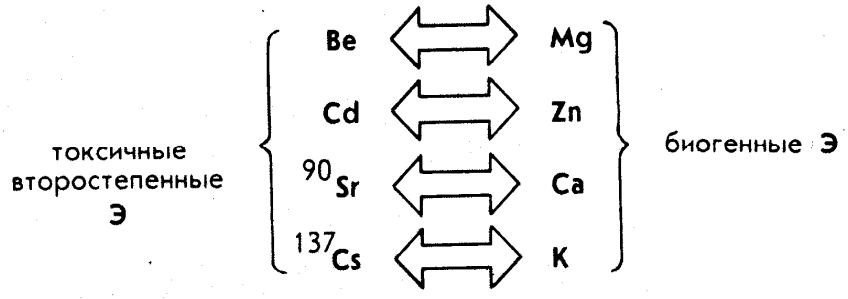


Рис. 9.9. Конкурентные пары некоторых второстепенных и биогенных элементов

Для многих токсикантов следует учитывать явление *биологического накопления (кумулирования) в пищевых цепях* (рис. 9.10). В рыбе, например, концентрация ртути может быть в 1000 раз выше, чем в водах, из которых она выловлена! Человек, являющийся конечным звеном пищевой цепи и питающийся такой рыбой, кумулирует в своем организме ртуть в очень высоких концентрациях и рискует погибнуть ранее положенного природой срока.

Кроме накопления в пищевых цепях, существует особый, еще не изученный тип накопления, когда кумуляция определенного элемента происходит избирательно какой-либо тканью или органом (рис. 9.11).

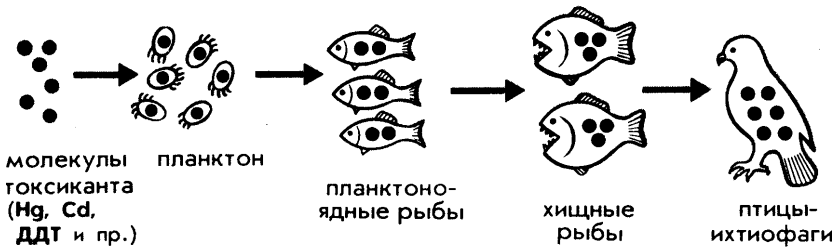


Рис. 9.10. Биологическое накопление токсикантов в пищевых цепях

Токсичность многих соединений может проявляться внезапно при необычных условиях. Алюминий, один из самых распространенных металлов в земной коре, ранее никогда не рассматривался как токсикант. Однако в связи с проблемой «кислотных дождей» ионы $A1^{3+}$ стали ограничивать урожайность сельскохозяйственных культур, так как на

кислых почвах биологическая доступность алюминия возрастает и он начинает проявлять отравляющее действие на растения, а через них – и на травоядных животных (болезнь «травяной столбняк»).

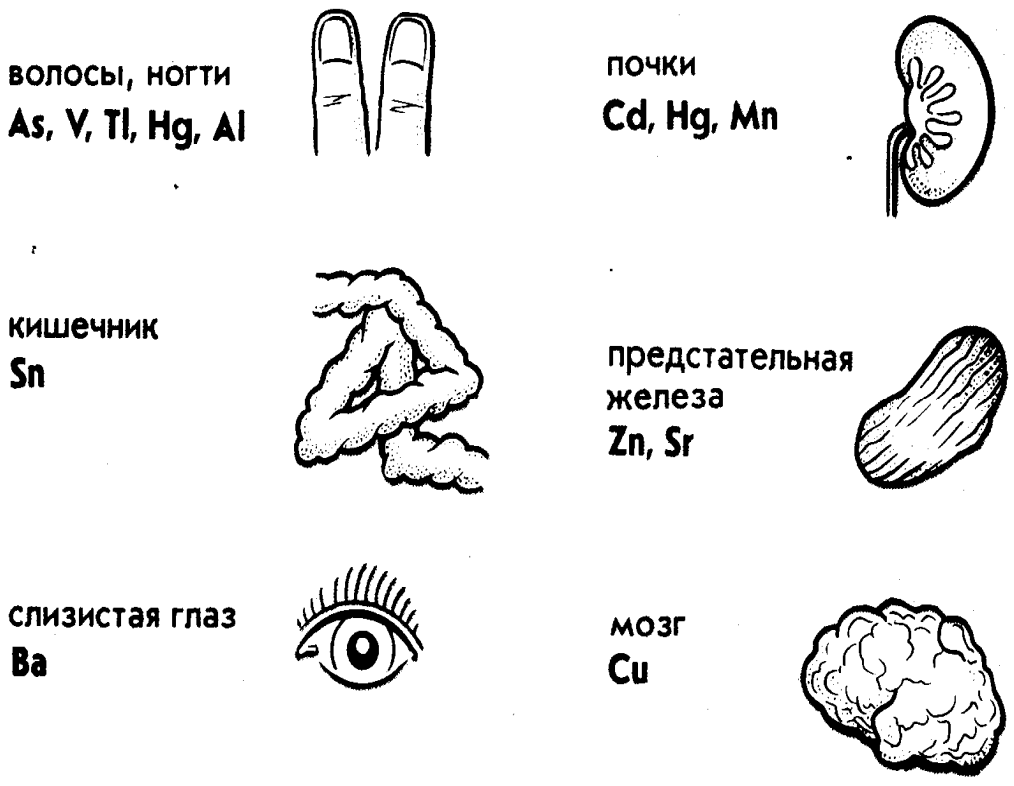


Рис. 9.11. Избирательное накопление некоторых элементов в органах у млекопитающих

Степень устойчивости разных организмов к тем или иным элементам и их соединениям различна. В некоторых случаях какой-либо вид или группа организмов даже имеют особое «тяготение» к определенному элементу, выступая по отношению к нему в роли *накопителя* (рис. 9.12). Так, например, токсичный для позвоночных мышьяк накапливают в значительных концентрациях бурые водоросли и кишечнополостные; по-видимому, он необходим им как микроэлемент. Аномально высокое содержание какого-либо элемента в организме одних видов живых существ свидетельствует о патологии, для других тот же уровень является нормой.

Рис. 9.12. Группы организмов. Накопители некоторых элементов

Многие животные и растения, используя яды как хемомедиаторы, синтезируют и накапливают их в своем организме без ущерба для собственного «здоровья». Так, сильнейший яд фторацетат натрия, о котором упоминалось выше, образуется в листьях некоторых тропических растений, а некоторые виды рыб, амфибий, рептилий и членистоногих имеют в арсенале чрезвычайно мощные яды белковой, алкалоидной и другой природы. Механизмы защиты этих животных от собственных токсинов разнообразны и составляют предмет особого разговора. Подчеркнем лишь одну принципиально важную мысль: природные токсины и яды являются продуктом длительной и сложной эволюции живого, и их поведение в биосфере находится под «бдительным надзором» самой природы.

Об особенностях токсикологии некоторых конкретных поллютантов, в появлении которых в биосфере повинен человек, будет сказано в следующих главах.

Подводя итог сказанному в предыдущих главах, следует особо отметить два факта.

1. Хозяйственная деятельность человечества оказала существенное влияние на биогеохимические циклы многих элементов в биосфере. С помощью «трех ударных сил», оказывающих наиболее сильное воздействие на окружающую среду (сельское хозяйство, энергетика и промышленное производство), человек значительно изменил биосферные потоки элементов, например металлов (Pb, Cu, Fe, Hg), а также биогенных элементов – углерода, серы, азота, фосфора, кислорода. Так, поток углерода, поступающего в Мировой океан в результате хозяйственной деятельности человека в бассейнах рек, достиг 1–2 млрд. т в год. В то же время количество воды, изымающееся из *гидрологического цикла* человеком, возросло до 3600 км^3 в год. За последние 300 лет по вине человека в атмосфере удвоилось количество метана, а содержание CO_2 возросло на 25%.

Вся история человечества сопровождалась постепенным увеличением числа используемых обществом химических элементов. В табл. 9.2 составленной в свое время В. И. Вернадским, показан рост числа элементов, вовлеченных человеком в хозяйственный оборот. Этот рост продолжается и сейчас.

Таблица 9.2

Использование человеком химических элементов

Эпоха	Абсолютное число используемых элементов	Число элементов (в %) к их общему числу
Древние века	19	21,3
До XVIII в.	26	29,2
XVIII – XIX вв.	28 – 50	31,4 – 56,1
Начало XX в.	59	66,3

2. Многие экологические проблемы, существующие сегодня, образованы не сбалансированностью циклов многих элементов, которая, в свою очередь, опять же обусловлена деятельностью человека. Так, хозяйственные выбросы свинца, кадмия и цинка, которые являются токсичными для живых организмов, превосходят естественные потоки этих

металлов в биосфере соответственно в 18, 5 и 3 раза. Для мышьяка, ртути и никеля это соотношение увеличилось в настоящее время в 2–3 раза. Наконец, из громадного разнообразия химических соединений, синтезированных человеком, многие даже при очень малых концентрациях доказывают мощное негативное воздействие на экологическую обстановку (например, ксенобиотики типа ДДТ, полихлорполициклические соединения ПХПС и хлорфторуглероды).

9.3. Воздействия на отдельные особи и популяции

Способность (или ее отсутствие) организма выводить поступившие в него посторонние вещества и восстанавливать нарушенное физиологическое равновесие в решающей степени зависит от окружающих условий и молекулярно-биологического потенциала самого организма. В принципе, все растения и животные способны в определенной мере выводить довольно высокие концентрации природных или иных посторонних веществ из организма экскрецией (например, в виде водорастворимых метаболитов), либо связывая их в своих тканях (например, галогенированные органические соединения в жировых тканях). Все процессы разложения, экскреции и отложения (связывания) называют *выведением* (или *элиминированием)* они могут происходить в организме либо последовательно, либо одновременно (что бывает реже). Воздействие (W) можно представить в виде интеграла разности «сумма концентраций (K) поглощенных веществ минус сумма концентраций выделившихся веществ (E) за время t»

$$W = \int_0^{\infty} (K - E)dt$$

Отсюда ясно, что нельзя подойти к сублетальной концентрации, если величина E близка к величине K. Поэтому любая кривая зависимости «воздействие – доза» начинается с нуля. На рис. 9.13 представлены идеализированные кривые такой зависимости, предельные дозы (пороги) и соответствующие степени нанесенного вредного воздействия.

Любое воздействие начинается с токсического порога, ниже которого не обнаруживается влияние вещества, Ему отвечает понятие экспериментально определяемого порога концентрации. Применяется также третий параметр: ПДК – «предельно допустимая концентрация». Определение этой величины облегчает оценку риска воздействия соответствующих веществ на чувствительные к ним организмы.

Время и эффект вредного воздействия могут не всегда коррелировать друг с другом. Бывают заметные биохимические изменения, нарушения поведения, различные формы сублетальных явлений на

физиологическом/морфологическом уровне, долговременные (отсроченные) вредные эффекты, приводящие к гибели организма, и, наконец, быстрая смерть. Перечисленные здесь явления не всегда происходят в указанной последовательности. За счет увеличения скорости экскреции, например через почки или у одноклеточных через стенки клетки, токсическая концентрация может снова снизиться до «переносимого» значения. Кроме того, инактивированные вначале вредным веществом ферментные системы после регенерации могут восстановить свою метаболическую активность и способствовать детоксикации.

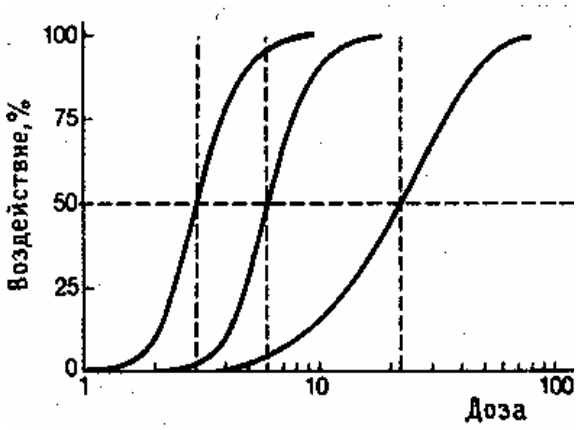


Рис. 9.13. Теоретическая зависимость воздействия от дозы (доза представлена в логарифмической шкале; показаны зависимости в различном положении и различной крутизны)

9.4. Молекулярно-биологические воздействия

Объем биоаккумуляции вредного вещества зависит прежде всего от его свойств, условий окружающей среды, экзогенных факторов и эндогенных факторов самого организма. Вредные вещества могут поступать из воды и воздуха (прямое поступление) или по цепи питания (косвенное поступление). Баланс между процессом поступления вредного вещества, с одной стороны, и накоплением и выделением – с другой, в большей степени зависит от внутренних процессов в организме, т. е. от его способности к накоплению и выделению вредных веществ. Некоторые организмы создали определенные механизмы поддержания процесса накопления в определенных «переносимых» границах. Например, рыбы и ракообразные перерабатывают (метаболизируют) ароматические углеводороды легче, чем большинство моллюсков. Кроме того, организм рыбы способен регулировать содержание меди и цинка в мышцах, однако не может этого делать в отношении ртути (болезнь *Мина-мата*). Многие

водные насекомые накапливают в своем теле металлы на уровне их концентрации в окружающей среде.

При очень малых дозах воздействия металлов некоторые ферменты осуществляют отложение металлов про запас «под контролем», причем откладывают эти металлы в форме металлорганических соединений, содержащих серу. Тиольные группы меркаптанов (буквальный перевод «улавливающие ртуть»), например, имеют кислотные свойства и образуют с ионами тяжелых металлов соли (меркаптиды). Эта реакция соответствует одному из самых известных конкурентных путей торможения активности ферментов, причем Au, Cd, Hg, Pb и Zn являются предпочтительными реакционными партнерами. Такие металлорганические соединения, содержащие серу, называют *металлотионинами.*

В последних работах по исследованию токсических последствий табакокурения показано, что в коре почек человека обнаруживается высокая концентрация тионина кадмия. Заядлые курильщики относятся к лицам, подвергающимся высокой дозе воздействия этого металла, что может привести к хроническому почечному отравлению кадмием и необратимым нарушениям проксимальных трубчатых клеток почек. У курящих обнаружено увеличенное в два раза по сравнению с некурящими содержание кадмия в коре почек. Свыше 50% кадмия откладывается в виде металлотионинов, остальной кадмий связан с лигандами иной природы. Как показано на рис. 9.14, содержание цинктионинов (как и медь-тионинов, не показанных на рисунке) остается неизменным при увеличении количества кадмия в коре почек. В то же время концентрация кадмия постепенно увеличивается, что может привести к функциональным расстройствам.

Многие ферменты специфически ингибируются химическими веществами, поступающими в организм из окружающей среды. Такое ингибирование происходит, например, в результате реакции активной тиольной группы с окислителем. При этом меркаптаны через соединения серы, аналогичные пероксидам, преобразуются в сульфоновые кислоты, а затем в дисульфиды. Так, например, цистеин переходит в цистин с образованием дисульфидного мостика. Преобразование в пептидах и белках нескольких групп цистеина часто приводит к потере каталитической активности некоторых ферментов

$$R{-}CH_2{-}SH + [O] \rightarrow R{-}CH_2{-}S{-}OH \xrightarrow[-\,OH^-]{+RCH_2S^-} R{-}CH_2{-}S{-}S{-}CH_2{-}R\ .$$

Цианиды тормозят ферментативные реакции различными путями: образуют стабильные комплексы со многими ионами металлов либо устраняют их и переводят фермент в дезактивированную форму. Цианиды реагируют также с карбонильными и простатическими группами или

разрывают дисульфидные мостики. Наиболее известно блокирование фермента дыхания – цитохром-С-оксидазы, содержащей медь и осуществляющей катализ, сопровождающийся изменением валентности меди.

Так как ферменты катализируют тысячи химических реакций, становится понятным, что любое изменение их структуры глубоко влияет на их специфичность и регуляторные свойства. Примером может служить торможение ферментативной активности рибофлавинкиназы. Этот фермент является переносчиком фосфата на рибофлавин (витамин B_2) и требует наличия катионов Mg^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+} для нормального функционирования в клетках животных. Катионы Ca^{2+} тормозят активность этого фермента. В растениях же необходимы Mg^{2+}, Zn^{2+} или Mn^{2+}, а Hg^{2+}, Fe^{2+} и Cu^{2+} оказываются сильными ингибиторами.

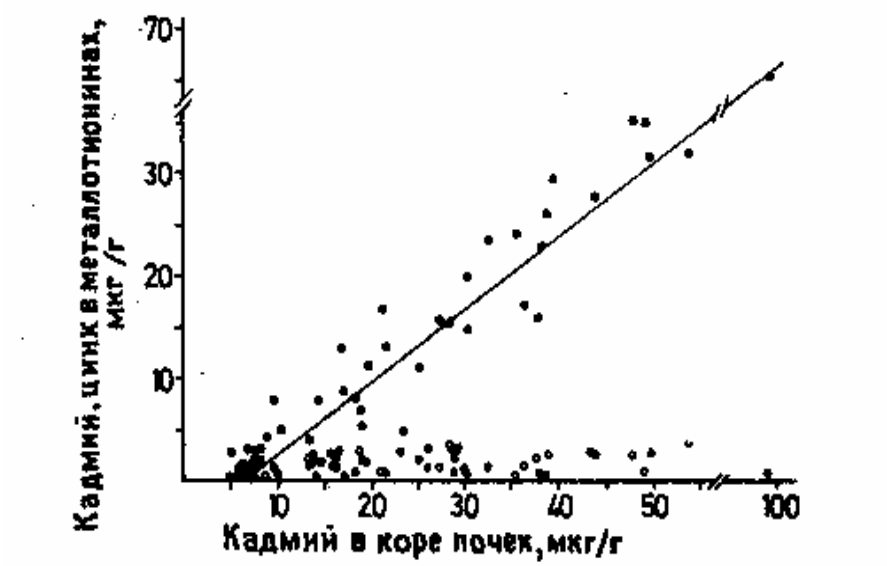


Рис. 9.14. Сравнение содержания кадмия в коре почек и количества кадмия и цинка в металлотмонинах

9.5. Нарушения обмена веществ и регуляторных процессов в клетке под действием химических веществ

Реакции обмена веществ в клетке, регулируемые ферментами – «метаболизм клеток», могут быть нарушены под действием веществ. Химические вещества, реагируя с гормонами с другими регуляторными системами, вызывают неконтролируемые превращения. Если под действием токсического вещества, находящегося в окружающей среде, изменяется генетический код, то в организме не может осуществляться синтез ферментов в активной форме.

Нарушение реакций окислительного *расщепления углеводов,* вызываемое токсичными металлами, также хорошо изучено и рас-

сматривается ниже на двух примерах реакций глюкозы. Фосфорилирование глюкозы ферментом гексокиназой особенно замедляется соединениями меди и мышьяка. Каталитические свойства фермента фосфоглицерат-мутазы, принимающей участие в превращении 3-фосфоглицериновой кислоты в 2-фосфоглицериновую кислоту, ослабляются под влиянием соединений ртути.

Ряд органических соединений, таких как пентахлорфенол, триэтилсвинец, триэтилцинк и 2,4-динитрофенол, разрывает цепь химических *процессов дыхания* на стадии реакции окислительного фосфорилирования. При этом окислительно-восстановительные системы не работают, но продолжается образование АТФ, что приводит к усилению дыхания.

Линдан, соединения кобальта и селена нарушают процесс *расщепления жирных кислот.* Пока не ясно, происходят эти нарушения в процессе окисления на ацетил-коферменте А или они затрагивают и цитратный цикл. При длительной экспозиции инсектицидов на рыб обнаруживается аддитивность действия и повышается ферментативная активность при синтезе жиров.

Микросомы печени, осуществляющие обмен веществ при образовании стероидных гормонов и жирных кислот, могут либо стимулироваться под действием посторонних веществ, либо их активность подавляется. (Следует также учитывать изменения эндоплазматических ретикулярных клеток из-за повреждений микросомы.) Органические эфиры фосфорной кислоты, CCl_4, CS_2 и CO вызывают снижение ферментативной активности микросом.

Доказано воздействие многих хлорорганических соединений и полиароматических углеводородов на ферментативную активность микросом. Хлордан, диэльдрин, ПХБ и ДДТ вызывают ускорение гидроксилирования (дезактивации) таких стероидных гормонов, как андроген, эстроген и глюкокортикоиды.

В процессе биологического синтеза белков особенно легко повреждаются содержащие тиольные группы аминацил-тРНК-синтетазы в результате уже упомянутого влияния окислителей.

В *регуляторных процессах и процессах роста растений* их клетки подвергаются действию «ауксиноподобных» гербицидов. Широкой известностью пользуется дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), которая селективно блокирует рост лиственных растений и находит применение при выращивании пшеницы. В очень малых концентрациях «ауксиновые» гербициды проявляют такие же способствующие росту растений свойства, как и природный фитогормон (например, индолил-3-уксусная кислота). Если же их применяют в повышенных концентрациях для уничтожения растений, то они нарушают нормальное развитие и рост клеток и в конце концов убивают их. Причиной аномального роста

являются нарушения метаболизма нуклеиновых кислот; синтетические ауксины, вероятно, реагируют как простетические группы ферментов.

У животных известны нарушения нормального роста и развития при болезнях щитовидной железы. Они могут быть вызваны, например, хлорорганическими пестицидами и ПХВ, причем проявляется поразительное сходство структуры бифенилов и гормона щитовидной железы – тиронина (бифенилэфира).

9.6. Мутагенность и канцерогенность

Уже в течение многих лет известно, что повсеместно распространенные вещества, такие как ДДТ, ПХБ и полиароматические углеводороды (ПАУ), потенциально обладают мутагенным и канцерогенным воздействием (табл. 9.3).

Их опасное действие на человека проявляется в результате длительного контакта этих веществ, содержащихся в воздухе и пищевых продуктах. По данным, полученным на основе экспериментов с животными, канцерогенное действие осуществляется в результате двухступенчатого механизма: «генотоксической инициации» и «эпигенетического промотирования». *Инициаторы* в процессе взаимодействия с ДНК вызывают необратимые соматические мутации, причём достаточно очень малой дозы инициатора; предполагают, что для этого воздействия не существует пороговых значений концентрации, ниже которых оно не проявляется.

Промотору требуется более длительное время воздействия на организм, чтобы он вызвал появление опухоли. Промоторы имеют очень большое значение, поскольку они усиливают действие инициатора, а их собственное воздействие на организм в течение некоторого времени является обратимым. На основании экспериментов с животными показано, что фенобарбитал, ДДТ, ТХДД, ПХБ и хлороформ являются промоторами. Промотирующее действие гепатоканцерогенов обнаруживают по увеличению так называемых пренеопластических клеточных образований.

Уже доказано мутагенное действие ПАУ (например, бензопиренов), нитроароматических соединений и многих пестицидов, типичных химических продуктов, поступающих в водоемы и почву. Многие соединения обладают генотоксическим потенциалом, т.е. способны приводить к значительным генетическим изменениям.

Мутагены могут вызвать генетическую мутацию или привести к мутациям более крупных биохимических единиц (например, таких, как хромосомы, ДНК), образованию аддуктов, разрыву цепочки, невозможности восстановления структуры. Следующими стадиями мутаций могут оказаться хромосомная аберрация, обмен хроматид и т. п.

Таблица 9.3

Примеры инициаторов и промоторов канцерогенеза

Инициаторы	Промоторы
Химические соединения ПАУ	
Поликонденсированные ароматические углеводороды, нитрозамины.	Кретоновое масло
N-Нитрозо-N-нитро-N-метил-гуанидин	Фенобарбитал
Диметилнитрозамин	ДДТ, ПХБ
Диэтилнитрозамин	ТХДД
N-Нитрозо-N-метилмочевина	Хлороформ
Уретан	Сахарин (под вопросом)
1, 2- Диметилгидразин	Цикламат
Биологические свойства	
Канцерогенный	Сам по себе не канцерогенный
Экспозиция перед воздействием промотора	Действие проявляется после появления инициатора
Достаточно однократного введения	Необходимо длительное воздействие
Влияние необратимо и аддитивно	В начале действие обратимо и не аддитивно
Не существует определенной пороговой концентрации	Пороговая концентрация, вероятно, зависит от времени воздействия дозы
Мутагенное действие	Мутагенное действие отсутствует

Процесс возникновения мутаций можно легко представить себе на примере реакций алкилирующих веществ. Введением алкильных групп в основания ДНК (например, гуанин) последние выводятся из ДНК, что приводит к прекращению воспроизведения последовательности оснований в цепочке ДНК. Нитриты также способствуют мутациям, например, в процессе которых происходит дезаминирование цитозина в урацил или аденина в гипоксантин (рис. 9.15). Так как урацил и гипоксантин также способны к реакциям присоединения, как тимин и гуанин, это приводит к изменениям транскрипции цепи ДНК.

Рассмотренное воздействие химических веществ на гены в зависимости от того, происходит оно в половой клетке или соматической, приводит либо к наследуемым изменениям, либо к фенотипическим изменениям в организме. Обычно мутагенными воздействиями называют лишь те, которые вызывают наследуемые изменения последовательности нуклеотидов гена, определяющей строение белка.

В нереплицируемых соматических клетках искажения процесса транскрипции приводит к необратимому повреждению ДНК, и, следовательно, к изменениям фенотипа клеток. Однако благодаря тому, что такие изменения не наследуются, их нельзя называть генетическими в обычном понимании этого термина.

Хромосомные аберрации в половых клетках приводят к смерти эмбриона или аномалиям развития новорожденных. Воздействие на соматические клетки, вызываемые химическими веществами, как, например, нарушение митоза – деления клеток, трудно распознаются и их вряд ли удается прогнозировать. Это объясняется тем, что такие клетки изолируются и заменяются на здоровые самим организмом.

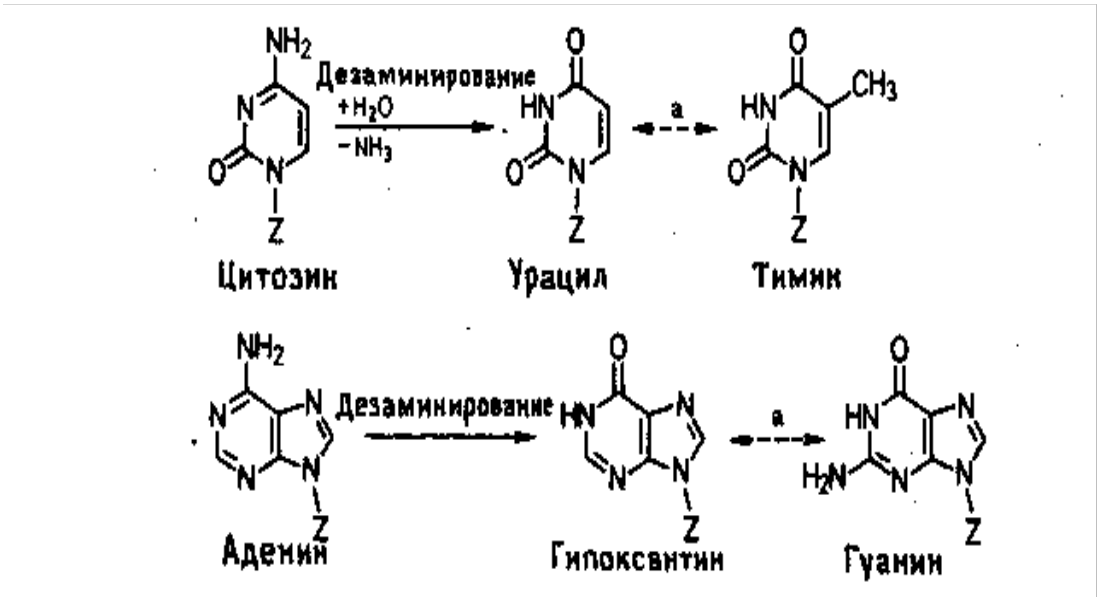


Рис. 9.15. Остатки ДНК, которые дезаминируются до оснований, также обладающих способностью связываться с ДНК; а – возможен взаимный обмен при транскрипции; Z – сахар

Основные критерии возникновения мутагенеза (канцерогенеза) под действием химических веществ

– Активирование ферментов, изменения ДНК, а также других макромолекул и нуклеофильных групп при воздействии электрофильных веществ.

– Клетки лишь ограниченно способны удалять химически модифицированные участки ДНК и восстанавливать ее структуру.

– Способность химических веществ активировать ферменты в значительной степени зависит от вида клетки и стадии ее развития (фазы пролиферации), а также от вида организма.

– Канцерогенез представляет собой многоступенчатый процесс, обусловленный последовательностью синергически действующих факторов, которые частично зависят от «микроокружения» раковой клетки.

– Промоторы образования опухоли лишь условно мутагенны, однако мутагенные химические вещества могут оказаться промоторами появления опухоли; мутации лишь в определенных условиях приводят к образованию опухолей.

– Химические канцерогены действуют либо непосредственно (без метаболического активирования, например, галогениды, эпоксиды, сульфаталкильные эфиры), либо опосредованно через метаболиты (после предварительного активирования в результате биохимического окисления или гидроксилирования, как, например, ПАУ, азо-, N-нитрозосоединения, ароматические амины, металлы).

9.7. Воздействия на поведение организмов

Весьма чувствительной характеристикой для оценки токсичности химического вещества являются исследования *нарушения поведения* организма в результате суммарного воздействия на биохимические и физиологические процессы. Здесь оказывается невозможной обобщенная экстраполяция данных по $ЛД_{50}$ на важнейшие «реакции организма», что показано на примере опытов на птенцах перепелов.

Было, например, обнаружено изменение реакций организма на 10–15%. Полученные данные сравнивались с результатами, полученными при исследований острой токсичности (определение $ЛД_{50}$ в течение 5 сут). Испытывались химические продукты – арохлор 1254 (смесь ПХБ), а также инсектициды хлордан, диэльдрин и эндрин. Было установлено, что для явного изменения поведения, обусловленного воздействием химических препаратов, достаточно значительно меньших концентраций, чем необходимо для определения $ЛД_{50}$ (с коэффициентом снижения концентрации 14,5; 14; 11,5 и 9 по указанным веществам).

При определении сублетальной токсичности рыб в качестве признаков воздействия токсина использовалось изменение плавательных функций. Изучение поведения рыб проводилось в процессе длительных наблюдений,

иногда на основе записи плавательных движений рыб видеомагнитофоном, а также расчетных данных.

Глава 10

ПЕРЕРАБОТКА ОТХОДОВ

В результате очистки воды, воздуха и почвы – основных экологических систем нашего обитания, как правило, образуется значительное количество отходов самого различного состава. Все эти отходы требуют их последующего уничтожения или получения из них различных веществ, способных найти себе дальнейшее применение в самых различных хозяйственных областях.

Самым простым способом уничтожения отходов – является их сжигание. Но в ряде случаев эти отходы либо имеют жидкую консистенцию и просто не способны к возгоранию, либо в процессе горения выделяется такое количество токсических веществ, обезвреживание которых требует больших затрат, которые не могут компенсировать в ряде случаев выбранный способ уничтожения. Так как в предыдущих главах уже кратко упоминалась возможность детоксикации ряда отходов и их последующего использования, то в этой главе будут описаны, главным образом, те методы, которые имеют практическое значения и, как правило, происходят при использовании различных микроорганизмов, т.е. имеют ярко выраженную биотехнологическую направленность.

10.1. Переработка отходов, образующихся в процессе очистки воды и воздуха

Как уже упоминалось ранее, в широко распространенных установках для очистки сточных вод выполняются четыре основных операции.

1. При первичной обработке удаляются твердые частицы, которые либо отбрасываются, либо направляются в биореактор.
2. На втором этапе происходит разрушение растворенных органических веществ при участии природных аэробных микроорганизмов. Образующийся ил, состоящий главным образом из микробных клеток, либо удаляется, либо вновь поступает в биореактор. По технологии, использующей активный ил, часть его возвращается в аэроционный тэнк.
3. На третьем этапе (необязательном) проводится химическое осаждение и разделение фосфора и азота.

4. Для переработки ила, образующегося на первом и втором этапах, обычно используется процесс анаэробного разложения. При этом уменьшается объем осадка и количество патогенов, устраняется запах, а кроме того образуется ценное органическое топливо – метан.

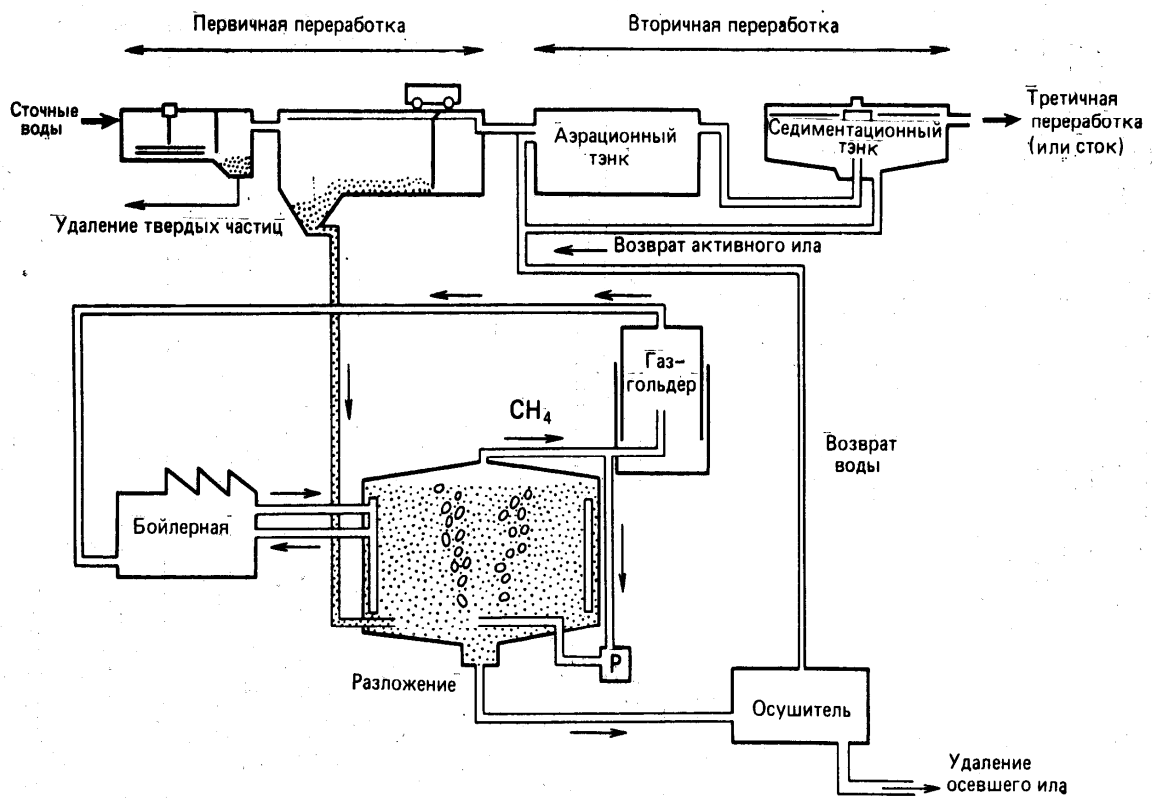


Рис.10.1. Схема переработки отходов путем анаэробного разложения

Подобные процессы применяют при переработке промышленных сточных вод, особенно в химической, пищевой и целлюлозно-бумажной промышленности. Совершенно очевидно, что любые усовершенствования этих процессов найдут немедленное применение в промышленности, как это имеет место в сельском хозяйстве, о чем мы поговорим несколько позже.

10.2. Аэробная переработка отходов

Аэробная переработка стоков – это самая обширная область контролируемого использования микроорганизмов в биотехнологии. Она включает следующие стадии: 1) адсорбция субстрата на клеточной поверхности; 2) расщепление адсорбированного субстрата внеклеточными ферментами; 3) поглощение растворенных веществ клетками; 4) рост и

эндогенное дыхание; 5) высвобождение экскретируемых продуктов; 6) «выедание» первичной популяции организмов вторичными потребителями. В идеале это должно приводить к полной минерализации отходов до простых солей, газов и воды. Эффективность переработки пропорциональна количеству биомассы и времени контактирования ее с отходами.

Системы аэробной переработки можно разделить на системы с перколяционными фильтрами и системы с использованием активного ила.

10.3. Перколяционные фильтры

Перколяционный фильтр был самой первой системой, примененной для биологической переработки отходов, причем его конструкция фактически не изменилась со времени создания в 1890 г. Эта система используется в 70% очистных сооружений Европы и Америки и обладает рядом преимуществ, которые состоят в простоте, надежности, малых эксплуатационных расходах, образовании небольших излишков биомассы и возможности длительного использования установки (в течение 30 – 50 лет).

Основной недостаток перколяционного фильтра – избыточный рост на нем микроорганизмов; это ухудшает вентиляцию, ограничивает протекание жидкости и приводит в конечном счете к засорению фильтра и выходу его из строя. Одна из недавних модификаций установки состоит в использовании чередующегося двойного фильтрования (ЧДФ), когда фильтры, на которые сначала поступает поток жидкости, периодически меняют местами с другими фильтрами. ЧДФ особенно ценно при очистке промышленных стоков. Для разрушения слоев грязи в толще фильтров используют также обратную циркуляцию и пульсирующую подачу. Это улучшает величину биохимической потребности в кислороде (БПК), но снижает нитрифицирующую активность. Другие модификации в конструкции и работе установок с перколяционными фильтрами состоят в уменьшении скорости поступления жидкости для более равномерного распределения биомассы, а также в использовании прямой двойной фильтрации с большим объемом среды, когда на первый фильтр поступает больший объем среды и тем самым увеличивается его загрузка.

В 1970 году на смену клинкеру, камню или гравию в системах с перколяционными фильтрами пришли пластмассы. Это позволило применять такие системы для переработки некоторых промышленных стоков высокой концентрации. Другим важным преимуществом явилось то, что пластмассы – легкий материал и это позволяет строить высокие, не занимающие много места очистные сооружения. Для создания

оптимальной поверхностной площади, вентиляции и пористости пластмассы размалывают.

Основное изменение в конструкцию очистных сооружений в Англии было внесено в 1973 году, когда был создан вращающийся биологический реактор. Он представляет собой вращающиеся «соты» из пластиковых полос, попеременно погружаемые в сточные воды и поднимаемые на поверхность. При таком способе увеличивается площадь поверхности, с которой может контактировать биомасса, и улучшается аэрация.

Среда, в которой находится перколяционный фильтр, не является водной в прямом смысле, поскольку это всего лишь тонкая водная пленка над слоем биомассы. Определить, какие именно микроорганизмы присутствуют в среде, довольно трудно из-за сложности и гетерогенности биомассы. По-видимому, активной основной группой бактерий, участвующих в переработке сточных вод, служат *Zoogloea*, хотя определенную роль играет и ряд других бактерий. В очистных сооружениях отмечается также активный рост некоторых видов нитчатых бактерий и грибов. Из водорослей чаще всего присутствуют сине-зеленые (*Cyanophyceae*) и *Chlorophyceae*. Встречаются и многочисленные *Metazoa*, в том числе земляные черви, насекомые и ракообразные. Мухи и черви очень важны для регуляции развития пленок.

10.4. Активный ил

Переработка отходов с помощью активного ила, осуществляемая сложной смесью микроорганизмов, была предложена в 1914 г. Этот процесс более эффективен, чем фильтрация, и позволяет перерабатывать сточные воды в количестве, в десять раз превышающем объем реактора. Однако он обладает рядом недостатков: более высокими эксплуатационными расходами из-за необходимости перемешивания и аэрации; большими трудностями в осуществлении и поддержании процесса; образованием большого избытка биомассы. Несмотря на все это, процесс, использующий активный ил, остается наиболее распространенным методом переработки сточных вод в густонаселенных районах, поскольку требует меньших площадей, чем эквивалентная фильтрационная система.

Как и в фильтрационные системы, в систему с активным илом были внесены некоторые изменения. Следующие из них связаны с аэрацией:

1. Градиентная аэрация, приводящая интенсивность аэрации в соответствие с потребностью в кислороде, которая на входе больше, чем на выходе.

2. Ступенчатая аэрация, при которой по всей длине тэнка сточные воды поступают с интервалами.

3. Контактная стабилизация, при которой повторно используемый ил аэрируется, что способствует более полной утилизации микроорганизмами любых доступных питательных компонентов. Это приводит к более полной ассимиляции отходов при возврате в основные рабочие тэнки. В результате объем ила на стадии аэробного разложения уменьшается, и поэтому в принципе это аналогично увеличению аэрации.

4. Использование чистого кислорода в закрытых тэнках, которые поэтому могут работать при более высоких концентрациях биомассы; таким образом уменьшается время пребывания сточных вод в тэнке и, кроме того, решается проблема «разбухания» (избыточного роста нитчатых бактерий и грибов, препятствующего оседанию ила).

5. Разработка колонного эрлифтного ферментера компанией ICI в 1974 г. (рис. 10.2). Он более экономичен, чем обычный, благодаря уменьшению времени пребывания сточных вод в тэнке и снижению эксплуатационных расходов.

Активный ил – это истинно водная среда. Как и в перколяционных фильтрах, основная группа бактерий, участвующих в процессе переработки, – это *Zoogloea*. Считается, что активно растет только небольшая часть флокуляционного ила. По сравнению с перколяционными фильтрами в активном иле наблюдается меньшее экологическое разнообразие. Рост водорослей ограничивается недостатком света, а виды и разнообразие присутствующих в иле простейших определяются степенью переработки отходов (рис. 10.3).

Для успешной переработки бытовых и промышленных отходов необходимо точно знать состав и концентрацию стоков. Это служит «руководством к действию»: зная качественные и количественные характеристики среды, можно сразу установить, какой микробный посевной материал необходим для инициации работы системы. Часто бывает трудно показать, что именно те микроорганизмы, которых выделяют из систем биологической переработки отходов, осуществляют окисление присутствующих соединений.

Микробиологическое изучение любой системы, использующей активный ил, включает: 1) идентификацию микроорганизмов и определение их численности; 2) оценку микробиологической активности как популяции в целом, так и отдельных видов; 3) оценку соотношения между (1) и (2), с одной стороны, и количеством вводимых питательных веществ и продуктов переработки – с другой.

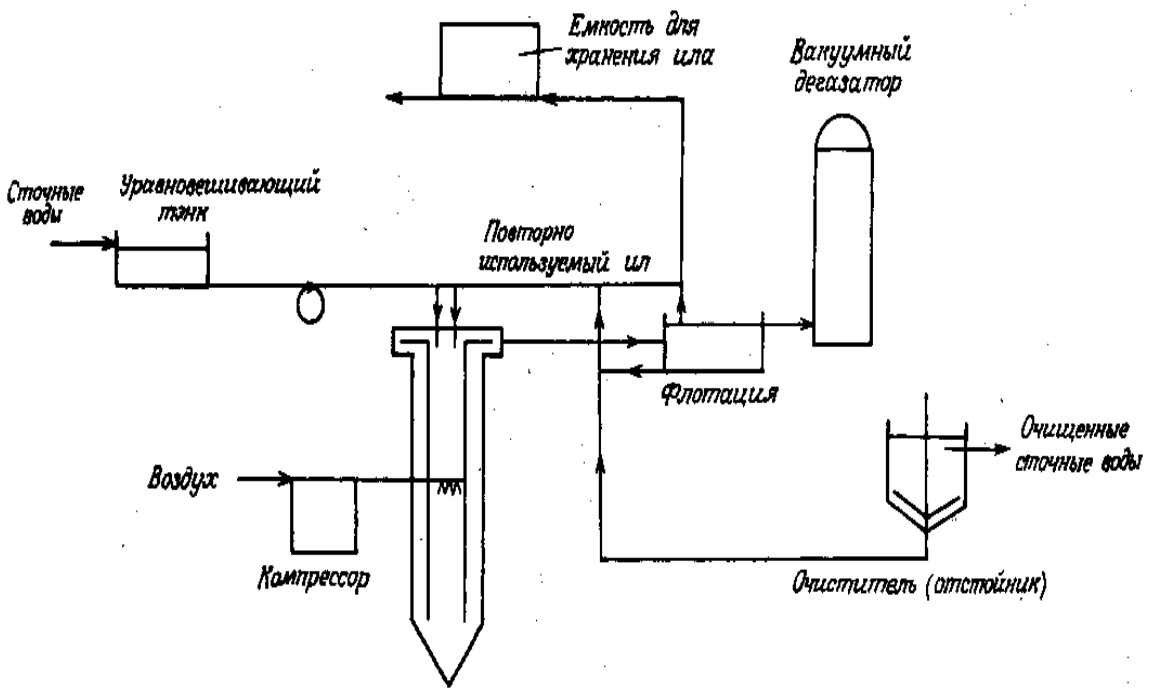


Рис. 10.2. Колонный эрлифтный ферментер

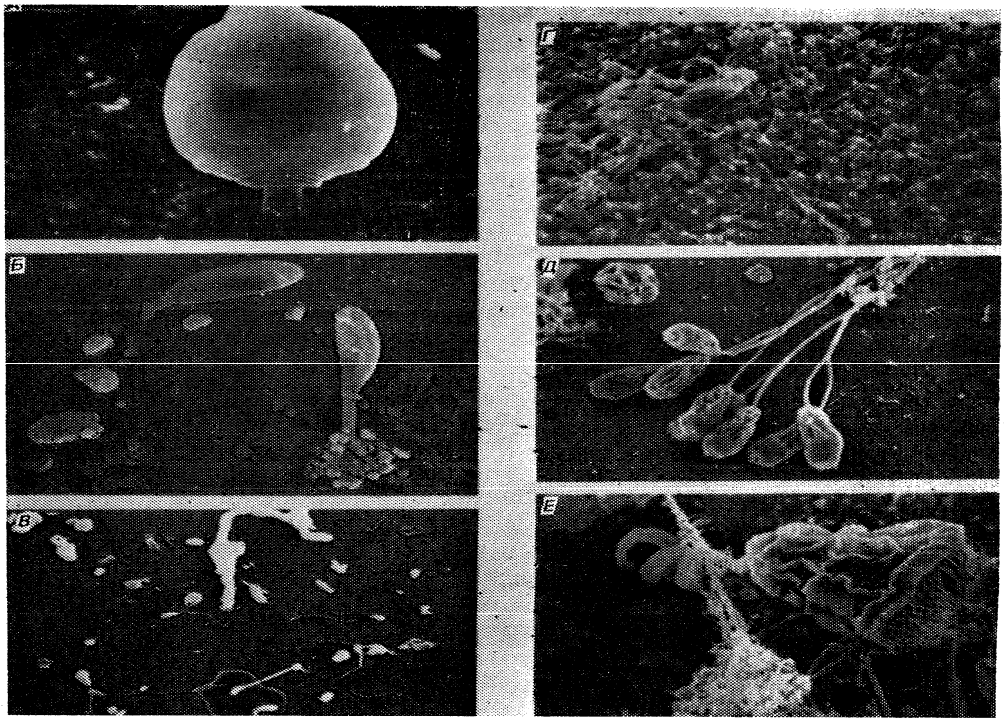


Рис. 10.3. Микроорганизмы, присутствующие в активном иле. Микрофотографии: получены с помощью сканирующего электронного микроскопа и любезно предоставлены Дж. Моррисом. *А. Epistylis* (x1000) *Б.* Стебельчатые бактерии (x16000). *В.* Жгутиковые бактерии (x5000). *Т. Vaginocolidae* (X750). Д. Колония *Epistylis* sp. (X350). *Е. Vorticella* sp. (x1000)

Микробиологическую активность активных илов можно оценивать по приросту биомассы или по интенсивности общего метаболизма; последний включает изменения, происходящие в среде. Измерения могут проводиться и для какой-то отдельной популяции микроорганизмов. Можно показать, что активность ила связана с определенными бактериями, точно подсчитать их число и определить метаболическую активность. Далее можно выяснить, в какой мере та или иная специфическая активность ила определяется конкретными видами бактерий с известными свойствами, и установить, какое влияние оказывают на них неблагоприятные условия, в которых они оказываются из-за поступления в среду тех или иных питательных веществ или продуктов метаболизма других микроорганизмов. Для сточных вод, поступающих в емкость с активным илом, характерны высокие концентрации органических соединений и, следовательно, наличие больших количеств хемоорганотрофных видов, например *Achromobacter, Flavobacterium, Pseudomonas* и *Moraxella, а* также многих других бактерий. При высоких концентрациях неорганических соединений в стоках обнаруживаются бактерии *Thiobacillus, Nitrosomonas, Nitrobacter* и *Ferrobacillus* spp. окисляющие соответственно серу, аммиак и железо. Эти организмы были выделены из систем для переработки отходов и идентифицированы с помощью методов селективных культур. В ходе этих работ важно установить, играют ли какие-либо виды главенствующую роль в тех процессах, которые протекают в активном иле. Этот аспект часто недооценивается, особенно не биологами. Нередко бывает трудно однозначно установить роль того или иного микроорганизма. Например, если из системы по переработке отходов выделены *Tbiobacillus,* окисляющие соединения серы, то это еще не означает, что вся активность такого рода определяется именно этими микроорганизмами: частичное окисление ряда соединений серы осуществляют и виды *Pseudomonas.*

Взаимосвязи между организмами, участвующими в катаболизме органических и неорганических субстратов, имеют важное значение для регуляции процессов, происходящих в активном иле. Промежуточные продукты метаболизма у одного вида бактерий способы оказывать влияние на процессы деградации у другого. Например, известно, что фенол подавляет активность организмов, окисляющих аммиак: он может ингибировать этот окислительный процесс даже при столь малых концентрациях, как 3 – 4 млн $^{-1}$.

Промежуточные продукты расщепления бензойной кислоты до катехола, сукцината и ацетата ингибируют образование «ферментов, участвующих в начальных этапах расщепления. Катехол и сукцинат подавляют синтез ферментов, разрушающих бензоилформиат и бензальдегид, по механизму обратной связи, а ацетат действует как

катаболитный репрессор: наличие простого органического соединения подавляет расщепление более сложных молекул до тех пор, пока это более простое соединение не будет использовано. Когда ингибирование снимается, синтезируются новые ферменты, ответственные за расщепление более сложных ароматических структур. На практике при наличии в отходах гомологичных рядов каких-либо соединений необходимо образование ферментов, способных справиться с расщеплением самой сложной молекулы данного ряда. Полное расщепление таких соединений должно происходить в течение определенного минимального времени удержания (нахождения отходов в реакторе) в процессе переработки. Следовательно, можно предсказать, какая обработка потребуется для окисления фенольных соединений; например, чем сложнее боковая цепь молекулы, тем больше времени необходимо для ферментативного разрушения этого вещества.

Эффективность данного процесса можно повысить, изучив механизмы регуляции метаболизма в микрофлоре систем с активным илом. Регуляция биодеградации – это сложная задача. Однако, зная биохимию соответствующих процессов, мы, по-видимому, сможем вмешиваться и в их регуляцию. Например, добавление к илу промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот в низких концентрациях (2–5 мг/л), глюкозы, аминокислот и витаминов (в частности, аланина и никотиновой кислоты) приводит к ускорению окисления ряда соединений. Введение этих промежуточных продуктов в состав биомассы увеличивает энергетические потребности системы, стимулирует синтез АТР за счет усиленного окисления неорганических веществ типа серы или аммиака. Понимание биохимии подобных процессов, видимо, даст возможность вмешиваться в процессы регуляции метаболизма.

Задача микробиолога-биотехнолога при разработке методов очистки сточных вод состоит в более полном изучении и учете взаимосвязи между активностью микроорганизмов, образованием хлопьев ила и производительностью установки по переработке отходов. В этом смысле превращения в системе активного ила следует рассматривать в основном как окислительные процессы во влажной среде, сопровождающиеся увеличением объема ила, которое можно расценивать как вредное или полезное (последнее – когда ил используется повторно). Совершенно очевидно, что биологический способ переработки пригоден для множества различных органических и неорганических соединений и устраняет их вредное воздействие на окружающую среду.

Акт о защите среды от загрязнений от 1974 г. по мере претворения его в жизнь будет оказывать все возрастающее влияние на технологию очистки сточных вод. Термин «биодеградация» используется сейчас очень широко, но имеет множество толкований. Иногда под биодеградацией понимают полную минерализацию какого-либо соединения

микроорганизмами с образованием углекислого газа, сульфата, нитрата и воды; это одна крайность. Другая крайность состоит в том, что данный термин используют применительно к незначительным изменениям соединений, приводящим к утрате некоторых характерных их свойств. Стандартные методы оценки деградации позволяют определить термин «биодеградация» следующим образом: 1) первичная деградация, при которой характерные свойства исходного соединения утрачиваются и перестают выявляться специфическими химическими тестами; 2) допустимая для окружающей среды биодеградация, при которой происходит минимальное изменение исходного соединения, необходимое для утраты его свойств (оба этих определения основаны на произвольных критериях и поэтому неточны); 3) окончательная биодеградация, включающая полное превращение исходного соединения в неорганические конечные продукты и связанная с нормальными процессами метаболизма микробов.

В ходе изучения деградации широкого круга органических веществ были выделены микроорганизмы, способные к разрушению весьма необычных соединений (рис. 10.4 и 10.5).

10.5. Принцип «псевдоожиженного слоя»

Данная технология, введенная в практику в 1980 г., во многих отношениях представляет собой сочетание систем перколяционных фильтров и активного ила. Она весьма экономична благодаря использованию высоких концентраций микроорганизмов и отсутствию необходимости в осаждении конечных продуктов. Существуют два основных типа установок.

1. Уловитель Саймона Хартли. Он был разработан на основании исследований, проведенных в научно-техническом институте Манчестерского университета. Биомассу наращивают в пустотах внутри прокладок из пористого полиэфира, которые удерживаются внутри реактора с помощью сеток. Прокладки периодически удаляют из реактора, густую биомассу (до 15 кг на каждый кубометр обводненного носителя) отжимают и пустые прокладки возвращают в реактор.
2. Оксигенатор Дорра – Оливера. Здесь в качестве подложки используется песок; его периодически выпускают из реактора, очищают и используют снова.

Возможное нежелательное последствие интенсификации аэробной обработки – это излишнее образование ила. Стоимость его удаления может составить до 50% расходов на переработку сточных вод. Альтернативные решения состоят или в последующем использовании этого ила, или в разобщении анаболической и катаболической активности для неполного превращения субстрата в биомассу (этого можно достичь,

создав условия постоянной нехватки микроэлементов или делая перерывы в подпитке).

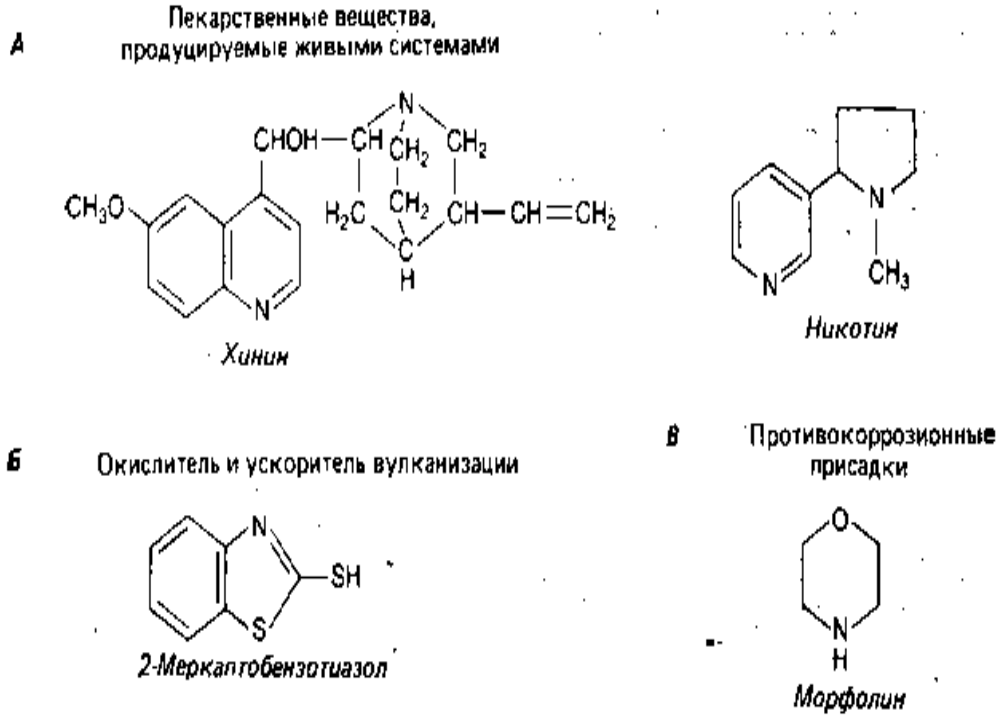


Рис. 10.4. Основные группы соединений, которые обнаруживаются в отходах производства лекарственных препаратов, синтетических гербицидов и других нефтехимических продуктов и подвержены биодеградации.

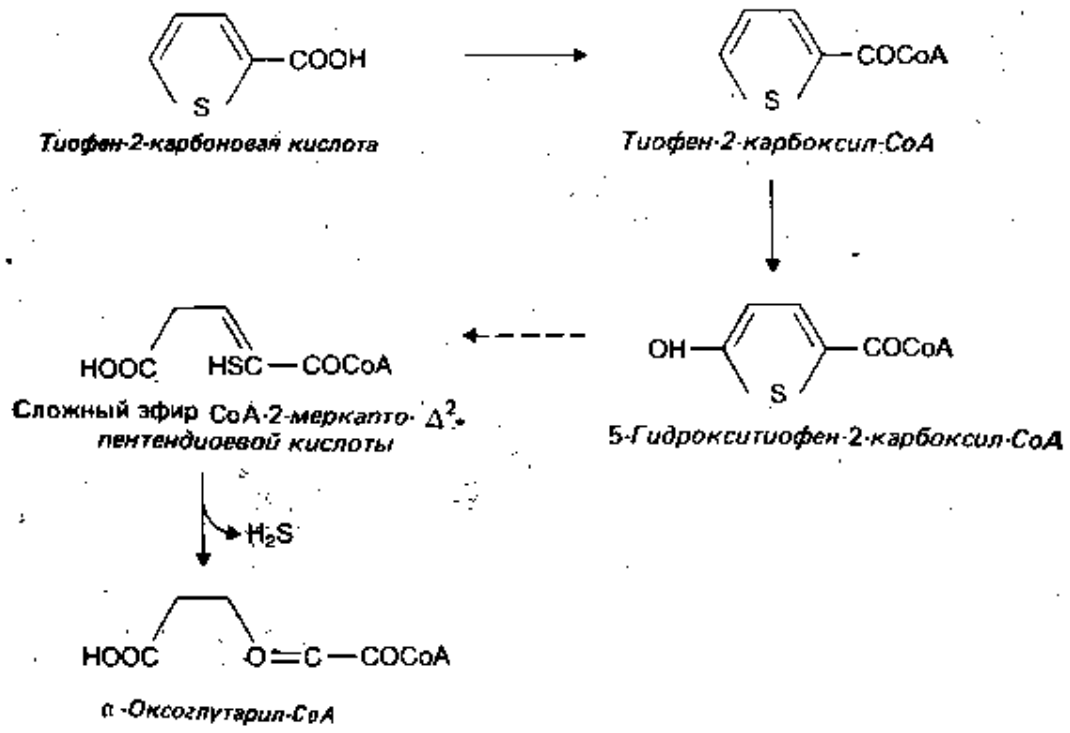


Рис. 10.5. Промежуочный метаболизм аналога тиофена в одном из видов *Ftavobacterium*

10.6. Анаэробное разложение

Все возрастающая стоимость переработки отходов с помощью аэробного разложения и энергетический кризис, с одной стороны, и новые достижения микробиологии и технологии – с другой, возродили интерес к анаэробной переработке. Самая распространенная технология анаэробной переработки – разложение ила сточных вод. Эта хорошо разработанная технология с успехом используется с 1901 г. Однако здесь существует ряд проблем, обусловленных малой скоростью роста облигатных анаэробных метанобразующих бактерий, которые используются в данной системе. К ним относятся также чувствительность к различным воздействиям и неприспособленность к изменениям нагрузки. Конверсия субстрата также происходит довольно медленно и поэтому обходится дорого. Некоторые проблемы связаны с неудачными инженерными решениями. Тем не менее, этот подход представляется перспективным с точки зрения биотехнологии; например, можно добавить к отходам ферменты для повышения эффективности процесса или попытаться усилить контроль за переработкой путем изменения тех или иных биологических параметров.

Анаэробная ферментация отходов или растительных культур, специально выращиваемых для получения энергии, очень перспективна для экономичного получения газообразного топлива при умеренных температурах (30–35°С). Эта новая отрасль биотехнологии была развита микробиологами в сотрудничестве с инженерами-химиками и механиками, работниками сельского хозяйства и экономистами.

При выращивании сообщества различных бактерий на смеси органических соединений происходят сложные биохимические реакции (рис. 10.6) Метанобразующие бактерии способны к синтезу энергоносителя непосредственно из водорода и углекислого газа. Микроорганизмы, расщепляющие целлюлозу, синтезируют жирные кислоты, которые могут подвергаться восстановительному расщеплению до метана и углекислого газа; некоторые бактерии способны даже образовывать молекулярный водород. Описано сложное, взаимозависимое микробное сообщество, в котором можно выделить три группы бактерий: бактерии, осуществляющие гидролиз и брожение, бактерии, образующие водород и уксусную кислоту, а также водородотрофные метанооразующие бактерии. Метанобразующие бактерии растут медленно и очень чувствительны к резким изменениям загрузки реактора и накоплению водорода. Можно надеяться, что усовершенствование конструкции реактора и контроль за процессом помогут уменьшить колебания загрузки реактора и позволят контролировать ее, определяя содержание водорода и промежуточных продуктов типа пропионовой и масляной кислот. Проблемы перегрузки, особенно существенные в случае промышленных стоков, можно обойти,

увеличивая скорости оборота и применяя в качестве буферных систем сточные воды химических предприятий и бытовые сточные воды. Для увеличения метаногенной активности бактерий можно использовать обычные методы отбора или методы генетической инженерии. Оценить возможность использования данного процесса при переработке смешанных отходов, а также охарактеризовать потребности в питательных веществах и усовершенствовать начальный этап процесса за счет уменьшения количества необходимого микробного посевного материала поможет дальнейшее изучение физиологии и экологии участвующих в процессе микроорганизмов (рис. 10.6).

Для получения энергии и полезных побочных продуктов можно использовать самые разнообразные отходы и сырье.

К культурам, выращиваемым специально в целях конверсии энергии в газообразное топливо, относится кассава, конечными продуктами служат метанол или этанол. Некоторые страны, например Бразилия, Австралия и Новая Зеландия, намерены использовать подобные вещества, получаемые биологическим путем, в качестве основного источника топлива. Сходные проекты обсуждаются и в некоторых европейских странах, например в Финляндии, Швеции и Ирландии.

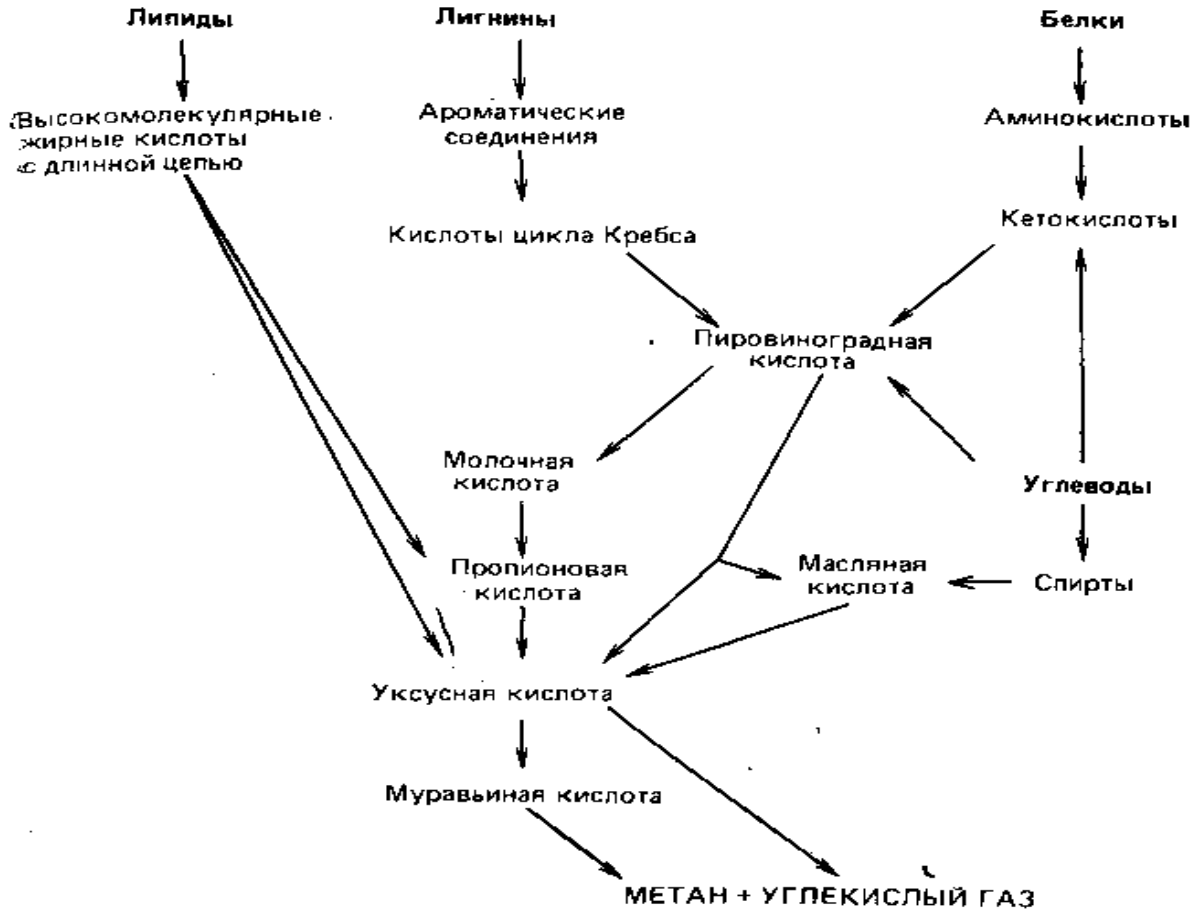


Рис. 10.6. Биохимическое расщепление отдельных соединений до метана и углекислого газа при анаэробном разложении отходов

В Англии работа по биоконверсии энергии проводится в рамках программы по использованию солнечной энергии (министерства энергетики), за счет этой программы финансируются и проекты ЕЭС по получению энергии биологическими способами. В США используется множество подходов; так, одно очистное сооружение за счет биологической конверсии бытового мусора позволяет получить газ в количестве, достаточном для обеспечения им 12 тыс. домов. Основные микробиологические и технологические проблемы этой технологии и перспективы ее применения в развивающихся странах были рассмотрены на Первой международной конференции по анаэробному разложению, состоявшейся в Кардиффе в 1979 году. Анаэробные ферментеры могут применяться также в целях получения промежуточных продуктов для химической промышленности (например, уксусной, молочной и акриловой кислот в качестве химического сырья, идущего на переработку).

Однако широкое использование анаэробных реакторов в целях получения газообразного топлива сдерживается рядом причин. Традиционно в конструкцию реакторов входили тэнки с мешалками, рассчитанные на длительное пребывание перерабатываемого материала. В целях сокращения этого времени были созданы реакторы, в которых переработанные отходы отделяются от биомассы, используемой повторно. Чтобы процесс был экономически выгодным, должны быть разработаны недорогие конструкции, которые не засоряются и включают простые в эксплуатации устройства для отвода тепла. Основные усилия в области анаэробной ферментации должны быть направлены на изучение этапов, лимитирующих скорость процесса. На первом из них происходит гидролиз целлюлозы и крахмала с образованием растворимых органических кислот и спирта. Вторым лимитирующим этапом может быть образование метана из этих жирных кислот с короткой цепью. Моделирование процесса разложения осложняется тем, что трудно сказать, какие микроорганизмы доминируют на том или ином этапе, и установить, какие именно этапы лимитируют скорость процесса. Возможно, в условиях реактора лимитирующими окажутся другие стадии. Крайне важно определить количества образуемых микроорганизмами газов, особенно водорода, диоксида углерода и сероводорода, который ингибирует активность метанобразующих бактерий. Недавно было проведено исследование анаэробного превращения ряда субстратов культурами известных микроорганизмов. Это очень сложный процесс, который ингибируется избытком диоксида углерода и сероводорода, тем не менее, из природных систем было выделено много новых участвующих в нем типов бактерий.

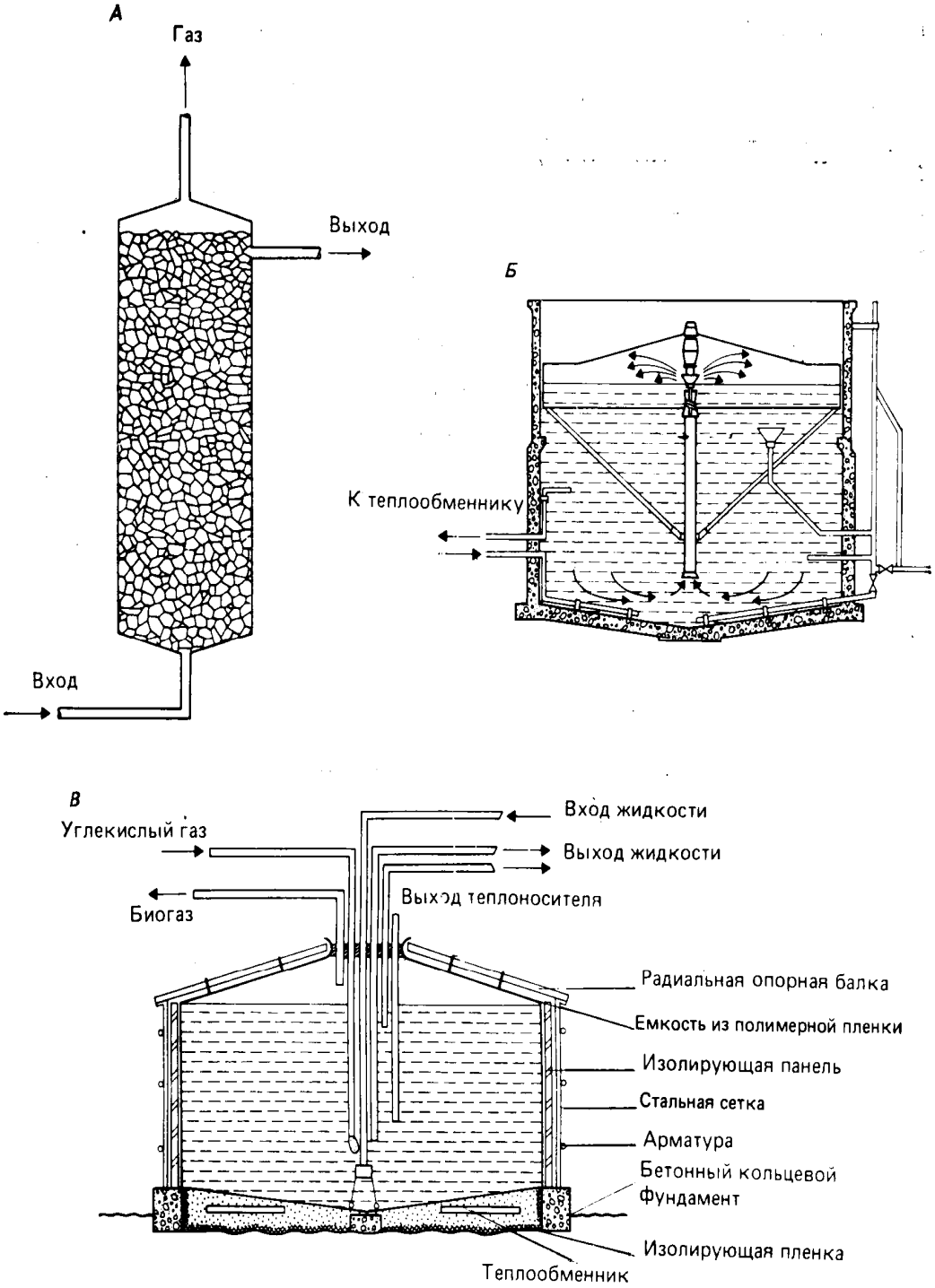


Рис. 10.7. Три типа установок, использующихся при очистке сточных вод пищевой промышленности: А – анаэробный фильтр; Б – упрощенная схема установки, в которой используется перемешивание с помощью винтового насоса и вытяжной трубы. Образование пены контролируется диспергированием содержимого реактора над поверхностью; В – высокоскоростной реактор Коулзерда

Промышленное применение систем анаэробного разложения неуклонно возрастает; они используются при переработке отходов

животноводческих ферм и промышленных, в том числе пищевых, отходов, а также для переработки культур, специально выращиваемых для получения энергии. На рис. 10.7, 10.8 и 10.9 схематически представлены некоторые из имеющихся в продаже установок. Конструкция реакторов была существенно усовершенствована, что увеличило их эффективность на 300%. Многие новые модели еще не вышли из стен лабораторий или находятся на стадии производственных испытаний, однако некоторые полномасштабные системы уже работают и имеются в продаже.

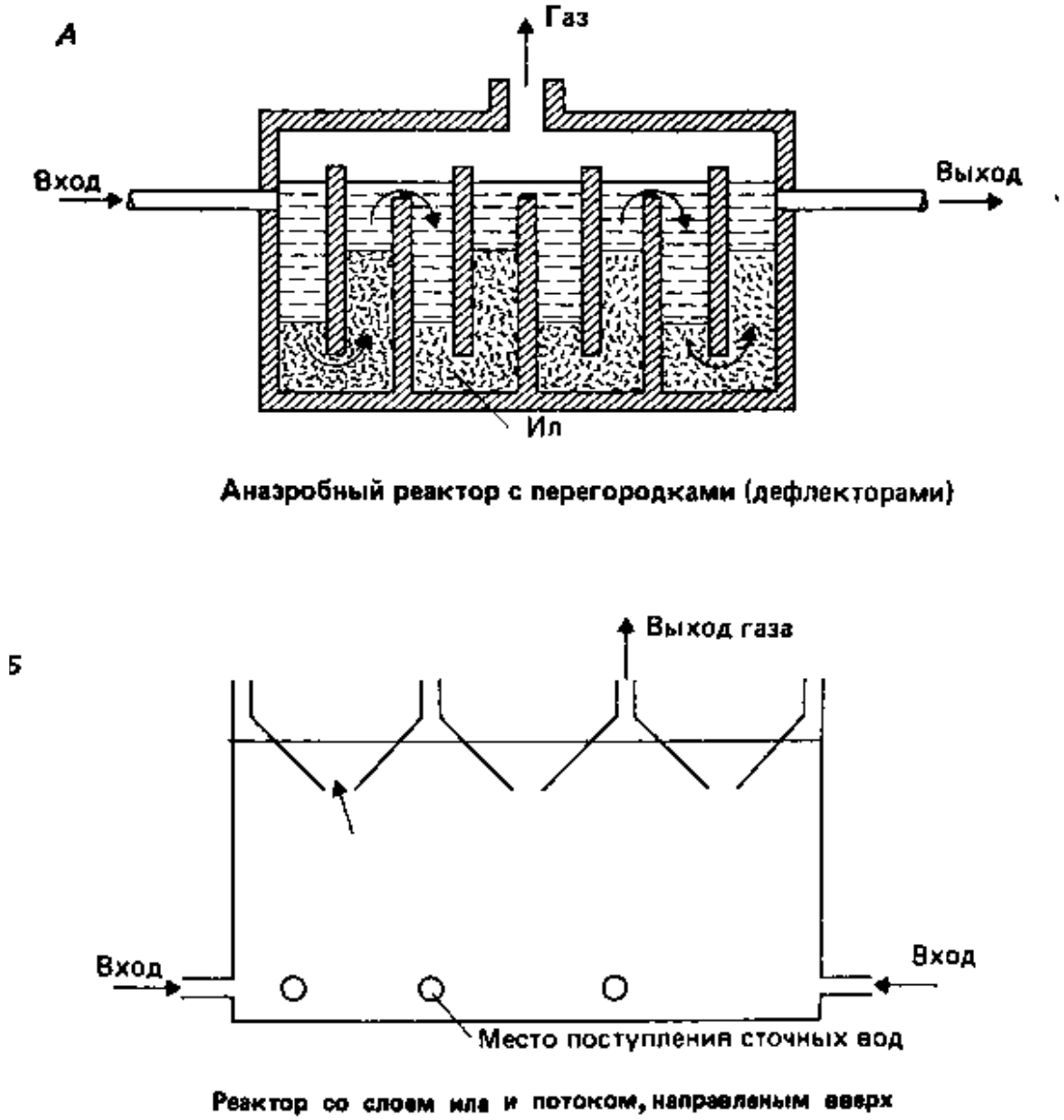


Рис. 10.8. Типы реакторов для переработки отходов животноводческих ферм (А) и различных стоков (Б)

Получение энергии из отходов представляет несомненный интерес для развивающихся стран, поскольку эту энергию можно извлекать и из природных продуктов. Сотрудничество между развитыми и

развивающимися странами постоянно возрастает. В развивающихся странах созданы учреждения для практического использования технологий, разработанных главным образом в Европе и Америке. Некоторые развивающиеся страны ведут самостоятельные исследования в этой сфере и сегодня лидируют в области фундаментальных разработок по возобновляемым источникам энергии.

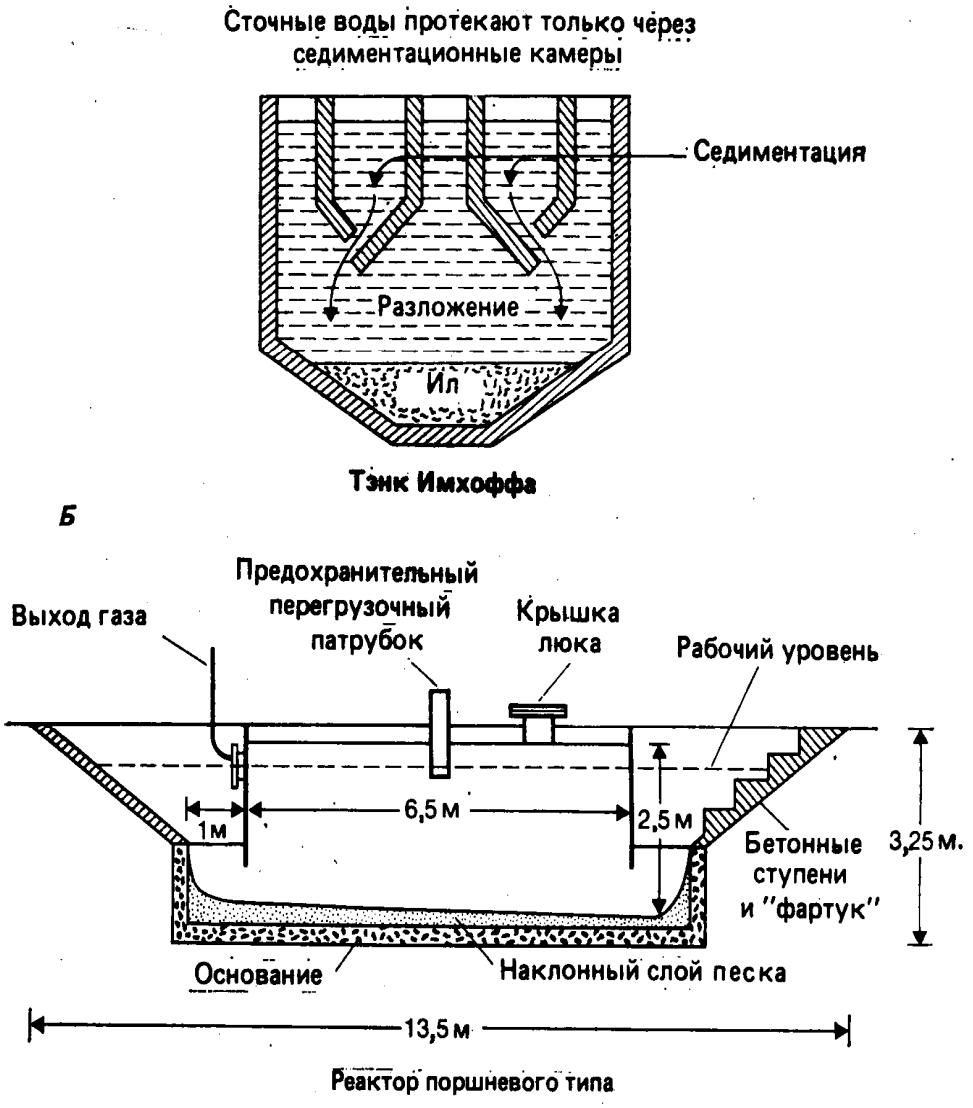


Рис. 10.9. Анаэробное разложение ила, образовавшегося в сточных водах (А), и отходов животноводческих ферм (Б)

10.7. Биологический контроль за системами микробиологической переработки отходов

Основным условием применения биологической переработки сточных вод является постоянный контроль за возможным токсическим

действием на установку со стороны поступающих стоков, с тем чтобы предотвратить серьезные повреждения системы или даже выход ее из строя. При эксплуатации установок по переработке отходов и промышленных сточных вод важно следить за тем, чтобы не возникали перегрузки. Обычные методы проведения анализов (например, измерение потребности в кислороде или определение pH) часто и недостаточно быстры, и малочувствительны. Однако в метаболической активности микроорганизмов существуют ключевые моменты, анализ которых дает возможность улавливать малейшие изменения в их состоянии. Например, благодаря внутриклеточному контролю метаболизма содержание АТР в популяции микроорганизмов сохраняется на относительно постоянном уровне, около 2 мкг на 1 мг сухой массы клеток. Изменения доступности субстрата или введение токсических веществ быстро сказываются на концентрации АТР внутри клеток. Мгновенная гибель клеток ведет к полной потере АТР за счет автолиза. Время оборота для АТР обычно не превышает 1 с.

Следовательно, о состоянии популяции (наступление стресса или периода покоя) можно судить по изменению уровня внутриклеточного АТР. Измерение концентрации АТР в активном иле нормально функционирующей системы позволяет определить «активную биомассу» данной системы. В процессе производства клеткой энергии участвует кислород, и при его недостатке отношение между его поступлением и потребностью в нем отразится на уровне АТР (рис. 10.10).

По технологии, основанной на применении активного ила, бóльшая его часть используется повторно, поступая из последнего седиментационного тэнка в аэрационный тэнк, а некоторая его часть поступает в реактор аэробного или анаэробного разложения. Доля повторно используемого ила и скорость его кругооборота определяют время контакта между поступающими сточными водами и микроорганизмами ила, а следовательно, и скорость очистки сточных вод. Эти факторы влияют на возраст ила, который в свою очередь определяет его способность к оседанию (рис.10.11). Производительность активного ила в значительной степени зависит от скорости нарастания новой биомассы в аэрационном тэнке, которая в свою очередь зависит от изменений скорости поступления сточных вод и их состава. Поэтому контроль за процессом с целью его нормализации и получения на выходе конечного продукта, отвечающего определенным критериям, сопряжен с трудностями. Такой контроль можно проводить, определяя уровень АТР, регулируемый по принципу обратной связи. Действительно, измеряя концентрацию АТР, удалось заметно улучшить контроль за переработкой сточных вод с применением активного ила. Содержание АТР можно определять вручную; однако для постоянного контроля за процессом требуются автоматические измерительные устройства. Пробы жидкости, обработка

которой закончена, вбирают через определенные промежутки времени на протяжении суток. Анализ уровня АТР в этих пробах позволяет найти отношение количества суспендированных в жидкой смеси твердых частиц к содержанию АТР, что в свою очередь показывает, какое количество активного ила, содержащего АТР, нужно использовать повторно и какова подходящая скорость сброса. Содержание АТР определяется в течение 10 мин после отбора пробы, следовательно, контрольные измерения можно проводить каждые 15 мин. Использование микропроцессоров позволяет автоматически поддерживать скорость сброса с помощью клапанов или насосов, направляющих избыток активного ила в тэнк для разложения, а также менять скорость сброса ила в течение суток в ответ на изменение внешних условий.

При таком методе контроля получают гораздо более осветленный конечный продукт с меньшим содержанием суспендированных твердых частиц и меньшей величиной БПК. Преимущества данного метода огромны. В сочетании с системой контроля за поступлением кислорода он позволяет существенно повысить экономичность процесса переработки.

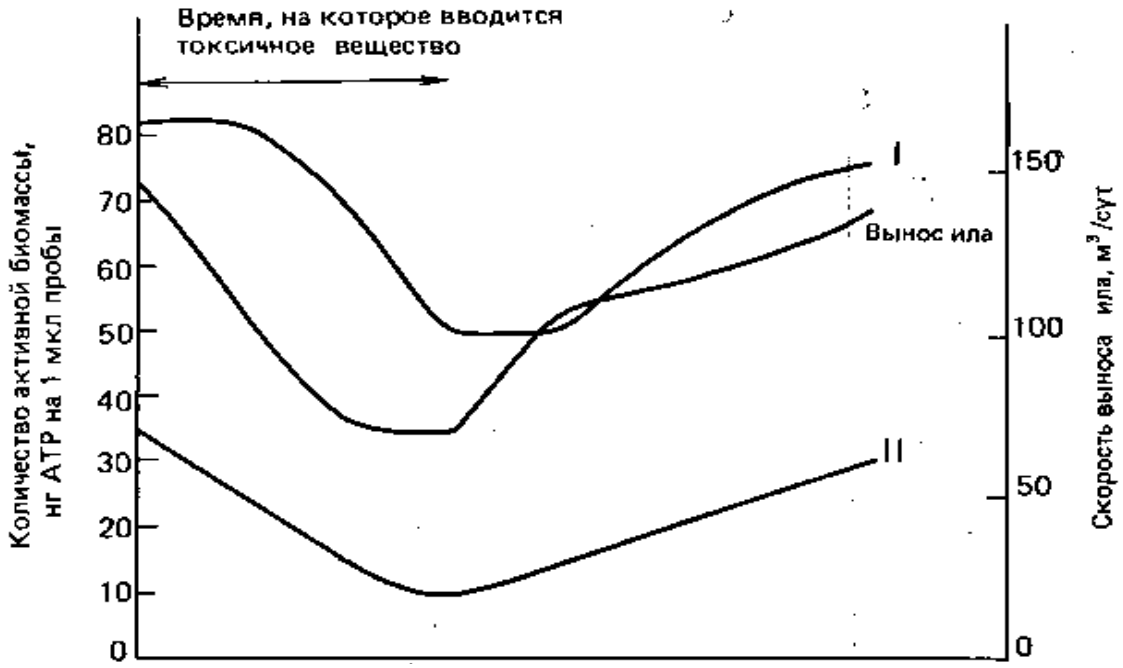


Рис. 10.10. Влияние введения в отходы токсичного вещества на активную биомассу (по результатам определения АТР). Показаны также изменения активности возвращаемого активного ила (I) и содержания суспендированных твердых частиц в смешанной жидкости (II)

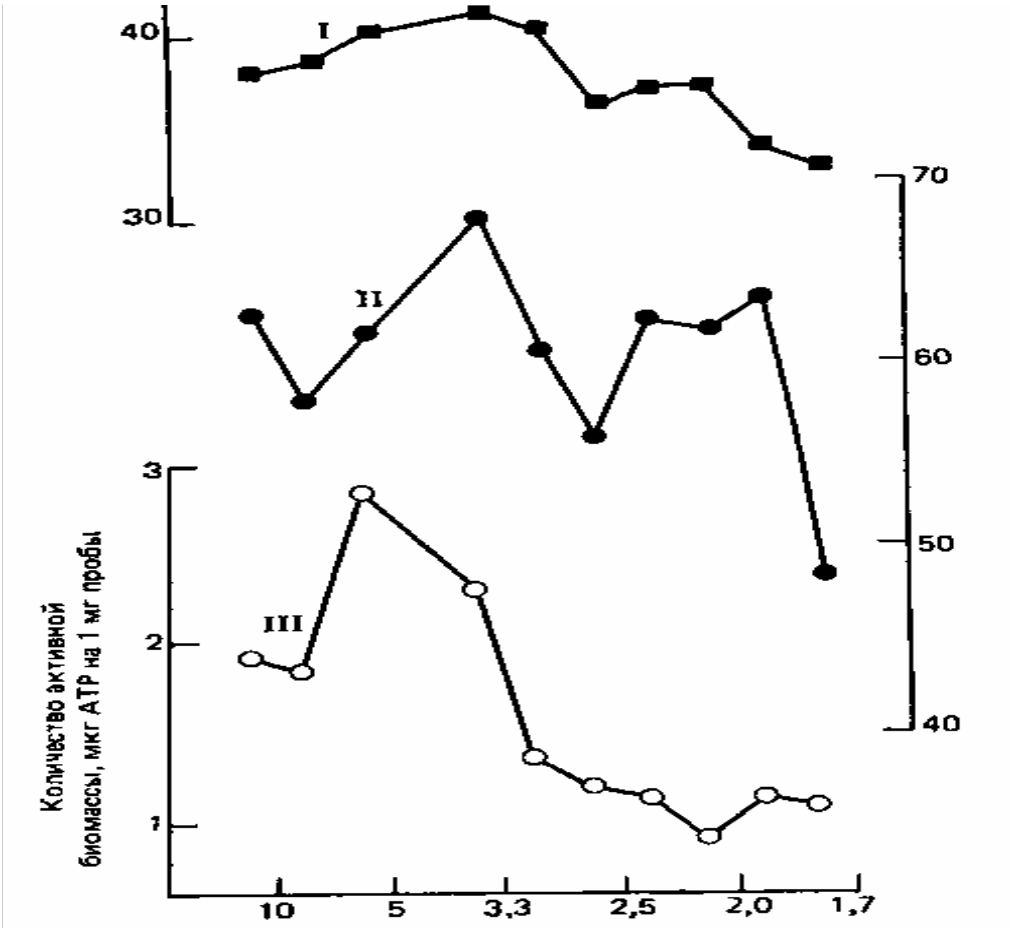


Рис. 10.11. Изменение количества активной биомассы (III), объема ила (II) и перемешиваемого удельного объема (I) для отходов, перерабатываемых в аэрационном тэнке, в зависимости от возраста ила

10. 8. Контроль за патогенностью

Одно из основных достоинств процесса микробного анаэробного разложения состоит в элиминации с его помощью патогенных микроорганизмов, в особенности агентов, вызывающих порчу пищи (главным образом *Salmonella).* Для анализа выживаемости этих организмов, а также микробов группы *E. coli* в системах лабораторного масштаба использовали чувствительный метод наиболее вероятных чисел (НВЧ). К числу конечных продуктов неметаногенного разложения относятся насыщенные жирные кислоты, и есть данные, что к молекуле жирной кислоты перед деградацией за счет окисления присоединяется водород. Образующаяся октановая кислота особенно эффективно убивает патогенные микроорганизмы. На рис. 10.12 представлены данные о выживаемости *Salmonella* в супернатанте, образующемся при анаэробном разложении. Видно, что жирные кислоты подавляют рост этих бактерий и приводят к их гибели.

Процессы анаэробного разложения оказывают ингибирующее действие и на микроорганизмы, патогенные для растений. Недавние исследования показали, что численность вида *Fusarium, Corynebacterium* и *Globodera* в ходе разложения уменьшается и падает почти до нуля через 10 суток после начала очистки сточных вод (рис. 10.13 – 10.15). Это позволяет надеяться на возможность использования процессов анаэробного разложения для переработки растительного сырья, пораженного возбудителями различных заболеваний *(Fusarium oxysporum* – дикариотическим грибом – возбудителем вилта и корневой гнили томатов, гвоздики и риса; *Corynebacterium michiganese* – возбудителем сосудистого вилта, рака и листовой пятнистости томатов, картофеля и табака; *Globodera pallida* – широко известной корневой нематодой картофеля, разрушающей корни растения-хозяина).

В сточных водах, образующихся в других условиях, например в регионах с тропическим климатом, могут присутствовать и другие патогенные микроорганизмы, например *Entamoeba hystolytica,* вызывающая амебную дизентерию. Это необходимо учитывать при разработке способов очистки отходов. Все биотехнологические подходы, столь полезные с точки зрения здравоохранения, следует развивать в самых широких масштабах.

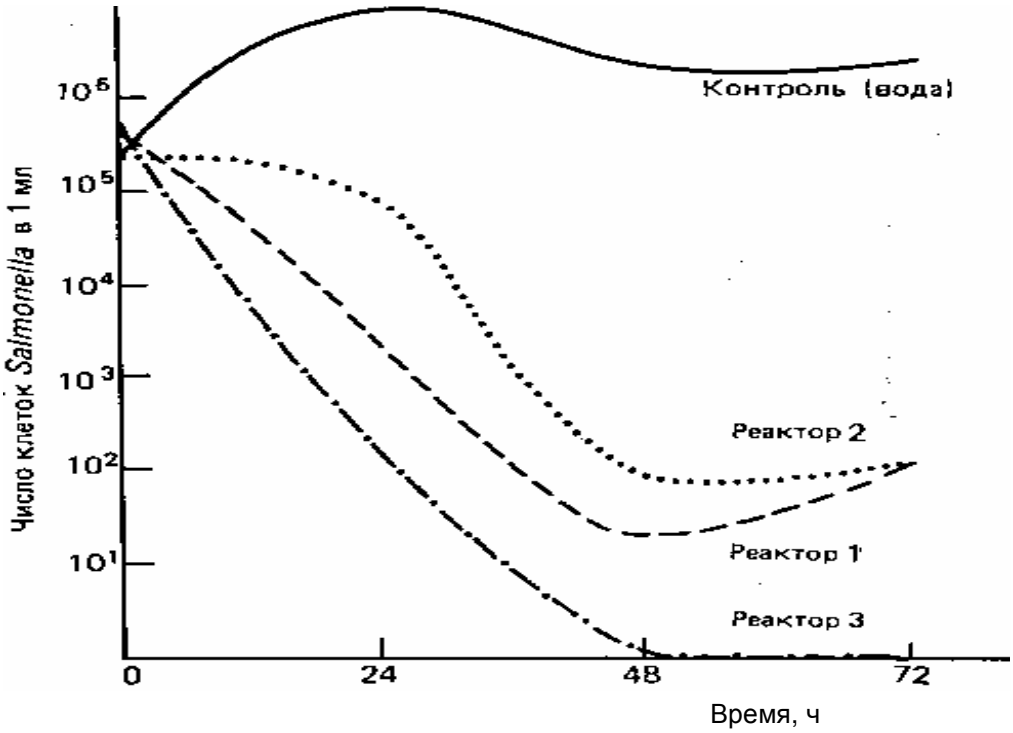


Рис. 10.12. Кривые выживаемости *Salmonella* в отстое, образующемся в реакторе при анаэробном разложении

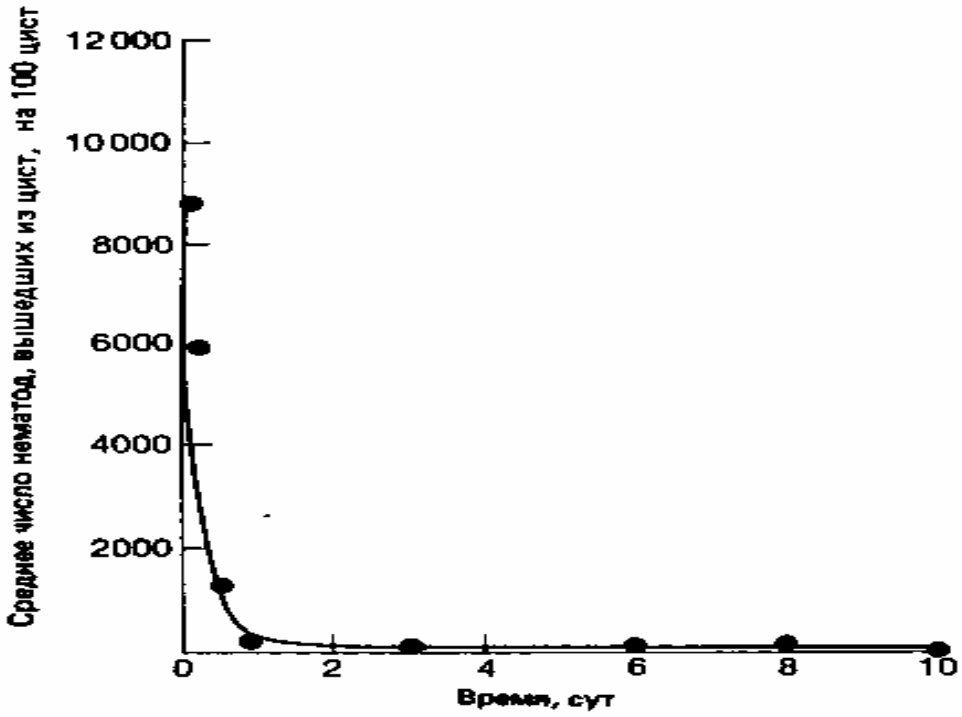


Рис. 10.13. Среднее число нематод *Globodera pallida,* вышедших из цист, на 100 цист в зависимости от времени воздействия на них содержимого анаэробного реактора при 35°С. Контрольная величина (7 сут. в воде) – 8739 ±444

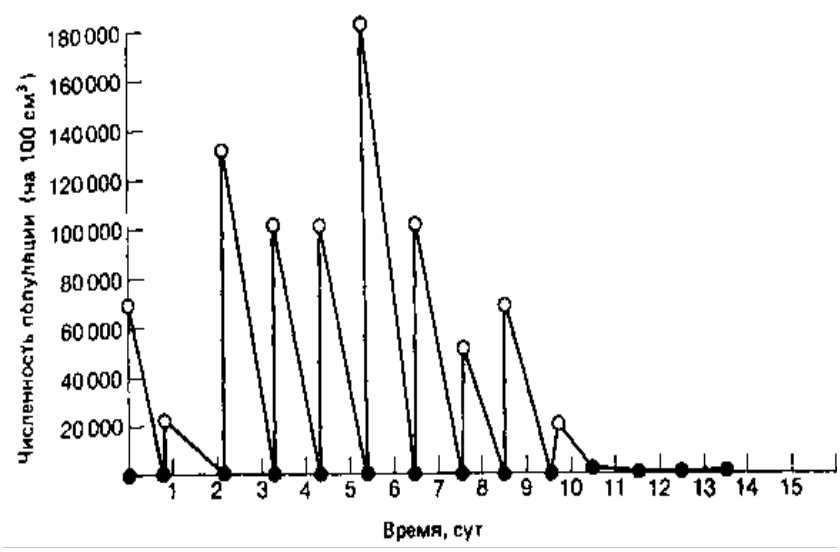


Рис. 10.14. Численность популяции *Fusarium oxysporum* до (•) и после (о) введения ее в анаэробный реактор

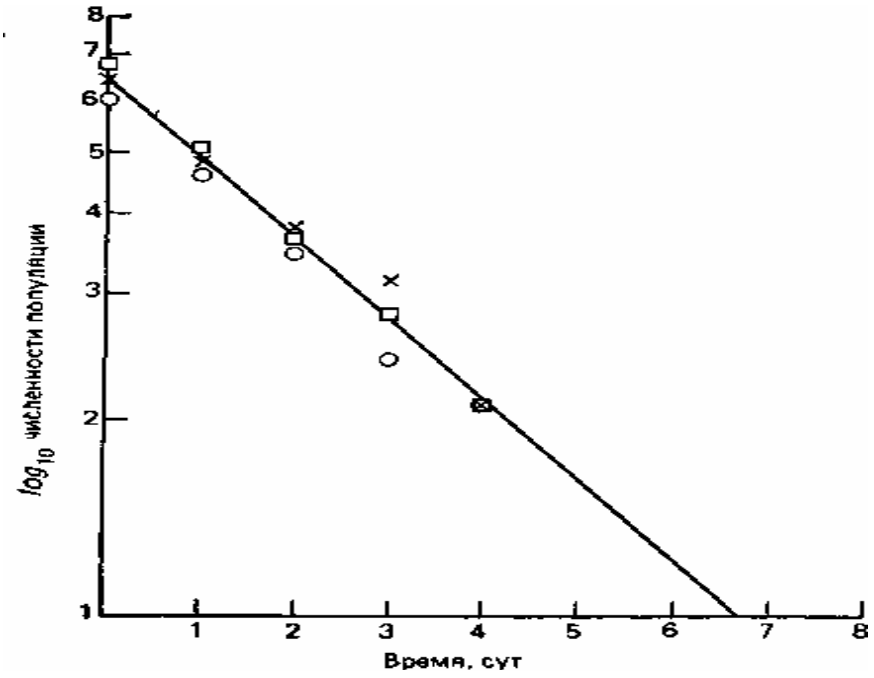


Рис. 10.15. Изменение численности популяции *Corynebqactrium michiganese* при 35°С в течение 5 суток нахождения в анаэробном реакторе. Приведены результаты трех экспериментов

10.9. Извлечение полезных веществ

Одна из главных задач технологии, связанной с окружающей средой – это сохранение природных ресурсов путем повторного использования полезных веществ, содержащихся в отходах, Некоторые разработки в этой сфере получили финансовую поддержку со стороны правительств и это принесло свои плоды, но все же пока выход конечных продуктов и стоимость повторного использования биомассы в широких масштабах таковы, что эта технология оказывается экономически невыгодной. Тем не менее она может найти применение при получении таких ценных продуктов, как масла, металлы, витамины и пептиды.

Получение полезных материалов из отходов имеет два аспекта: 1) извлечение и/или концентрирование полезных веществ из отходов; 2) превращение отходов в полезные материалы.

10.10. Вода

Воду можно рассматривать как возобновляемый ресурс. Однако, сравнивая стоимость необходимого для очистки оборудования со стоимостью водопроводной воды, очистку загрязненной органическими веществами воды обычно считают неэкономичной. Повторное использование промышленных сточных вод экономично только в тяжелой промышленности (энергетика, сталелитейное производство и

угледобывающая промышленность), где можно применять не такую чистую воду, как питьевая, и поэтому свести к минимуму обработку сточных вод. Основные трудности здесь связаны с наличием соединений, неподдающихся переработке. Возможно, эту проблему удастся решить, используя микроорганизмы, которые приобрели способность разрушать такие соединения.

10.11. Удобрения

Потребность в более дешевых высококачественных белках животного происхождения непрерывно возрастает, а число работников сельского хозяйства, призванных удовлетворять эту растущую потребность, все время уменьшается. Для разрешение этого противоречия нужно было бы применять более интенсивные методы землепользования, и тогда мы будем получать все больше концентрированных отходов, которые в принципе можно применять как удобрения. Однако за последние 100 лет масштабы использования отходов животноводства в качестве удобрений уменьшились; на смену им пришли фосфорные и азотные удобрения, при получении которых используется ископаемое топливо. В Англии значительную часть сельскохозяйственной продукции (до 40% от общей стоимости) получают именно за счет применения химических удобрений. Однако цены на такие удобрения все время растут, и становится экономически выгодным использование отходов животноводства в качестве органических удобрений.

Табл. 10.1 иллюстрирует возможность получения удобрений на основе навоза сельскохозяйственных животных. Результаты анализа каждого типа удобрений приведены в табл. 10.2. Ценность отходов как удобрений и пути их использования определяются составом. Кроме того, перед внесением навоза в почву из него путем анаэробного разложения можно получать энергию. Определить изменение стоимости удобрения в результате такого разложения трудно; тем не менее, ясно, что удобрения на основе переработанного навоза достаточно дешевы.

Таблица 10.1

Получение удобрений на основе навоза сельскохозяйственных животных

Параметры	Птицы	Свиньи	Молочные коровы
К, г/сут	0,1	4,5	45
% от живого веса	5 – 6	8 – 9	9 – 11
Сухое вещество, %	20 – 30	15 – 20	10 – 11
Средний сухой вес	0,03	0,7	4,5

Таблица 10.2

Содержание питательных веществ в навозе

Животные	Сухое вещество, %	Содержание различных компонентов (кг/т свежего навоза)			
		N	P	K	Mg
Крупный рогатый скот	4 – 23	2,4 – 6,5	0,4–1,8	2,0–5,8	0,2–0,6
Свиньи	5 – 25	1,6 – 6,8	0,6–2,1	1,7–3,6	0,3–0,7
Птицы	23 – 68	9,6 – 23	2,4–12	3,8–11,6	1,2–2,2

10.12. Корма для животных

В Англии в результате человеческой деятельности образуется в год много отходов. Если учесть, что при интенсивном животноводстве образуется $180 \cdot 10^9$ кг отходов, то становится ясно, что при переработке всех этих отходов мы можем получить многие тонны активного ила. В процессе переработки отходов при участии микроорганизмов образуется много микробного белка, который можно повторно использовать как корм для скота, поскольку 30–40% сухой массы выросших клеток – это неочищенный белок.

На рис. 10.16 описан метод экстракции белка из активного ила, а в табл. 10.3 приведен состав белка одноклеточных организмов (БОО) из того же источника. Тяжелые металлы, обнаруженные в отстое сточных вод (например, медь из отходов свиноводства, где ее присутствие обусловлено применением концентратов меди для кормления животных), необходимо удалять. Идеальным результатом такого повышения качества ила сточных вод путем экстракции белка должен быть безвредный, чистый, экономичный корм для скота. Кроме того, в иле образуются и другие ценные биологические соединения, например аминокислоты и витамины.

В табл. 10.4 представлена концентрация аминокислот в белковом продукте из активного ила, применяемом в качестве корма для рыб. Однако бытовые и сельскохозяйственные отходы, по-видимому, непригодны для промышленного получения БОО. Это связано с их низкой пищевой ценностью и с необходимостью получения продукта, свободного от токсичных веществ и патогенных микроорганизмов. Существуют и экономические проблемы, определяемые расходами на ферментацию и

оборудование, необходимое для высушивания. Незараженные отходы производства пищевых продуктов и напитков, а также бродильной промышленности можно использовать в качестве добавок к корму. Однако экономическая целесообразность применения еще не доказана.

Министерство сельского хозяйства, рыболовства и пищевой промышленности опубликовало инструкцию «О порядке переработки белка» от 1981 г., касающуюся использования белковых продуктов, получаемых из ила, в качестве корма. Правительство ограничилось предложениями по ужесточению стандартов, указанных в Актах о болезнях животных от 1975 года. В них особое внимание уделено контролю за такими возбудителями заболеваний, как *Salmonella.*

10.13. Биологическая переработка промышленных отходов

Промышленные отходы можно в первом приближении разделить на две категории: 1) отходы производств, основанных на использовании биологических процессов (производство пищевых продуктов, напитков, ферментация); 2) отходы химической промышленности. В первом случае отходы имеют различный состав и обычно перерабатываются путем биологического окисления, как это делалось традиционно в случае бытового мусора. Однако такой способ экономически невыгоден, и в настоящее время широко обсуждается вопрос о возможности уменьшения объема разбавленных сточных вод либо их непосредственного использования – трансформации (для получения биомассы или других ценных продуктов) или же путем извлечения из них ценных соединений.

В многочисленных и разнообразных отраслях химической промышленности образуется большое количество отходов, чем многие из них с трудом поддаются разрушению и долгое время присутствуют в среде. Поэтому часто перед биологической переработкой отходов бывает необходимо провести предварительную химическую или физическую обработку. Использование специфических микроорганизмов расщепления ксенобиотиков при переработке отходов еще не нашло широкого применения в промышленности, и тем не менее подобный подход представляется весьма перспективным.

Это может быть: 1) деградация отдельных видов отходов *in situ* с помощью специализированных культур микроорганизмов или их сообществ; 2) введение специально подобранных культур в обычные системы переработки отходов; 3) ликвидация и обезвреживание разливов нефти; 4) извлечение металлов; 5) биологическая очистка газов от пахучих и вредных соединений (меркаптанов, сероводорода, цианида, хлорзамещенных углеводородов и т. д.); 6) получение биомассы из отходов; 7) превращение отходов в метан.

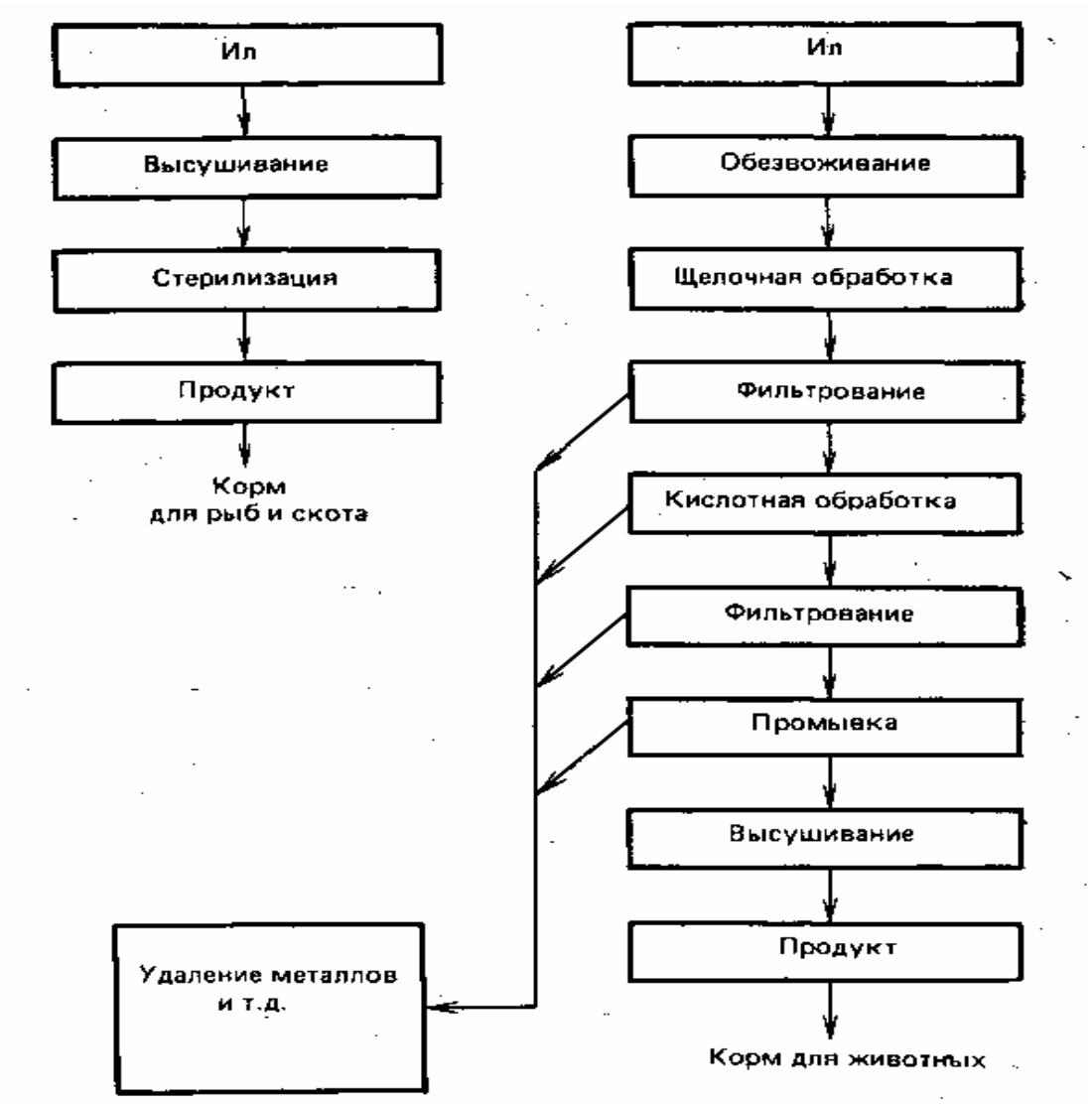


Рис. 10.16. Получение белка из активного ила, образующегося в сточных водах

Таблица 10.3

Состав белка одноклеточных организмов, обитающих в активном иле

Компонент	Масса, %
Вода	7,85
Общий белок (Nx6,25)	37,80
Истинный белок	31,25
Жиры	1,73
Зола	25,15
Кислотонерастворимая зола	12,33
Углеводы (в пересчете на глюкозу)	9,80
Волокнистые вещества	10,50
Валовое содержание энергии (ккал/г)	16,20

Таблица 10.4

Концентрация аминокислот в белковом продукте из активного ила

Аминокислота	г/100 г пробы
Серин	1,4
Аспарагиновая кислота	2,86
Глутаминовая кислота	3,62
Пролин	1,28
Глицин	2,26
Аланин	2,95
Цистеин	0,25
Тирозин	0,72
Треонин	1,86
Валин	2,19
Метионин	0,25
Изолейцин	1,42
Фенилаланин	2,07
Гистидин	0,69
Лизин	1,68
Аргинин	1,59
Триптофан[1)]	–

[1)]Разрушается при кислотном гидролизе

В результате широкого применения человеком продукции химической промышленности в окружающую среду попадают различные типы ксенобиотиков: пластмассы (пластификаторы), взрывоопасные вещества, добавки, полимеры, красители, поверхностно-активные вещества (ПАВ), пестициды и органические соединения – производные нефти. Что касается бытового мусора, то для его переработки созданы широко применяемые системы, использующие активный ил и оросительные фильтры. Сточные же воды химической промышленности, как правило, не соответствуют возможностям подобных систем. Интенсивность переноса кислорода в ходе процессов, обычно протекающих в таких системах, бывает недостаточна для поддержания максимальной скорости окисления при участии микрофлоры. Эти процессы чувствительны также к колебаниям в загрузке реактора, особенно если токсичные вещества и ингибиторы поступают в систему в высоких и непостоянных концентрациях.

Проблему недостатка кислорода, возникающую при переработке отходов химической промышленности в обычно используемых системах на основе активного ила, пытались решить несколькими способами. В двух

случаях (распределитель с пробулькиванием и система «Анокс») для увеличения скорости переноса газа использовали чистый кислород. В одной из новых систем переработки отходов – колонном эрлифтном ферментере, разработанном фирмой ICI, пошли по пути увеличения количества растворенного кислорода (рис. 10.2). В центральной части колонны имеется не доходящая до дна вертикальная секция, в которую сверху поступают отходы и повторно используемый активный ил; туда же вводится воздух. Когда смесь выходит из ферментера вверх по наружной секции колонны, давление в системе падает, что вызывает пробулькивание пузырьков воздуха. Благодаря высокому содержанию растворенного кислорода и турбулентности биомасса поддерживается в высокоактивном состоянии и становится более устойчивой по отношению к перегрузкам, а также к уменьшению аэрации и времени нахождения отходов в ферментере особенно в случаях высоко концентрированных отходов.

Такие процессы с повышенной аэрацией устойчивы к резким перегрузкам отходами, не оказывающими токсического или ингибирующего действия. В случае же токсичных отходов, более пригодными оказываются системы, в которых используются микроорганизмы, растущие в пленках. Такие популяции микробов не вымываются из системы, даже если на их рост и метаболизм оказывают неблагоприятное воздействие поступающие сточные воды. Кроме того, внутри пленки из-за ограничения диффузии создаются градиенты концентрации. Это приводит к понижению концентраций токсичных продуктов внутри пленки, а следовательно, к повышению скорости их усвоения и окисления. Пленка создает также экологическую нишу для организмов, рост которых в присутствии высоких концентраций отходов при перегрузках существенно замедляется. Самая простая форма пленочной системы – это перколяционный фильтр, однако подобного рода пленки разрушаются, если они становятся очень тонкими, при уменьшении концентрации субстрата на поверхности подложки. В таком случае клетки погибают, и пленка отпадает, засоряя фильтры внутри системы переработки отходов. При слишком высоких концентрациях субстрата происходит быстрый рост микроорганизмов, что приводит к образованию толстой пленки и к ее периодическому отслоению. Интенсивность подобных процессов можно снизить, разбавив поступающий раствор с питательными веществами, осветленными сточными водами. Разработка новых методов сохранения толщины пленки представляет безусловный интерес. Так, при помощи медленного вращения диска из полистирола внутри протекающих сточных вод толщина пленки поддерживается постоянной за счет гидродинамических сил и аэрации при выходе пленки из воды. Такая эффективная и простая система была предложена для очистки стоков с

низкой величиной БПК. Еще один эффективный метод переработки токсичных отходов in situ может быть основан на использовании реакторов с ожиженной подложкой, где микроорганизмы растут на поверхности небольших инертных частиц (песок, стекло, антрацит), через слой которых пропускают с контролируемой скоростью сточные воды и воздух.

Отходы, не содержащие азота или фосфора, не способны поддерживать рост микроорганизмов. В подобных случаях для окисления токсичных соединений до диоксида углерода можно использовать покоящиеся клетки при условии, что активность их гидролитических и окислительных ферментов не подавляется. Поскольку среда при переработке отходов в колонных реакторах периодически меняется, микроорганизмы оказываются в условиях голодания и в это время их рост прекращается. При поступлении источника углерода на короткое время включается несопряженный метаболизм, когда организмы дышат, но не растут. Это дает то преимущество, что уменьшается общий выход биомассы (ила).

Рассмотрим методы биологической переработки промышленных отходов на примерах молочной, бумажной промышленности и производства красителей.

10.14. Отходы молочной промышленности. Сыворотка

Сыворотка является побочным продуктом сыроварения. Ее состав зависит от типа используемого молока и вырабатываемого сыра. В высушенном или концентрированном виде сыворотка применялась в качестве корма для животных; однако ее недостатком является то, что она не сбалансирована с точки зрения содержания питательных веществ: в ней слишком высока концентрация минеральных веществ и лактозы.

Разработаны способы извлечения из сыворотки белков путем ультрафильтрации, осаждения или выделения с помощью ионного обмена. Из таких белков можно получать белковые гидролизаты, используя для этого ферментеры. После извлечения белков получают большие объемы фильтратов с высокими концентрациями лактозы (35 – 50 г/л), минеральных веществ, витаминов и молочной кислоты. Встает проблема дальнейшего их использования, Если превратить лактозу в молочную кислоту при участии молочнокислых бактерий, то мы получим источник углерода, который может сбраживаться дрожжами (например, смешанными культурами *Lactobacillus bulgaricus* и *Candida krusei).* Возможно и прямое сбраживание лактозы дрожжами K*luyveromyces fragilis* или *Candida intermedia.* После подобного сбраживания не

обязательно отделять микроорганизмы от среды, объем которой можно уменьшить и получить обогащенную белком сыворотку,

Из сыворотки получают не только белковые продукты, но и путем ферментации – сырье для химической промышленности (например, этанол). Путем химического гидролиза лактозы с последующим удалением глюкозы из раствора с помощью ферментации можно получать галактозу.

Альтернативный биологический путь – использование мутантных дрожжей, лишенных β-галактозидазы. Такие мутанты сохраняют способность к гидролизу лактозы и используют образующуюся глюкозу в качестве источника углерода. В результате гидролиза лактозы фильтрат становится более сладким; на опытных установках такой гидролиз осуществляют с помощью иммобилизованной β-галактозидазы. Гидролизованный фильтрат не только находит применение в пищевой промышленности, но может оказаться полезным и при решении проблем, связанных с недостатком ферментов у некоторых животных-отъемышей и с непереносимостью лактозы у человека. Из сыворотки получают и другие химические соединения: лактозу, лактулозу, лактитол и лактобионовую кислоту.

10.15. Отходы целлюлозно-бумажной промышленности

Волокнистый материал, применяющийся при производстве бумаги и других продуктов, получают как из древесных, так и из травянистых растений после химического расщепления лигнина. Однако этот процесс сопровождается потерей большого количества древесины и образованием огромного количества отходов. Все это должно стимулировать разработку альтернативной химической технологии.

В настоящее время применяют два процесса получения древесной пульпы. Основной из них – это щелочная варка (сульфитный процесс), в результате которой образуется темная варочная жидкость. Эти отходы содержат трудно перерабатываемые ароматические продукты расщепления лигнина и низкомолекулярные органические кислоты (глюкоизосахариновую, молочную, уксусную и муравьиную). При получении пульпы из смолистой древесины сосны образуются талловое масло и терпены, широко использующиеся в промышленности. Сульфитную варочную жидкость не удается перерабатывать биологическими способами, которые могли бы применяться в промышленном масштабе; гораздо экономичнее выпаривать эту жидкость и сжигать ее, получая, таким образом, энергию из отходов.

Сульфатная варка целлюлозы применяется реже; она дает отходы следующего состава: лигносульфонаты с ароматическими элементами (60%), сахара – манноза, галактоза, глюкоза, ксилоза, арабиноза (36%),

уксусная кислота, метанол и фурфураль. Эти жидкие отходы – хорошее сырье для ферментации, благодаря высокому содержанию в них углеводов. Их ферментация в широких масштабах начата в 1909 г. В настоящее время традиционным методом удаления пентоз, гексоз и уксусной кислоты из таких отходов служит их ферментация при участии дрожжей.

Помимо этих традиционных методов вскоре будут использоваться и новые процессы превращения отходов в грибной белок с помощью *Paecilomyces variotii, Sporotrichum pulverulentum* и *Chaetomicum cellulolyticum.* Неподдающиеся переработке соединения можно концентрировать и сжигать.

Лигносульфонаты применяют в качестве связывающих веществ и вспомогательных средств при бурении; щелочным окислением при повышенном давлении их можно превращать в ванилин. Вообще говоря, главное в переработке отходов целлюлозно-бумажной промышленности – это понижение энергозатрат, а какой химический принцип при этом используется – менее существенно.

Основная экологическая проблема, порождаемая целлюлозно-бумажной промышленностью, – это очистка сточных вод, а также обработка конденсатов, образующихся в испарителях и реакторах. Сточные воды осветляют путем нейтрализации и отстаивания, окисления в одно- и двухстадийных установках с активным илом, в аэрируемых отстойниках или путем сочетания биологических и химических способов окисления. Эти методы пригодны для эффективного удаления соединений, подверженных биодеградации, а также токсичных производных фенола, однако они оказываются дорогими и неэффективными в случае производных лигнина, с трудом поддающихся переработке. Отбеливатели, содержащие хлорпроизводные бифенилов, можно обесцвечивать с помощью грибов – возбудителей белой гнили.

Среди побочных продуктов сульфитного процесса получения целлюлозы преобладают химически модифицированные лигнины, образующиеся во многих реакциях между активным сульфитом и каким-либо сложным природным полимером.

Структура лигносульфонатов в деталях неизвестна. Они представляют собой гетерогенную смесь соединений с широким спектром молекулярных масс (300–100000); состав смесей определяется природой перерабатываемой древесины. Образование сульфонатов приводит к частичной солюбилизации лигниновых фрагментов.

Сложность структуры лигносульфонатов затрудняет изучение их биодеградации. Для упрощения задачи обычно используют модельные соединения, например дегидрополимеры кониферилового спирта или другие низкомолекулярные продукты. Низкомолекулярные лигно-сульфонаты чувствительнее к биодеградации, чем высокомолекулярные; с другой стороны, производные лигнина, видимо, устойчивее к

разрушению, чем сам лигнин. Следовательно, образование сульфопроизводных затрудняет переработку.

В таких сопряженных окисительно-деградативных процессах почвенные грибы и бактерии более эффективны, чем гнилостные грибы; для осуществления этих процессов требуется также дополнительный источник углерода.

Распад лигносульфонатов нередко сопровождается полимеризацией, в результате чего наблюдается сдвиг в распределении полимеров по молекулярным массам. Эти изменения могут коррелировать с присутствием внеклеточных фенолоксидаз (например, лакказы), физиологическая роль которых остается неизвестной. Фенолы превращаются в соответствующие хиноны и фенокси-радикалы, которые спонтанно полимеризуются. Таким образом, полимеризация и деградация происходят одновременно. Однако в случае некоторых грибов реакции полимеризации не протекают в присутствии целлюлозы. Целлюлоза распадается до целлобиозы, являющейся субстратом для фермента целлобиоза–хинон-оксидоредуктазы, которая одновременно окисляет целлобиозу и восстанавливает хиноны и фенокси-радикалы, Может существовать и другая оксидоредуктазная система, в которой легко доступные источники углерода используются для восстановления хинонов. Возможная роль подобной биологической полимеризации состоит в облегчении осаждения лигносульфонатов.

Лигносульфонаты применяются как связывающие вещества при производстве отдельных видов картона, где в качестве катализатора полимеризации используют содержащие лакказу культуральные фильтраты. Фенолоксидазы могут играть важную роль в определении судьбы многих ксенобиотиков в окружающей среде, участвуя в полимеризации фенолов и в образовании органических полимеров почвы.

Чувствительность лигносульфонатов к биодеградации увеличивается после их химической или физической модификации. Под действием УФ-облучения и озонирования происходит фрагментация этих молекул, а удаление остатков сульфоновой кислоты, хотя и снижает растворимость лигносульфонатов, одновременно уменьшает их устойчивость к биодеградации.

Предпринимались попытки использовать для микробного десульфирования анаэробные сульфатредуцирующие бактерии и некоторые виды *Pseudomonas.* Большими потенциальными возможностями в этом смысле обладают смешанные культуры. Использование таких культур для разрушения лигносульфонатов может оказаться более эффективным, чем применение отдельных штаммов, поскольку при этом могут быть созданы сообщества с широким спектром активностей, например способные к десульфированию, расщеплению прочных связей, метилированию и деполимеризации. В результате может быть получена высокоэффективная

биоокислительная система. В одной из опытных установок для получения БОО из углеводов, содержащихся в отходах целлюлозно-бумажной промышленности, используют *Candida utilis*, а для разрушения остаточных лигносульфонатов – смешанную культуру. Биомасса, образующаяся на второй стадии этого процесса, не находит сбыта, поэтому ее повторно используют после термообработки для ускорения роста *Candida.*

10.16. Отходы от производства красителей

Текстильная промышленность и производство красителей отправляют в отходы устрашающее количество красителей и пигментов, единственным общим структурным свойством которых является наличие хромофорной группировки. Они поступают в окружающую среду со сточными водами; с количественной точки зрения эти соединения не относятся к числу основных ее загрязнителей. Кроме того, эти отходы обычно не рассматриваются как токсичные или канцерогенные для рыб или млекопитающих (за исключением бензидина и катионных красителей).

Для очистки окрашенных сточных вод применяют химические методы; удаление красителей и пигментов с помощью микробов весьма ограничено. Устранение этих продуктов из отходов с помощью активного ила заключается в основном в адсорбции, а не в деградации. Степень их разложения микроорганизмами определяется растворимостью, ионными свойствами, а также природой заместителей и их числом.

Оказалось, что микроорганизмы способны разлагать красители, но только после адаптации к значительно более высоким концентрациям, чем те, которые обычно обнаруживаются в сточных водах. Поскольку микроорганизмы могут использоваться для контроля за загрязнением окружающей среды этими соединениями, был проведен скрининг, направленный на выявление тех микроорганизмов, которые способны к расщеплению модельных веществ типа *n*-аминобензолов, а также скрининг и селекция организмов из дренажных канав предприятий по производству красителей. Были сделаны попытки найти взаимосвязь между подверженностью соединения биодеградации и его химической структурой.

Компоненты азокрасителей могут разлагаться в аэробных или анаэробных условиях. Анаэробная биодеградация осуществляется относительно легко, поскольку многие организмы синтезируют неспецифические ферменты, катализирующие восстановительное расщепление азогруппы (рис. 10.17). Однако для дальнейшей деградации необходим двухстадийный процесс, продукты которого –

амины – могут быть потенциально вредными и их подвергают окислительному расщеплению.

Азоредуктазы, выделенные из аэробных систем, несмотря на то, что по-видимому, обладают большей субстратной специфичностью до сих пор не нашли себе широкого применения при переработке отходов. Процесс разложения азокрасителей изучался на примере простого модельного соединения 4,4'-дикарбоксиазобензола (ДКАБ). Выделены организмы, использующие это соединение в качестве единственного источника углерода, азота и энергии.

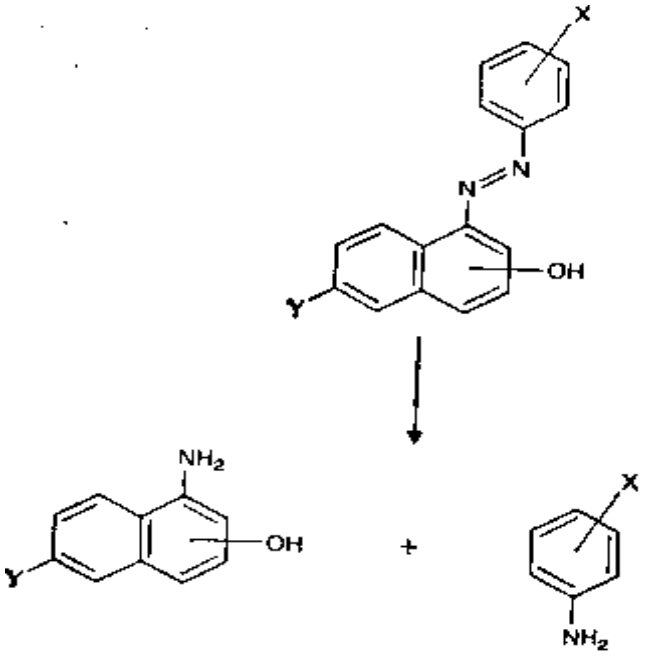


Рис. 10.17. Анаэробное восстановительное расщепление модельных азокрасителей

Ранее считалось, что азосвязь в природе не образуется. Однако среди продуктов, синтезируемых одним из грибов – патогеном насекомых – было идентифицировано азосоединение, так что бактериям приходилось встречаться с этим типом связей *in vivo*. Был выделен один из видов *Flafabacterium,* разрушающий только *транс*-ДКАБ; если использовать ингибиторы ферментов, раскрывающие кольцо, то это приводит к накоплению аминобензоата. Тем не менее, данный организм не расщепляет промышленные красители, а попытки ввести его в непрерывную культуру для длительной адаптации оказались безуспешными. *Flavobacterium* не выдерживала конкуренции: со стороны другого организма – одной из псевдомонад, способной расти при высоких концентрациях (750 мг/л) используемого ею синтетического красителя и, следовательно, эффективно разрушать его. При повышенной температуре эта способность утрачивалась. Возможно это связано с тем, что

упомянутая функция кодируется плазмидой. Следует отметить, что полученные штаммы обладают высокой субстратной специфичностью и едва ли выживут в установках для очистки сточных вод.

10.17. Биологическая очистка газов

Очистка отходов от вредных, токсичных и пахучих газов – это серьезная экологическая проблема. Во многих промышленных производствах (в фотопромышленности, при перегонке нефти, очистке природного газа и в целлюлозно-бумажной промышленности) образуются восстановленные соединения серы (тиосульфат, сероводород, метилмеркаптаны, диметилсульфид). Эти соединения являются также побочными продуктами анаэробного разложения отходов животноводства с высоким содержанием органических веществ. Большинство неорганических восстановленных соединений серы служат источником энергии для целого ряда микроорганизмов, растущих в аэробных или анаэробных условиях (рис. 10.18). Могут быть созданы очистные системы, основанные, например, на использовании тиобацилл: в таких системах анаэробное десульфурирование сопряжено с денитрификацией. Один из методов очистки от сероводорода состоит в пропускании газа через солевой раствор, например раствор сульфата меди. В результате происходит: осаждение нерастворимого сульфида металла, который затем может быть окислен при участии микроорганизмов. Количество отходов с неприятным запахом увеличивается и в результате интенсификации животноводства. Для устранения этого запаха из отходов удаляют, в частности, восстановленные соединения серы; такое удаление происходит с потерей азота или без потери (путем образования аммиака) в зависимости от того, какие микроорганизмы при этом используются. Органические сульфиды часто бывают токсичными для микроорганизмов. Например, обогащение отходов микроорганизмами, способными использовать диметилсульфид, затруднено, хотя в принципе можно выделить сообщество микробов, растущее на очень близком по структуре субстрате диметилсульфоксиде. Преобладающий в таком сообществе организм *Hyphomicrobium spp*. быстро окисляет диметилсульфид, так что есть основания надеяться на создание относительно простого микробиологического способа переработки таких ядовитых отходов.

Для детоксикации цианида в промышленных отходах были предложены различные биологические методы: от использования активного ила до применения специфических ферментов, разрушающих цианид. Так, роданаза, обнаружена у *Bacillus stearother mophilus,* катализирует превращение цианида в тиоцианат. Альтернативная иммобилизованная система основана на гидролизе цианида до формамида, катализируемом индуцибельным ферментом цианидгидратазой. Этот

фермент был обнаружен в грибах, паразитирующих на растениях – цианогенах. Таким образом, мы имеем ряд микробиологических методов очистки промышленных стоков, однако нам еще предстоит определить их эффективность по степени очистки на выходе.

S

Аэробный процесс

$$H_2S + 2O_2 = H_2SO_4$$

$$(CH_3)_2S + 5O_2 = 2CO_2 + H_2SO_4 + 2H_2O$$

Анаэробный процесс

$$5H_2S + 8NaNO_3 = 4Na_2SO_4 + H_2SO_4 + 3H_2O + 4N_2$$

$$(CH_3)_2S + 4NaNO_3 = 2CO_2 + Na_2SO_4 + 2NaOH + 2H_2O + 2N_2$$

Рис. 10.18. Разрушение восстановленных соединений серы.

10.18. Биодеградация ксенобиотиков в окружающей среде

Биодеградация органических соединений, загрязняющих окружающую среду, оправдана только в том случае, если в результате происходит их полная минерализация, разрушение и детоксикация; если же биохимическая модификация этих соединений приводит к повышению их токсичности или увеличивает время нахождения в среде, она становится не только нецелесообразной, но даже вредной. Детоксикация загрязняющих среду веществ может быть достигнута путем всего одной модификации структуры. Судьба ксенобиотика зависит от ряда сложным образом взаимосвязанных факторов как внутреннего характера (устойчивость ксенобиотика к различным воздействиям, растворимость его в воде, размер и заряд молекулы, летучесть), так и внешнего (pH, фотоокисление, выветривание). Все эти факторы будут определять скорость и глубину его превращения. Скорость биодеградации ксенобиотика данным сообществом микроорганизмов зависит от его способности проникать в клетки, а

также от структурного сходства этого синтетического продукта и природного соединения, который подвергается естественной биодеградации. В удалении ксенобиотиков из окружающей среды важную роль играют различные механизмы метаболизма.

В большинстве случаев при исследовании биодеградации использовался традиционный подход, основанный на выделении и анализе свойств чистых изолятов из окружающей среды. С другой стороны, из-за гетерогенности среды в ней формируются местообитания для множества разных микроорганизмов с самыми разнообразными метаболическими свойствами. Эти местообитания не могут не быть взаимосвязанными друг с другом. Ксенобиотики подвергаются действию смешанных популяций микроорганизмов, т. е. сообществ, для которых характерны отношения кооперации, комменсализма и взаимопомощи.

10.19. Участие микробных сообществ в биодеградации ксенобиотиков

Можно выделить стабильные сообщества, в которых взаимодействия между отдельными его членами дает им ряд преимуществ, в результате чего такая ассоциация становится более эффективной, чем отдельно взятые виды. Классификация микробных сообществ основана на характере взаимосвязей между отдельными видами.

1. Сообщества, в которых один или несколько членов не способны к синтезу тех или иных компонентов, необходимых для роста; этот дефицит покрывается за счет метаболической активности других членов сообщества. Сложность различных взаимоотношений в подобных сообществах может варьировать, но в любом случае взаимосвязи такого типа, по всей видимости, играют роль в деградации многих соединений. Например, сообщество из двух микроорганизмов, растущее на циклогексане, включает один из видов *Nocardia,* способный окислять циклогексан, но не способный к росту на нем одном, а также один из видов *Pseudomonas,* который поставляет другим видам необходимые для роста соединения, возможно биотин. Такие взаимосвязи могут быть облигатными для роста определенных видов или поставлять дополнительные питательные вещества, способствующие росту первично окисляющего организма к увеличению скорости деградации. Это со всей очевидностью показывает, что истинную скорость деградации ксенобиотиков в окружающей среде можно оценить, только учитывая возможности микробных сообществ, а не отдельных видов микроорганизмов.

2. Сообщества, в которых метаболиты, в какой-то мере подавляющие рост организма-продуцента или других организмов в том же местообитании, удаляются остальными членами сообщества.

3. Сообщества, в которых параметры роста одного или нескольких его членов изменяются так, что получается более конкурентоспособное сообщество, устойчивое к изменениям среды. Такое сообщество может стать менее чувствительным к ингибированию субстратом и приобрести способность справляться с перегрузками, возникающими в очистных системах.

4. Крайне важная роль микробных сообществ в деградации ксенобиотиков состоит в том, что они способны осуществлять совместную «метаболическую атаку» на субстрат. Отдельные члены такого сообщества в отличие от сообщества в целом не обладают метаболической активностью, необходимой для полной деградации данного соединения. Так, в лаборатории иногда не удается добиться минерализации какого-либо вещества, но происходит это потому, что деградацию тщетно пытаются осуществить с помощью одного вида микроорганизмов. Отмечалось также, что такого рода комбинированная метаболическая система может возникать в результате синтеза отдельными видами разных компонентов ферментного комплекса, с проявлением ферментативной активности только у целого сообщества (например, синтез активной лецитиназы двумя видами *Pseudomonas).*

5. Ранее подчеркивалась важность сопряженного метаболизма для расщепления ксенобиотиков. Микроорганизмы, растущие на одном субстрате, превращают другой в ходе одной или нескольких ферментативных реакций. Эти реакции не связаны с ростом микроорганизма в том смысле, что в них не образуются промежуточные продукты, которые данный организм использовал бы для роста. Однако эти промежуточные продукты могут служить источником углерода для других членов сообщества. Выделение или создание подобных сообществ для решения проблем загрязнений среды ксенобиотиками вполне реально, хотя о стабильности таких ассоциатов в условиях переработки отходов известно немного.

6. Были выявлены сообщества, в которых осуществляется передача восстановительных эквивалентов от одной популяции другой. В анаэробных условиях классическим ферментативным способом получения избытка восстановительных эквивалентов было восстановление конечных продуктов обмена. Однако в упомянутых сообществах используется второй, акцепторный механизм. На сегодняшний день уже выделено немало таких сообществ. Анаэробное разрушение подобными сообществами ароматических соединений может иметь экономическое значение.

7. При изучении непрерывных культур были обнаружены сообщества, в которых к полному использованию лимитирующего рост субстрата способна не одна, а несколько первичных популяций, хотя

можно было бы ожидать, что наиболее конкурентоспособный организм окажется доминирующим. Следовательно, существующие в сообществе взаимодействия должны стабилизировать свободную конкуренцию между его членами.

В стабильных сообществах микроорганизмов создаются условия для свободного обмена генетической информацией между популяциями. Важным эволюционным механизмом появления новых штаммов *in vivo*, способных взаимодействовать с новыми компонентами окружающей среды, может служить перенос плазмид между сообществами микроорганизмов. Частота таких событий для природных сообществ неизвестна, однако в условиях лаборатории они действительно происходят.

Так, в одном из опытов в течение многих поколений выращивали смешанные непрерывные культуры разных видов *Pseudomonas*. Один из видов мог расти на хлоркатехолах, а другой обладал плазмидой, несущей ген фермента бензолдиоксигеназ. На 4-хлорбензоате не мог расти ни один из штаммов, однако, использовав принцип обогащения, удалось выделить мутант, способный к росту на этой хлорсодержащей ароматической кислоте. По всей видимости, здесь произошел перенос плазмиды, в результате которого мутантный штамм приобрел способность к окислительному декарбоксилированию 4-хлор-бензойной кислоты с помощью приобретенной диоксигеназы с широкой специфичностью, а следовательно, и способность к росту на образующемся хлоркатехоле.

В свете взаимодействий подобного рода, существенных для окружающей среды, мы рассмотрим еще несколько специфических примеров деградации ксенобиотиков. Потенциальная возможность использования микроорганизмов при биотехнологической переработке промышленных отходов очевидна. Мы знаем, что в промышленных сточных водах содержатся стабильные побочные продукты реакций, часто известного состава. Вполне понятно, что технология контроля за ними хорошо разработана. Однако в окружающую среду могут попадать и сложные смеси промышленных продуктов, например при разнообразных неспецифических выбросах на любом из этапов технологического процесса (утечки и т. п.). Деградация ксенобиотиков будет рассмотрена именно в этом контексте.

10.20. Хлорпроизводные углеводородов

С-1- и С-2-хлорпроизводные углеводородов широко используются в качестве растворителей и представляют собой важный фактор загрязнения окружающей среды. Тем не менее, о микробной деградации этих соединений известно немного. Были выделены организмы, способные к

использованию дихлорметана, однако механизм его деградации до конца не выяснен. По-видимому, в результате первичного дегалогенирования, катализируемого какой-то галоидгидролазой, образуется хлорметанол, спонтанно разлагающийся до формальдегида.

Дегалогенирование галогензамещенных ароматических соединений происходит в основном после расщепления ароматических групп системы под действием диоксигеназ. Связь углерод – галоген становится лабильной после присоединения атома кислорода к углероду, связанному с галогеном, с образованием галогензамещенных катехолов.

Относительно широкая специфичность ферментов начальных этапов катаболизма может обусловливать довольно быстрое превращение разных галогензамещенных ароматических соединений, хотя работа ферментов и осложняется стерическими и негативными индуктивными эффектами боковых групп-заместителей. Это пример участия обычных катаболических ферментов в первичной атаке на ксенобиотики.

Галогензамещенные катехолы представляют собой ключевые метаболиты в деградации арилгалогенов. Они разрушаются путем *орто*-расщепления, поскольку ферменты *мета*-расщепления необратимо инактивируются веществами, образующимися в ходе реакции. Обычные пирокатехазы расщепляют галоген – замещенные катехолы с относительно низкой эффективностью, поэтому основное значение в деградации этих соединений приобретает раскрытие кольца. На последующих этапах метаболизма, включая циклоизомеризацию, происходит отщепление оставшихся замещающих групп кольца.

На работе обычно применяемых очистных сооружений плохо сказываются перегрузки их отходами, содержащими хлорзамещенные ароматические соединения: путь *мета*-расщепления нарушается, а неэффективность *орто*-пути приводит к накоплению токсичных фенолов и темноокрашенных продуктов их самоокисления.

10.21. Другие замещенные простые ароматические соединения

При деградации арилгалогенов замещающие группы часто отщепляются на последних этапах катаболизма после разрушения ароматических колец системы. В случае сульфонированных ароматических соединений связь углерод – заместитель высокополярна и должна стать лабильной на первых же этапах, в противном случае всем последовательно работающим ферментам придется «иметь дело» с этой замещающей группой.

Сульфонированные нафталины широко используются в качестве эмульгаторов и смачивающих агентов, а также при производстве азокрасителей; в обычных очистных сооружениях эти соединения не разлагаются микроорганизмами. Однако в непрерывной культуре одно из

использующих нафталин микробных сообществ, выделенное из сточных вод, приобрело способность к расщеплению нафталинсульфоновых кислот. Первые этапы катаболизма включают диоксигенацию, удаление замещающей группировки и реароматизацию – ключевой этап, для которого необходима диоксигеназа с широкой специфичностью, способная к специфическому гидроксилированию по положению 1,2 кольца (рис. 10.19).

Нитротолуолы представляют собой токсичные компоненты сточных вод военных заводов, которые в природе быстро разрушаются. Однако они минерализуются не полностью, поскольку продукты их деградации (ароматические амины) конденсируются с карбоксильными группами биологических макромолекул, образуя полиамиды, которые, по-видимому, устойчивы к последующему действию микробов.

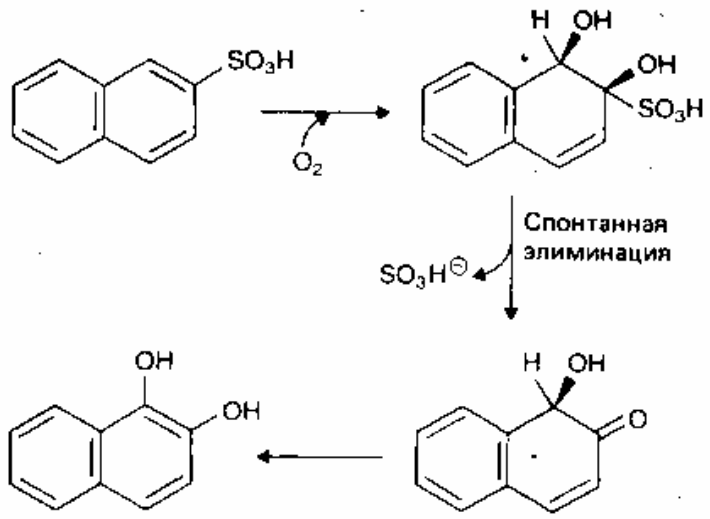


Рис. 10.19. Элиминация остатка сульфоновой кислоты из молекулы нафталина

10.22. Полиароматические углеводороды

Полихлорбифенилы (ПХБ) – это очень устойчивые соединения, которые долго остаются в окружающей среде и прочно адсорбируются биологическими и осадочными материалами. В почвах они практически не мигрируют, а микроорганизмы не могут их глубоко деградировать. ПХБ в пробах из окружающей среды отличаются по составу от ПХБ, получаемых в промышленности, поскольку они модифицируются природными системами. Микробная деградация бифенила осуществляется при участии систем катаболизма, сходных с известными для других ароматических углеводородов. С увеличением степени хлорирования скорость метаболизма падает. Сообщалось, что смешанные культуры микроорганизмов осуществляют деградацию

промышленных ПХБ до неохарактеризованных углеводородов, при этом расщепляются преимущественно молекулы с более низкой степенью хлорирования. Если замещающих группировок больше, чем в тетрахлор-ПХБ, то молекула становится полностью резистентной. В большинстве работ исследовали превращения чистых изомеров ПХБ.

Бензпирен представляет собой устойчивое полиароматическое соединение, при деградации которого образуются канцерогенные гидрокси- и эпоксипроизводные. Он не минерализуется в системах активного ила, хотя было описано несколько культур микроорганизмов, способных частично метаболизировать этот продукт с помощью индуцибельных и неиндуцибельных гидроксилазных систем. При этом образуется сложная смесь конъюгированных производных.

Полистирол очень устойчив к биодеградации. Был описан процесс, в котором тонко измельченные автомобильные шины, изготовленные из стирол-бутадиеновой резины, частично разлагались микроорганизмами после добавления какого-либо поверхностно-активного вещества. Содержащиеся в шинах антиозонаты, антиоксиданты и ускорители вулканизации замедляют этот процесс; конечный продукт можно использовать для улучшения почвы. Имеются сообщения о росте сообщества микроорганизмов на стироле, в результате чего удаляется ингибитор полимеризации 4-трет-бутилкатехол. В результате свободнорадикальной полимеризации стирола происходит осаждение полистирола. Впоследствии этот полимер исчезает, что свидетельствует о способности данного микробного сообщества к разрушению полистирола.

10.23. Биодеградация нефтяных загрязнений

Рассмотрим теперь процессы биодеградации сложных смесей углеводородов и их производных в средах, загрязненных нефтью. Речь пойдет как о сточных водах нефтяной промышленности, так и о загрязнении нефтью окружающей среды. Источники таких загрязнений могут быть самые разнообразные: промывка корабельных бункеров для горючего, аварии на танкерах в открытом море (основная причина нефтяных загрязнений окружающей среды), утечки в нефтехранилищах и сброс отработанных нефтепродуктов.

Сточные воды нефтяной промышленности обычно очищают биологическим способом после удаления большей части нефти физическими способами или с помощью коагулянтов. Токсическое воздействие компонентов таких сточных вод на системы активного ила можно свести к минимуму путем постепенной «акклиматизации» очистной системы к повышенной скорости поступления стоков и последующего поддержания скорости потока и его состава на одном уровне. Однако загрузка этих систем может значительно варьировать и, видимо, лучше использовать

более совершенные технологии, например системы с илом, аэрированным чистым кислородом, или же колонные биореакторы.

Самые большие утечки нефти в окружающую среду происходят в море, где она затем подвергается различным физическим превращениям, известным как выветривание. В ходе этих абиотических процессов, включающих растворение, испарение и фотоокисление, разлагается, в зависимости от качества нефти и от метеорологических условий, 25–40% нефти. На этой стадии разрушаются многие низкомолекулярные алкены. Степень микробиологической деградации выветрившихся нефтяных разливов определяется рядом факторов. Весьма важен состав нефти: относительное содержание насыщенных, ароматических, содержащих азот, серу и кислород соединений, а также асфальтенов в различных типах нефти различно. Определенную устойчивость нефти придают разветвленные алканы, серосодержащие ароматические соединения и асфальтены. Кроме того, скорость роста бактерий, а следовательно, и скорость биодеградации определяются доступностью питательных веществ, в частности азота и фосфора. Оказалось, что добавление таких веществ увеличивает скорость биодеградации. Количество разных организмов, способных расти на компонентах нефти, зависит от степени загрязненности углеводородами. Например, больше всего их находят поблизости от крупных портов или нефтяных платформ, где среда постоянно загрязнена нефтью. Полная деградация нефти зачастую не происходит даже при участии богатых по видовому составу микробных сообществ. Наиболее биологически инертные компоненты, например асфальтены, содержатся в осадочных породах и нефтяных залежах. Основные физические факторы, влияющие на скорость разложения нефти, – это температура, концентрация кислорода, гидростатическое давление и степень дисперсности нефти. Наиболее эффективная биодеградация осуществляется тогда, когда нефть эмульгирована в воде.

Особую проблему представляют выбросы или случайные разливы нефти на поверхности почвы, поскольку они могут привести к загрязнению почвенных вод и источников питьевой воды. В почве содержится очень много микроорганизмов, способных разрушать углеводороды. Однако даже их активность не всегда достаточна, если образуются растворимые производные или поверхностно-активные соединения, увеличивающие распространение остаточной нефти.

10.24. Пестициды

Слив отходов производства пестицидов сегодня строго контролируется; технология очистки сточных вод или их детоксикации хорошо разработана, хотя остается сложной и многообразной. Она включает сначала экстракцию пестицидов растворителями, а затем обычную

биологическую обработку. Для ликвидации непредусмотренных выбросов, происходящих при утечках или при промывке и замене контейнеров с пестицидами, подходящая технология пока отсутствует. Пестициды попадают в окружающую среду и в результате использования их для обработки сельскохозяйственных культур.

Большинство пестицидов расщепляются бактериями и грибами. Превращение исходного пестицида в менее сложные соединения нередко осуществляется при участии сообществ микроорганизмов. Были описаны различные стадии и промежуточные продукты процессов деградации ДДТ, идущей, например, в ходе сопряженного метоболизма и приводящей к полной минерализации этого стойкого пестицида. Часто из среды, содержащей ксенобиотик, можно выделить сообщества такого рода, в которых он служит не основным источником углерода, а источником фосфора, серы или азота. Чрезвычайно высокая токсичность пестицидов зачастую утрачивается на первой же стадии их модификации. Это позволяет разработать относительно несложные микробиологические способы их детоксикации. Например, в результате гидролиза может значительно уменьшиться токсичность пестицида или увеличиться вероятность биодеградации. Для этого хорошо было бы использовать внеклеточные ферменты, способные функционировать в отсутствие коферментов или специфических факторов и осуществлять детоксикацию разнообразных пестицидов. Это могут быть такие гидролазы, как эстеразы, ациламидазы и фосфоэстеразы. Чтобы выбранный фермент можно было применять *in situ*, он должен обладать подходящей кинетикой в широком диапазоне температур и pH, быть нечувствительным к небольшим количествам растворителей или тяжелых металлов, не ингибироваться субстратом при концентрациях, характерных для содержимого очистных систем, а также хорошо храниться.

В ряде случаев в качестве биологического агента детоксикации была испробована паратионгидролаза, выделенная из *Pseudomonas sp*. С ее помощью удалось удалить 94–98% остаточного паратиона (около 75 г) из контейнера с пестицидом за 16 ч при концентрации субстрата 1% (по весу). Забуференные растворы паратионгидролазы использовали также для детоксикации паратиона в разливах на почве, где его концентрация, по-видимому, была весьма высока. Скорость разложения паратиона в этом случае зависела от типа почвы, влажности, буферной емкости раствора и концентрации фермента. При этом значительные количества пестицида были обезврежены всего за 8 ч.

Как показали лабораторные эксперименты, еще одна возможная сфера применения иммобилизованных ферментов – это очистка сточных вод. Были описаны гидролазы для детоксикации других пестицидов. Многие из них обладают широкой субстратной специфичностью, что

открывает большие возможности для создания других простых систем детоксикации пестицидов. В будущем подобные системы смогут применяться при промывке промышленных химических установок и реакторов, ферменты в виде аэрозолей – для удаления пестицидов с поверхностей, а ферменты в сочетании с пестицидами – для быстрого разрушения пестицидов после их использования.

10.25. Биодеградация поверхностно-активных веществ

По чувствительности к биодеградации синтетические поверхностно-активные соединения, применяемые в быту и в промышленности как моющие средства, можно разделить на «жесткие» и «мягкие». Анионные соединения этой группы, такие как алкилбензолсульфонаты, в конце 50-х гг. привлекли к себе внимание тем, что они загрязняют окружающую среду: это проявлялось в образовании пены в водоемах.

Сначала в продажу поступали «жесткие» детергенты, устойчивость которым придавали их разветвленные алкильные боковые цепи. Чтобы предотвратить их накопление в природе, промышленность добровольно перешла к производству подверженных биодеградации, линейных неразветвленных алкилбензолсульфонатов. Разрушение этих поверхностно-активных соединений начинается с окисления концевых метильных групп, после чего за счет β-окисления идет расщепление линейных боковых цепей. Кольцевые структуры молекул обычно разрушаются только после полной деградации боковой цепи. Данный процесс осуществляется только в аэробных условиях, поскольку для начального окислительного этапа требуется кислород.

Разветвленные молекулы не всегда оказываются устойчивыми, хотя процесс их β-окисления и затруднен. Механизм разрушения разветвленной цепи до конца не установлен. Связь углерод – сера является очень прочной, и это увеличивает биологическую инертность молекулы детергента. Реакции десульфирования детально не изучены, но скорее всего в них участвуют гидроксилазы или монооксигеназы. По-видимому, далее сульфонатный остаток превращается в сульфат, возможно, с образованием сульфита в качестве промежуточного продукта. Метаболизм арилсульфонатов уже был рассмотрен нами ранее. Есть основания считать, что десульфирование и *мета*-расщепление ароматического кольца детерминируются плазмидами.

Алкилсульфаты все еще используются как моющие средства на фабриках-прачечных и в косметической промышленности; основную их массу составляют первичные алкилсульфаты. Линейные сульфаты легко разрушаются, но этот процесс замедляется из-за наличия разветвленных участков. В первичной атаке этих молекул участвуют сульфатазы, образующие соответствующие спирты, которые

подвергаются затем дальнейшему метаболизму. Для этого процесса кислород не нужен, и он может идти в анаэробных условиях. Необычность алкилсульфатаз по сравнению с сульфатазами вообще состоит в том, что они атакуют связь C–O в группах C–O–S. Первичные и вторичные алкилсульфаты индуцируют образование сложного комплекса сульфатаз.

Неионные детергенты применяются в быту; поскольку они облегчают смачивание и способствуют образованию эмульсий, их с успехом используют при производстве аэрозолей для сельского хозяйства и в косметической промышленности. Линейные первичные алкогольэтоксилаты минерализуются быстро и до конца, но более высокомолекулярные гомологи более устойчивы. Деградация осуществляется путем окисления концевых метальных групп и последующего *n*-окисления с образованием низкомолекулярных алканоатэтоксилатов, лишенных поверхностно-активных свойств. У вторичных алкогольэтоксилатов гидрофобная алкильная цепь разрушается с обоих концов за счет ω- и β-окисления. Имеющиеся в этих соединениях эфирные связи увеличивают их устойчивость к биодеградации. Были предложены возможные способы расщепления этих связей, в частности монооксигеназное расщепление, гидролиз, участие углерод-кислород-лиазы и окисление α-атома углерода эфирной связи с последующим гидролизом сложного эфира.

Имеющиеся в продаже детергенты редко содержат более 30% поверхностно-активного соединения. К числу остальных компонентов относятся оптические отбеливатели, отбеливатели-окислители, вспомогательные пенообразователи, антикоррозийные добавки и (в ряде случаев) ферменты. Основную массу составляет носитель (наполнитель). Наполнители нужны для: 1) уменьшения концентрации свободного кальция и магния с целью предотвращения образования неорганических осадков; в противном случае выпадут в осадок соли щелочноземельных металлов и аниона детергента; 2) диспергирования агрегатов почвенных частиц и стабилизации почвенных суспензий.

$HOOCCH_2OCH(COOH)CH_2COOH$	КМС
$HOOCCH_2OCH_2COOH$	ОДА
$HOOCCH_2OCH_2CH_2OCH_2COOH$	ЭГДА
$N(CH_2COOH)_3$	НТА

Рис. 10.20. Структура некоторых органических соединений, пригодных для повышения эффективности детергентов

Наполнители должны иметь хорошую буферную емкость и не вступать в нежелательные реакции с другими компонентами смеси. В

течение многих лет для этих целей использовали тринатрийфосфат, но он ускоряет зарастание внутренних водоемов. Процесс эвтрофикации водоемов может ускоряться в результате биодеградации и минерализации любого азотистого или фосфорного соединения. В поисках кандидатов на роль свободных от азота и фосфора наполнителей были выбраны синтетические карбоксиэфиры (КМС – карбоксиметилсукцинат; ОДА – окисидиацетат; ЭГДА – этиленгликольдиацетат; рис. 10.20).

Изучение метаболизма КМС и его аналогов позволило понять, каким путем микроорганизмы приобретают способность к деградации новых ксенобиотиков. Сам КМС быстро разрушается в природе; в начальной реакции участвует индуцибельная лиаза, расщепляющая молекулу КМС с образованием гликолата и фумарата. Аналоги КМС оказались более стойкими, видимо, вследствие субстратной специфичности индуцируемых лиаз. Устойчивость этих аналогов не связана с процессом их поглощения клетками, поскольку было показано, что они поступают в них при участии конститутивной системы транспорта цитрата. КМС-лиаза оказалась удивительно сходной с полигалактуронатлиазой; организмы, развивающиеся на КМС, так же хорошо растут на полигалактуронате. Это весьма показательный пример появления способности к деградации путем приобретения новой функции уже существующими ферментами. Возможно, что эта лиаза кодируется плазмидой. В качестве наполнителя широко использовался нитрилтриацетат (НТА), поскольку он подвержен быстрой биодеградации в системах активного ила и в речной воде.

10.26. Аэробная переработка отходов в сельском хозяйстве. Проблема хранения и переработки отходов

Если сельское хозяйство ведется традиционными способами, то отходов животноводства образуется немного, и их несложно использовать для удобрения расположенных поблизости пахотных земель. Сегодня, когда в животноводстве применяется интенсивная технология, жидкие и твердые отходы образуются в большом количестве, и площадь близлежащих земель может оказаться недостаточной для их использования. Хранить и перерабатывать такие отходы весьма непросто. Кроме того, в последнее время проблемы использования отходов животноводства привлекают пристальное внимание специалистов по охране окружающей среды и органов здравоохранения, которых тревожит возможность проникновения загрязнений в водоемы и распространения таким путем возбудителей заболеваний. Необходимо научиться наиболее полно и экономично использовать ту часть отходов, которую можно применять как удобрения, и в то же время решить

проблемы, связанные с возможным загрязнением среды из-за большого объема таких отходов. Важность задачи потребовала разработки и внедрения различных систем переработки отходов.

Отличительной особенностью аэробной биологической системы, которая столь успешно применяется для переработки бытовых сточных вод, является свободный доступ воздуха к аэробным микроорганизмам, участвующим в превращении различных веществ, содержащихся в отходах, в относительно стабильные конечные продукты. Было показано, что контролируемая переработка отходов сельского хозяйства в аэробных условиях вполне возможна. Ряд научных центров в Европе и Северной Америке приняли участие в исследованиях и разработке программ использования различных систем переработки. Главными особенностями системы, используемой на фермах, должны быть долговечность, простота в эксплуатации и желательно автоматизация всех процессов. Сегодня уже предложено несколько таких маломасштабных систем.

10.27. Системы переработки отходов в аэробных условиях

Для переработки твердых отходов необходимо много времени и средств, поэтому на фермах с интенсивной технологией для их удаления стали широко использовать воду. Образующуюся взвесь закачивают в хранилища или в системы переработки.

10.28. Водоем для окисления

Это наиболее простая установка, представляющая собой неглубокую (не более 150 см) емкость, наполненную отходами и имеющую достаточную площадь поверхности для обеспечения аэрации. На поверхности этого водоема растут фотосинтезирующие водоросли, которые повышают эффективность системы благодаря выделению кислорода. Скорость поступления отходов не должна быть слишком высокой. Недостатки таких установок состоят в том, что 1) переработка отходов требует много времени; если объем отходов велик, необходимы водоемы большой площади; 2) накапливаются твердые отходы, которые разлагаются в анаэробных условиях; 3) создаются условия для размножения насекомых. Но есть и два преимущества: не нужна механизация и обслуживающий персонал.

Аэрируемый водоем сходен с водоемом для окисления и отличается лишь тем, что в нем установлено механическое устройство для усиления аэрации, перемешивания и сохранения твердых частиц в суспендированном состоянии. При одинаковой загрузке такой водоем

может быть меньше по площади и глубже, чем водоем для окисления. Для него проще оценить время переработки и качество стоков.

Такие системы особенно удобны для сбора и переработки отходов, когда жидкость нельзя сливать в природные водоемы, а также для сохранения воды для целей ирригации.

10.29. Каскадные бассейны

Каскадные бассейны – это тоже простая немеханизированная система, применяемая в Англии. В отличие от водоемов для окисления отходы поступают в нее постоянно, и время удержания их в системе невелико. Они включают первичный отстойник (желательно с дефлекторами, позволяющими контролировать скорость протеканиия), в котором осаждаются крупные частицы, а также каскад мелких бассейнов, разделенных перегородками или плотинами, через которые перетекает вода. Переливаясь из бассейна в бассейн, вода аэрируется. Если время удержания подобрано правильно, то глубина переработки оказывается не меньше, чем в водоеме для окисления. Как и в неаэрируемых водоемах, перемешивание осадка идет плохо, а активность микроорганизмов может подавляться из-за недостатка кислорода или же слишком медленной диффузии конечных продуктов обмена.

10.30. Канава Пасвира (*Pasveer ditch*)

Эта система для окисления отходов является модификацией установки с активным илом и представляет собой одну непрерывную, вытянутую в длину емкость, которую часто располагают под полом хлева, откуда поступают отходы; в ней они и окисляются. Жидкость (толщина слоя 0,3–0,6 м) аэрируют и перемешивают с помощью ротора, помещенного в емкость. Имеются приспособления для добавки новой порции отходов и удаления отработанной жидкости. Эта и ряд других систем, основанных на принудительной аэрации, во многом сходны с реакторами непрерывного действия, в которых развивается особая микрофлора (аналогичная таковой в хлопьях активного ила), метаболизирующая субстрат. Сходство заключается в том, что отходы (субстрат) поступают в объеме, небольшом по сравнению с общим их объемом, перерабатываемым в реакторе. Этот тип перерабатывающего устройства активно изучался для выяснения его пригодности для переработки отходов животноводства в контролируемых условиях.

Основной недостаток всех этих систем – невозможность увязать поступление кислорода с его потреблением. Их эффективность можно будет повысить, если удастся точнее оценить скорость расщепления разных субстратов и лучше изучить микроорганизмы, участвующие в процессе.

10.31. Переработка отходов сельского хозяйства в анаэробных условиях. Главные особенности процесса

При переработке органических отходов в анаэробных условиях образуется горючий газ, на 60% состоящий из метана, и твердый остаток, содержащий весь или почти весь азот и все другие питательные вещества, содержащиеся в исходном растительном материале. В природе такой процесс развивается при недостатке кислорода в местах скопления веществ растительного или животного происхождения: в болотах, осадках на дне озер, а также в желудке травоядных. Он может протекать и в закрытой емкости, наполненной подходящим органическим веществом, куда не поступает воздух. Метанобразующие бактерии и некоторые другие микроорганизмы, продуцирующие нужные этим бактериям субстраты, формируют в таких условиях систему прочных симбиотических отношений, которая может функционировать неопределенно долгое время, если в нее в подходящем количестве поступают все новые порции отходов.

Температурный оптимум лежит в интервале 30–35°С, и для его поддержания нужен подогрев. Этот процесс начали изучать еще во времена Пастера; ему посвящено множество работ, а сам процесс был значительно модифицирован, в частности применительно к очистке сточных вод. Это весьма удачный пример действующей биотехнологии, поскольку она может применяться в больших масштабах, оправдывающих капиталовложения и текущие расходы по внедрению. Переработка отходов при участии метанобразующего ила применяется на ряде крупных установок в Англии и других странах, что существенно уменьшает ее стоимость. Она осуществляется, например, на Магденской станции по переработке сточных вод в западной части Лондона (Thames Water Authority). Там установлено двадцать тэнков для переработки жидких отходов, диаметр каждого из них составляет 21,3 м, а глубина равна 10,4–16,0 м, с общим объемом 79000 м^3. Эта станция продолжает действовать, хотя переработка отходов непрерывно производилась на ней в течение почти пятидесяти лет, и вырабатывает метан в количестве, достаточном для работы двухтопливных машин, постоянно подающих сжатый воздух для перемешивания содержимого тэнков и вырабатывающих электроэнергию, потребляемую всей станцией.

10.32. Переработка отходов сельского хозяйства

Еще в начале века было выявлено, что из навоза можно получать горючий газ, а отходы использовать как удобрение. Предпринимались попытки найти практическое применение этому процессу, но в целом интерес к нему был невелик до тех пор, пока нехватка горючего во время войны не заставила обратить на него внимание. С тех пор было сконструировано

множество установок для производства метана, все они имели две основные части: 1) герметичный тэнк или реактор, в котором осуществлялась ферментация; 2) емкость для газа, обычно накопительный плавающий колокол с емкостью, близкой к таковой у реактора.

В 40-х гг. простейшие установки этого типа с реакторами емкостью около 10 $м^3$ использовались французами в Северной Африке, и многие из них продолжали работать как там, так и во Франции до начала 50-х гг. В это время в Англии тоже стали выпускать такие небольшие установки для продажи фермерам, но, по-видимому, лишь немногие из них нашли применение.

Простейшие установки периодического действия имеют ряд серьезных недостатков. Основной из них – трудность загрузки реактора полутвердыми отходами и его опорожнение, которые обычно проводят вручную. Неудобство заключается и в том, что надо иметь несколько реакторов, процесс в которых находится на разных стадиях, чтобы сгладить неравномерность в интенсивности образования газа, а также иметь возможность подогревать реакторы до 30–35°С. Все это, без сомнения, препятствовало широкому использованию генераторов метана на фермах, и от них практически отказались, когда в 60-х годах было налажено снабжение баллонами с пропаном и бутаном.

Совсем иначе обстояло дело в послевоенной Германии, где были предприняты разработки крупных высокомеханизированных установок.

Классическим примером может быть установка «Bihugas», построенная Ф. Шмидтом в Аллерхопе на ферме площадью 120 га, где в 1950 г. содержалось 55 голов крупного рогатого скота, 180 свиней и 650 кур. По расчетам навоза от этих животных, если смешать его с соломой, было достаточно для производства $4{,}5 \cdot 10^4$ $м^3$ газа в год. Установка включала несколько цилиндрических подогреваемых наземных реакторов, в которые насосами подавалась взвесь из навоза и резаной соломы. Ферментацию проводили непродолжительное время, в течение 5–21 суток, когда газ образовывался наиболее интенсивно. Увеличить выход газа путем продолжительной неэкономичной переработки не пытались. Безусловно, работа такой установки была весьма эффективной, но ее размеры и стоимость были таковы, что она могла работать только на самых крупных животноводческих фермах. Такие крупные установки, несмотря на их эффективность, нередко не выдерживали конкуренции с более обычными и дешевыми источниками энергии, и ими переставали пользоваться.

Резкий подъем цен на нефть в 70-х гг. вынудил фермеров к экономии, и неудивительно, что при этом вновь пробудился интерес к генераторам метана и эффективным методам переработки навоза. Нефтяной кризис послужил толчком к публикации в общедоступной прессе множества статей и заметок, которые призывали наладить производство метана в масштабах всей страны, на каждой ферме, в

каждом доме и даже машине. Такие предложения нередко были сущей чепухой и свидетельствовали о неправильном понимании сути дела. Интерес к проблеме сохраняется до сих пор, и в области метаногенной ферментации были достигнуты серьезные успехи.

10.33. Микробиологические основы процесса

Метанобразующие бактерии являются строгими анаэробами, и при их исследовании ученые столкнулись с рядом проблем. Это касалось, прежде всего, их выделения, но сегодня эта задача облегчается тем, что сконструированы удобные установки, где созданы анаэробные условия. В настоящее время изучено множество таких бактерий, и мы многое узнали об особенностях их метаболизма.

На первой стадии процесса ферментации из растительной и фекальной массы образуются летучие жирные кислоты (уксусная, масляная). Важную роль при этом играют клостридии. Кислоты (за исключением уксусной) служат далее субстратом для группы уксуснокислых бактерий. В конечном счете в результате совместного действия этих групп бактерий образуются уксусная кислота, водород и углекислый газ, которые являются подходящим субстратом для метанобразующих бактерий. Эти бактерии относятся либо к ацетокластам (например, *Methanosarcina barkeri,* которая превращает уксусную кислоту в метан и CO_2), либо к группе бактерий, использующих водород (например, M*ethanospirillum hungatei,* которая синтезирует метан из водорода и CO_2).

10.34. Современные разработки

Основная проблема, которая возникает на фермах, где содержится много животных, заключается в хранении навоза и использовании его наиболее выгодным образом. Если при этом в качестве побочного продукта будет образовываться метан и затраты на хранение навоза не увеличатся, то фермеры, безусловно, отнесутся к такой возможности положительно. Однако осуществить эту возможность на практике вряд ли удастся, поскольку эффективные механизированные установки, предназначенные для использования в развитом сельском хозяйстве, весьма дороги. В Англии сегодня выпускают реакторы улучшенной конструкции для переработки отходов ферм, но затраты на них едва ли можно компенсировать доходами от производства метана. Для переработки разбавленных промышленных отходов также сконструировано несколько интересных новых типов анаэробных реакторов, в которых используется принцип псевдоожиженного слоя, но здесь основная цель состоит в очистке стоков, а не в получении горючего газа.

Многие тысячи простейших реакторов были построены в Индии, Африке, на Дальнем Востоке и в Китае. Здесь есть кому их обслуживать из-за избытка рабочих рук. Очень трудно, однако, оценить, насколько они на самом деле полезны и как долго прослужат.

10.35. Использование протопластов в селекции растений. Вегетативное размножение

Изменчивость высших растений определяется в основном перераспределением генов при половом размножении. Хотя такая изменчивость и важна с эволюционной точки зрения, она служит помехой при разведении сортов растений с желаемым набором признаков. К счастью, не все цветковые растения размножаются только половым путем. У многих из них образуются особые органы вегетативного размножения, например видоизмененные стебли – известные всем усы земляники и клубни картофеля. Многие растения обладают ценной особенностью: они способны к полной регенерации из небольшого отрезка стебля, черенка. Эта особенность широко используется для разведения растений с ценными сортовыми признаками. Только таким способом можно разводить растения, неспособные давать потомство половым путем. Некоторые растения полностью регенерируют из целых листьев (многие суккуленты) или их частей (например, бегонии).

Полноценное растение может развиться и из каллусной ткани, выращенной из меристемы *in vitro*. Этот метод позволил получить безвирусные сорта картофеля. Вот уже несколько лет метод культуры тканей используется для выведения оздоровленных и устойчивых к болезням растений, для создания сортов с определенным генотипом, а также для сохранения и разведения сортов ценных растений.

Сегодня мы знаем, что многие изолированные клетки, если их культивировать в соответствующих условиях, могут регенерировать в целое растение. Клетка, обладающая такой способностью к росту и формированию ткани, из которой затем развивается полноценное растение, называется тотипотентной. В середине 60-х гг. тотипотентность клеток была обнаружена у многих видов растений.

Из тотипотентных клеток легко получить лишенные клеточной стенки протопласты. Разработаны методы их культивирования для получения каллусной ткани и затем – небольших растений, которых можно размножать обычными способами.

Протопласты получены из тканей большинства органов растений, в том числе из корней, листьев, лепестков, плодов, колеоптил, запасающих органов, тетрад микроспор (из пыльников), корневых клубеньков бобовых и каллусных тканей. Чаще всего для этого берут мезофильную ткань листа: из нее образуется много единообразных протопластов. Нередко из

протопластов получают каллусные культуры, из которых можно регенерировать целое растение. К сожалению, до последнего времени не удавалось вырастить целые растения из изолированных протопластов бобовых и злаков – двух важнейших групп культивируемых растений. Нередко в относительно простых условиях выращивания и с высоким выходом была осуществлена регенерация в целое растение протопластов *Medicago sativf* (люцерна, альфальфа). Это позволяет надеяться, что, подобрав соответствующие условия, удастся регенерировать из протопластов и бобовые. Сегодня мы еще не умеем регенерировать растения из протопластов хлебных злаков и пищевых бобовых, но в 1980 г. Вернике и Бреттел (Werniche, Brettell, 1980) добились образования каллуса и регенерации растений из листьев злаков, так что можно ожидать, что и в случае протопластов злаков будет достигнут прогресс.

Особая ценность протопластов для селекции растений определяется целым рядом их свойств. Во-первых, протопласты можно получать в большом количестве и отбирать из них разновидности с полезными свойствами. Хотя сами протопласты генетически единообразны, формирующиеся из них каллусы дают растения, существенно различающиеся по внешним признакам. Во-вторых, отсутствие клеточной стенки облегчает слияние протопластов и образование гибридов. Поскольку при этом сливаются соматические, как минимум диплоидные, клетки, селекционер растений получает в свои руки мощный инструмент для отбора. В-третьих, в отсутствие клеточной стенки облегчается захват чужеродной ДНК – фрагментов молекул или же бактериальных плазмид, в результате чего формируются растение с совершенно новым набором признаков.

10.36. Изменчивость

Хотя растения, полученные в результате размножения вегетативным путем (клоны), обычно похожи на родительское растение, из этого вовсе не следует, что все эти клоны генетически: одинаковы. Иногда возникают клоны, которые существенно отличаются от исходной формы. Их называют соматическими вариантами или «спорами», и появляются они в результате генетических изменений в клетках меристемы, которые дают начало всему новому растению или его части. В ряде случаев такие споры были размножены и привели к созданию новых сортов. Примером могут быть апельсины «Навель» и персики-нектарины. В основе соматической изменчивости лежит ряд генетических механизмов: изменение числа хромосом в ядре, мутация отдельных генов, модификация внеядерных генов клеточных органелл (хлоропластов и митохондрий). Хотя изменчивость растений картофеля, полученных из протопластов, обычно невелика, для протоклонов тетраплоидного сорта *Russet Burbank* она

оказалась существенной. Изучение изменчивости у регенерированных растений картофеля сорта *Maris Bard* показало, что она возникает при росте каллусов из генетически единообразных протопластов и не является следствием экспериментов с самими протопластами.

Изменчивость протоклонов, наблюдающаяся в отсутствие мутагенов, весьма важна для растениеводства: благодаря ей селекционер растений получает богатый исходный материал. Так, среди регенерантов картофеля были выявлены растения с потенциально полезными признаками: низкорослые, с измененными клубнями и с разными сроками созревания.

10.37. Регенерация растений из протопластов

Шеферд и Тоттен (Shephard, Totten, 1977 г.) в опытах с картофелем, у которого регенерация растений из культуры тканей затруднена, разработали метод, позволяющий достаточно успешно регенерировать растения из протопластов. Их способ был несколько необычным, поскольку предусматривал особые условия выращивания растений, из которых потом получали протопласты. Кроме того, на каждой стадии развития растений-регенерантов они применяли особую среду.

10.38. Выращивание растений для опытов

Растения картофеля (американский сорт *Russet Burbank*) выращивали из клубней, свободных от Х-вируса, при высокой освещенности (продолжительность светового дня 12 ч), при 24°С и относительной влажности 70–75%. Перед началом опыта растения выдерживали 4–10 суток при той же температуре и влажности, но более слабом (7000 люкс) и менее продолжительном освещении (6 ч в сутки). Содержание растений в условиях слабого и непродолжительного освещения приводило к существенному увеличению выхода жизнеспособных протопластов из тканей листьев (до $2–3 \cdot 10^6$ на 1 г ткани).

10.39. Среды для выделения и размножения

При выделении и размножении протопластов применяли среды пяти типов (А–Е), которые представляли собой варианты среды, предложенной Лэмом (Lam, 1975). В их состав входили основные питательные вещества растений, микроэлементы, аминокислоты, факторы роста, фитогормоны и регуляторы осмотического давления. Содержание веществ подбиралось так, чтобы обеспечить оптимальный рост на каждом этапе регенерации. Все среды содержали 1,5–2,0% агара, кроме полужидкой среды А, где его концентрация составляла только 0,5%.

Среды D и E, использованные на заключительном этапе, содержали 1650 мг/л NH_4NO_3.

10.40. Выделение протопластов

4 г ткани, вырезанной из стерилизованных с поверхности молодых листьев, инкубировали в 200 мл среды А (без сахарозы и агара) в темноте при 4°С в течение 16–24 ч. Затем среду заменяли на 100 мл забуференного (pH 5,6) раствора с ферментами, чтобы отделить мезофильные клетки и удалить их клеточные оболочки. При встряхивании смеси процесс заканчивался за 4 ч при 28°С. Жизнеспособные протопласты после процеживания смеси собирали центрифугированием, промывали средой А, снова осаждали и хранили в жидкой среде А при концентрации $6 \cdot 10^5$ клетка/мл.

10.41. Рост каллуса

При инкубации протопластов на твердой среде В или на модифицированной твердой среде происходит регенерация клеточных стенок и ограниченное деление клеток, в результате чего образуются микрокаллусы. После переноса в среду С они растут далее до стадии, когда становится возможным перенос в среду D, где индуцируется образование (морфогенез) побегов. На заключительной стадии каллусы с побегами длиной около 1 мм переносят на среду Е для завершения образования побегов и формирования корней. Укорененные растения пересаживают в небольшие горшочки с вермикулитом, где они и растут далее.

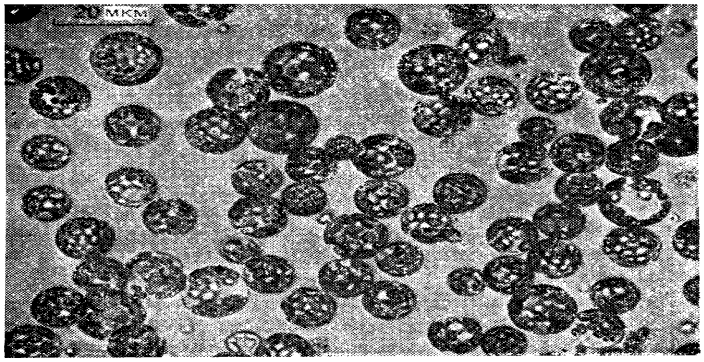


Рис. 10.21. Свежевыделенные протопласты *Solanium brevidens*

Здесь изложена суть метода, который следует использовать для регенерации целых растений из одиночных протопластов, и проиллюстрировано, как экспериментатору приходится варьировать условия на разных стадиях развития, чтобы добиться успеха. На

рис.10.21–10.24 показано, как выглядят свежевыделенные протопласты, молодые каллусы и крошечные растения, регенерированные из ткани каллуса. Особенно важно в этой работе строго выдерживать надлежащие условия, однако почти наверняка их придется специально подбирать для каждого изучаемого вида растений.

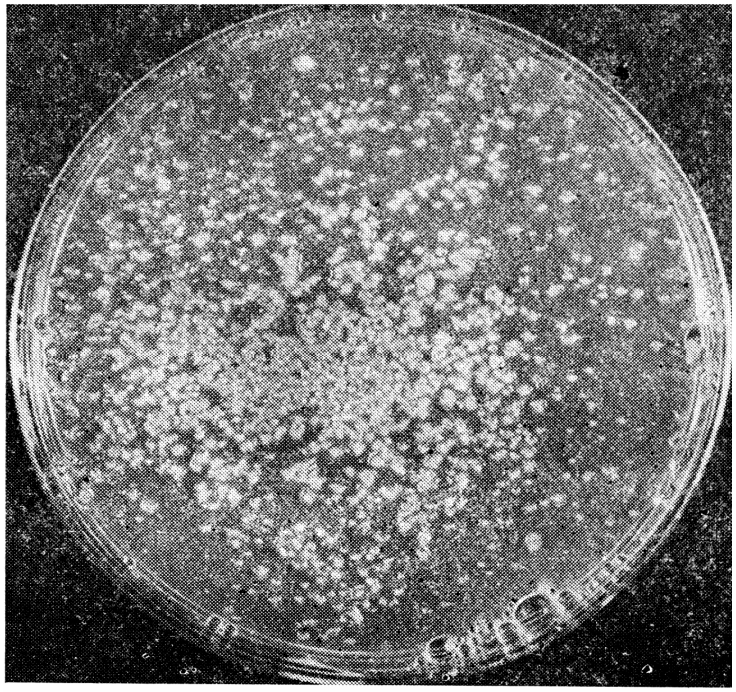


Рис. 10.22. Каллусы, образовавшиеся из протопластов *Solarium brevidens* на агаре. Снимок сделан примерно через месяц после получения протопластов. Для выращивания использована чашка Петри диаметром 9 см

Томасу (Thomas, 1981) удалось получить культуры побегов тетраплоидного картофеля сорта Manis Bard, которые использовались как исходный материал для выделения протопластов.

Пазушные почки стерилизовали с поверхности раствором гипохлорида натрия и культивировали затем на среде Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962), содержащей, кроме того, сахарозу (30 г/л), агар (6 г/л) и 6-бензиламинопурин (6-БАП, 0,5 мг/л), pH 5,8. В ходе инкубации при 26°С при освещенности ~400 люкс (16 ч днем, 8 ч ночью) за 3–5 недель образовывались ростки длиной около трех см. Их можно было использовать для дальнейшего размножения на той же среде, но без 6-БАП для чего брали короткие (3–8 мм) отрезки стебля с листом и пазушной почкой. Рост продолжался три недели, после чего побеги можно было опять использовать для размножения или же выделения протопластов. Цельные проростки (но не взятые отдельно листья) давали

жизнеспособные протопласты, которые могли длительное время делиться в культуре.

Хотя о возможности слияния протопластов растений было известно уже давно, метод контролируемого слияния с воспроизводимыми результатами был разработан лишь в 1970 г. (Power et al., 1970). Тем самым был сделан первый шаг к соматической гибридизации растений. При суспендировании протопластов в 0,25 М растворе азотнокислого натрия слияние происходило очень быстро. Впоследствии для индукции слияния протопластов *Parthenocissus tricuspidata* и *Petunia hybrida* использовали 10,2%-ный раствор сахарозы, содержащий 5,5% азотнокислого натрия. Для той же цели применяли хлористый кальций.

Было показано (Kao, Michayluk, 1974), что полиэтиленгликоль с большой молекулярной массой также вызывает неспецифическое слипание, а затем и слияние протопластов растений. При инкубации в самом полиэтиленгликоле слияний почти не происходило, но при его разведении гибриды образовывали до 10% протопластов. ПЭГ способствовал также захвату хлоропластов водоросли *Vaucheria dichotoma* протопластами моркови. Методы слияния протопластов подробно описаны в руководстве Пауэра и Дэйви (Power, Davey, 1979).

Рис. 10.23. Регенерация мини-растений *Solarium brevidens* из каллусной ткани, полученной из протопластов (снимок сделан приблизительно через 100 суток после перенесения на агаровую среду, способствующую регенерации)

Рис. 10.24. Регенерация мини-растений *Solarium brevidens* из каллусной ткани, полученной из протопластов (снимок сделан приблизительно через 100 суток после перенесения на агаровую среду, способствующую регенерации)

10.42. Получение соматических гибридов

Для осуществления гибридизации соматических клеток методом слияния протопластов необходимо выполнить следующие операции: 1) выделить протопласты; 2) осуществить слияние; 3) регенерировать клеточные стенки; 4) осуществить слияние ядер так, чтобы получить полноценное гибридное ядро; 5) размножить гибридные клетки; 6) регенерировать целое растение. Осуществить слияние протопластов растений, вообще говоря, несложно, но из этого не следует, что столь же просто размножить гибридные клетки или же регенерировать гибридное растение. Прежде всего, нужно отобрать гибридные протопласты, которые составляют лишь малую часть всех клеток, а затем создать им условия для развития. Примером работы такого рода может быть эксперимент по соматической гибридизации Petunia hybrida и Petunia parodii. Здесь отбор был основан на различиях в способности к росту протопластов из листьев этих двух видов растений. Дело в том, что протопласты Petunia parodii в использованной в этом опыте среде могли формировать лишь микрокаллусы, состоящие не более чем из пятидесяти клеток, в то время как из протопластов Petunia hybrida можно получать

растущие каллусы. Было использовано также и то обстоятельство, что протопласты Petunia hybrida более чувствительны к актиномицину D, чем протопласты Petunia parodii.

Гетерокарион, образующийся в результате слияния двух разных протопластов, может после слияния ядер превратиться в гибридную клетку. Имеется в виду, что происходит объединение всех несущих генов, самореплицирующихся органелл обоих протопластов, в то время как при обычном половом скрещивании от каждой родительской клетки поступает по ядру, несущему хромосомные гены (кариомы), но гены, передаваемые с пластидами (пластидомы) и митохондриями (хондриомы), передаются обычно лишь от женской клетки. Таким образом, методы на основе слияния протопластов позволяют получать комбинации двух полных родительских геномов. Слияние протопластов двух скрещивающихся половым путем видов нередко приводит к образованию стабильных амфиплоидных гибридных клеток, из которых могут быть регенерированы растения соматические гибриды. Надо сказать, что метод слияния протопластов пригоден для работы не только со столь близкими видами или гибридными клетками.

Томас и др. (Thomas et al., 1979) перечисляют ряд работ, в которых была осуществлена регенерация в экспериментах по слиянию протопластов растений, принадлежащих к одному и тому же (7 случаев) и разным (14 случаев) видам. В четырех экспериментах по межвидовому слиянию были получены линии клеток, а в четырех других – осуществлен захват клеточных органелл протопластами. В двух опытах в протопласты растений была введена чужеродная ДНК, которая экспрессировалась, а в трех из протоклонов были получены мутантные растения. Способы применения метода слияния протопластов весьма многообразны.

Возможность образования соматических гибридов создает предпосылки для изменений внеядерного генного компонента гибридных клеток. Для этого, например, можно использовать протопласты-альбиносы, в которых нет хлоропластных генов, или же протопласты, у которых во время слияния проводится инактивация ядерного генома одного из родителей. Донорами цитоплазматических генов, вводимых путем слияния в полноценные протопласты, могут быть безъядерные субпротопласты или микропласты.

10.43. Захват протопластами микроорганизмов и ДНК

Дэйви и Пауэр (Davey, Power, 1975) обнаружили, что ПЭГ способствует захвату клеток и протопластов дрожжей и клеток сине-зеленых водорослей протопластами *Parthenocissus tricuspidata.* При этом микроорганизмы локализуются в ограниченных мембранами пузырьках (везикулах) цитоплазмы протопластов. Значительный интерес представляет

возможность введения в протопласты интактных микроорганизмов с полезными свойствами, например таких, которые способны фиксировать азот. Другой вариант – это введение в высшие растения генетического материала микробов с последующей его экспрессией. В принципе методы слияния протопластов вполне могут использоваться для этой цели, но пока успехи и в этой области весьма скромны (Thomas et al., 1979).

При введении в протопласты нового генетического материала в виде чистой ДНК последняя не всегда сохраняется и экспрессируется в хозяйских клетках. Весьма перспективным представляется использование в качестве векторов Ti-плазмид *Agrobacterium tumefaciens*, так как они непосредственно включаются в ДНК хозяина и легко экспрессируются при образовании опухолей. Ti-плазмиды, содержащие или не содержащие чужеродной ДНК, могут вызвать трансформацию протопластов растений. По-видимому, такие исследования будут проводиться все более интенсивно.

10.44. Переработка отходов, образующихся при загрязнении почвы

Известно, что в каждом доме в результате жизнедеятельности его обитателей образуется существенное количество ненужных материалов и изделий, начиная со старых бумаг, пустых консервных банок, бутылок, пищевых отходов, и кончая изношенной одеждой, разбитой посудой и вышедшей из строя бытовой техникой. Традиционно все эти отходы выбрасываются, в результате чего образуются огромные свалки и грубо нарушается один из основных экологических законов – закон обязательного кругооборота веществ в живой природе.

Здравый смысл говорит нам, что общество, производящие эти и другие отходы и не использующее их, не может быть надолго устойчивым. В настоящее время некоторые страны находятся на грани кризиса: количество мусора неизмеримо растет, а мест для свалок становится все меньше и меньше. Однако существуют пути, если не полного, то частичного решения этой проблемы и в ряде случаев они успешно внедряются на практике.

10.45. Пути ликвидации твердых отходов

Общий термин для всех вышеназванных материалов, которые мы выбрасываем из домов и учреждений и обычно называем мусором, отбросами и т.п., – **твердые бытовые отходы.** К ним не относятся промышленные, сельскохозяйственные и канализационные отходы, о которых шла речь в предыдущих разделах.

На протяжении многих лет количество твердых бытовых отходов неуклонно возрастало: отчасти из-за роста населения, но в основном из-за изменения образа жизни людей, использующих все больше оберточных и

упаковочных материалов. Сейчас на человека приходится свыше 1,5 кг твердых бытовых отходов. Для уборки такого количества мусора только в США требуется 63 тыс. мусоровозов, а общий объем мусора составляет 140 млн. т в год.

Исследования показывают, что состав городских твердых бытовых отходов примерно таков:

Бумага…….……41%
Пищевые отходы……21%
Стекло……. ...12%
Железо и его сплавы…… ….. ..10%
Пластмассы……..…… . ..5%
Древесина……..…… … ..5%
Резина и кожа……..…… . ..3%
Текстиль……...……... .2%
Алюминий……...…… .1%
Другие металлы……0,3%

Доля отдельных компонентов отходов существенно варьирует в зависимости от их источника (жилой дом или торговый центр, обеспеченный или бедный район и т.д.), а также от времени года. В отдельные сезоны доля **садового мусора** (скошенной газонной травы, опавших листьев и т.п.), равна по объему всем остальным вместе взятым категориям.

Как правило, местные власти должны убирать и ликвидировать твердые бытовые отходы. Муниципалитет, либо, располагая собственными мусоровозами, нанимает для них рабочих, либо заключает контракт с частной фирмой на уборку мусора. В любом случае уборка оплачивается из городского бюджета, который в свою очередь формируется за счет местных налогов.

10.46. Открытые горящие свалки

Вплоть до 1960-х гг. большая часть твердых бытовых отходов вывозилась и сжигалась на открытых площадках. Это позволяло уменьшить объем материала и продлить срок работы свалки, однако отходы плохо горят. Такие свалки нещадно дымили, распространяя зловоние, и служили рассадниками мух, крыс и т.п. В некоторых городах использовались печи для сжигания мусора, но без надлежащего контроля они становились основными источниками загрязнения воздуха. Поэтому по требованию населения и в соответствии с законами о защите окружающей среды открытые горящие свалки и большинство таких печей к концу 1960-х-началу 1970-х гг. были ликвидированы.

10.47. Захоронения

В качестве альтернативы чаще всего используются *захоронения (могильники).* При этом мусор просто зарывают в землю или вываливают на нее и засыпают землей. Поскольку отходы в этом случае не горят и покрыты несколькими сантиметрами грунта, удается избежать как загрязнения воздуха, так и размножения нежелательных животных. К сожалению, при создании захоронений принимались во внимание только два последних обстоятельства, а также имеющиеся средства. Руководители городских служб по уборке мусора обычно не понимали экологических проблем и не интересовались тем, как происходит круговорот воды, какие вещества могут появиться в процессе разложения отходов, как избежать нежелательных последствий. Как правило, любой дешевый и удобно расположенный участок земли с естественным понижением становился местом захоронения отходов. Часто для этого выбирались овраги, лощины, заброшенные карьеры, заболоченные низины. После приобретения участка начиналось заполнение его мусором без всяких мер предосторожности. Девизом было: «Яму следует засыпать». При этом порой планировалось позднее (после подсыпки почвы и рекультивации) разместить на месте свалки парк или игровую площадку, что во многих случаях и делалось. То есть первоначально такие захоронения рассматривались и как способ одновременного освоения «пустырей».

10.48. Проблемы, связанные с захоронением отходов

Поняв все, о чем говорилось в предыдущих главах, Вы и сами сможете назвать проблемы, связанные с захоронением отходов. В их число входят:

- вымывание веществ и загрязнение грунтовых вод;
- образование метана;
- просадка грунта.

10.49. Вымывание веществ и загрязнение грунтовых вод

Самая серьезная проблема – это загрязнение грунтовых вод. Вспомним, что по мере просачивания воды сквозь любой материал в ней обычно растворяются и с ней выносятся различные химические вещества. Такая вода с растворенными в ней загрязнителями называется **фильтратом.** Когда она проходит через необработанные отходы, образуется особенно ядовитый фильтрат, в котором наряду с остатками разлагающейся органики присутствуют железо, ртуть, свинец, цинк и другие металлы из ржавеющих консервных банок, разряженных батареек и других электроприборов, причем все это густо приправлено красителями,

пестицидами, моющими средствами и другими химикатами. Неграмотный выбор мест захоронения отходов и отсутствие мер предосторожности позволяют этому зелью попадать прямо в подземные водоносные горизонты.

Захоронения городских отходов, которые загрязняют или будут загрязнять грунтовые воды, есть во всех штатах США, но зоной настоящего кризиса стала Флорида. Большинство закрытых свалок расположено здесь в заболоченной местности, а 92% питьевой воды жители получают за счет грунтовых вод. В результате уже более 200 захоронений на территории Флориды либо внесены, либо планируется внести в список Суперфонда. Вы помните, что это федеральная программа по очистке мест, которые могут стать источником загрязнения грунтовых вод и угрозы для здоровья человека. Очистка каждой свалки обойдется в 10–100 млн. долларов. Слишком дорого для «дешевого» способа ликвидации отходов.

10.50. Образование метана

Вторая проблема – это образование метана. У захороненного мусора нет доступа к кислороду. Поэтому его разложение идет анаэробно, а один из продуктов его – биогаз, на 2/3 состоящий из легковоспламеняющегося метана. Образуясь в толще захороненных отходов, он может распространяться в земле горизонтально, проникать в подвалы зданий, накапливаться там и взрываться при зажигании. Так было разрушено более 20 домов, расположенных на расстоянии до 300 м от свалок, причем взрывы привели к человеческим жертвам. Кроме того, метан может распространяться вверх, отравляя корни и губя растительность на месте захоронения. В отсутствие растительного покрова начинается эрозия почвы, и отходы обнажаются на поверхности. В ряде городов эта проблема решена путем устройства на месте свалок «газовых скважин», перехватывающих метан, который можно впоследствии использовать как топливо.

10.51. Просадка грунта

Наконец, по мере разложения отходы проседают. Неизбежность этого процесса была очевидна с самого начала, поэтому зданий на местах свалок не строили. Однако на игровых площадках просадка грунта тоже весьма нежелательна, поскольку образуются неглубокие понижения, в них скапливается вода, а весь участок превращается в болото.

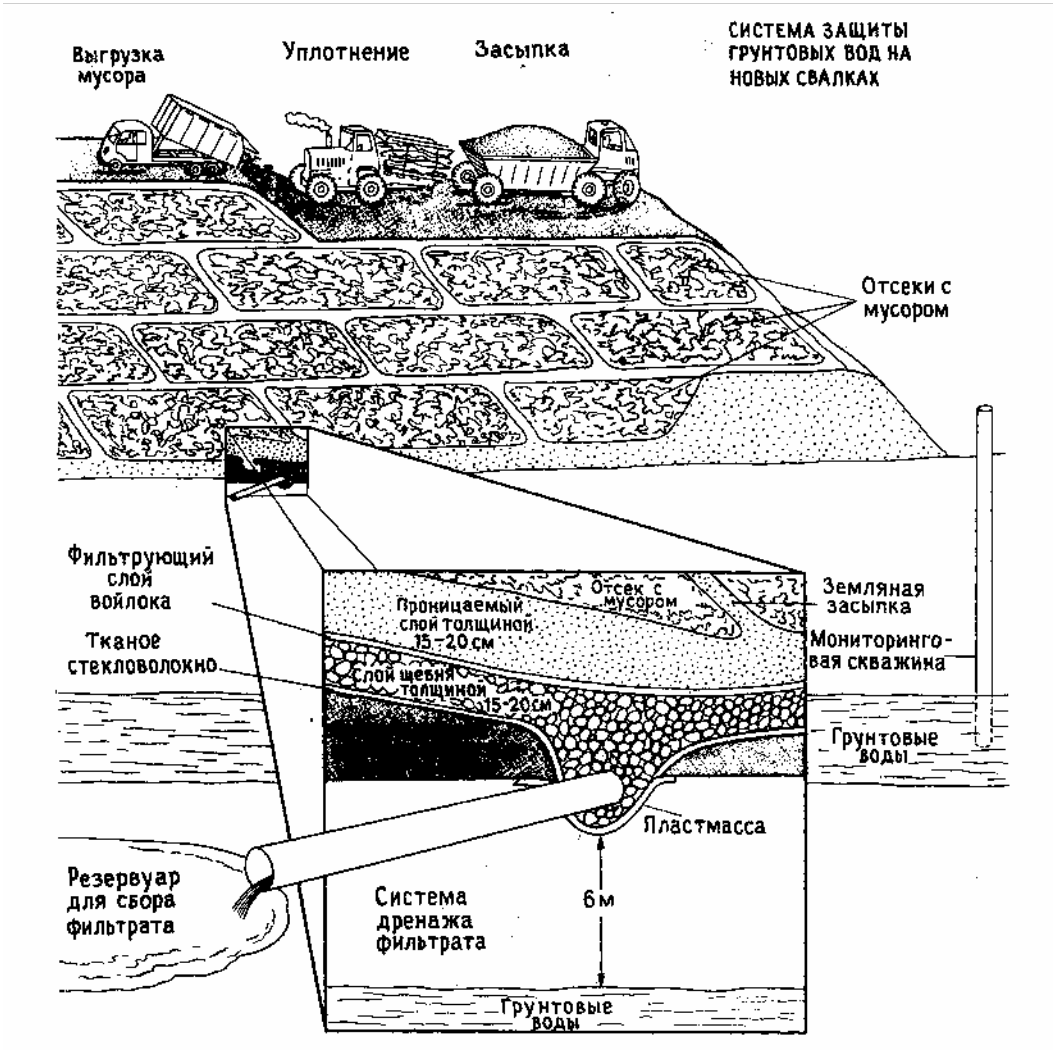


Рис. 10.25. Схема современного захоронения отходов с системой защиты окружающей среды. Могильник расположен на возвышенности, значительно выше уровня грунтовых вод. Дно его изолировано уплотненным слоем глины, на котором находится слой щебня для отвода фильтрата и метана. Один слой мусора укладывается на другой так, что получается пирамидообразная насыпь, с которой стекает вода. Могильник окружен скважинами, с помощью которых ведется мониторинг загрязнения грунтовых вод

10.52. Усовершенствование захоронений - попытка закрепить порочную практику

Приняв во внимание все вышеуказанные проблемы, Агентство охраны окружающей среды США повысило требования к выделению и

обустройству мест для захоронения отходов. В соответствии с современными правилами:

- новые могильники должны создаваться на повышенных местах с глубоким залеганием грунтовых вод; нередко с вершины холма снимают грунт, используемый в последствии для засыпки отходов на полученной площадке, все еще находящейся значительно выше уровня грунтовых вод;
- по периметру могильника должны быть вкопаны керамические трубы для сбора воды и фильтрата, а его дно следует покрыть водонепроницаемым слоем глины или пластика толщиной по меньшей мере 12 дюймов; поверх него укладывают слой крупного гравия и слой пористого грунта; все это предназначено для того, чтобы фильтрат, достигнув водонепроницаемого слоя, стекал сквозь гравий в систему коллекторов, а затем подвергался соответствующей переработке;
- слой гравия, окружающий свалку, служит и для отведения образующегося метана;
- послойная укладка отходов продолжается до тех пор, пока захоронение не станет похоже на пирамиду; при такой форме сводятся к минимуму инфильтрация и просачивание воды, а следовательно, и вымывание веществ из мусора;
- наконец, по периметру свалки устраиваются мониторинговые колодцы для периодического контроля за качеством грунтовых вод.

Все эти требования к захоронениям отражены на рис. 10.25.

10.53. Возрастание стоимости захоронений

Хотя предложенная конструкция и решает в принципе перечисленные выше проблемы, широкому ее внедрению мешает стоимость, причем наибольших расходов требует не сама стройка, а приобретение земельного участка и доставка туда отходов.

Никто не хочет жить возле свалки, а продолжающаяся урбанизация ведет к отсутствию в окрестностях городов мест, не занятых дорогими коттеджами. Поэтому выбор участка под захоронение вызывает протест и часто судебный иск под лозунгом: «Где угодно, только не здесь!» Юридические расходы на преодоление этих препятствий нередко равны по стоимости всем остальным издержкам, вместе взятым. Альтернативой может быть выбор весьма отдаленного участка, но тогда очень дорогой становится доставка туда отходов. Играют роль и границы между регионами: ни один из них не хочет служить свалкой для другого. В результате всего этого во многих случаях расходы при

использовании нового захоронения отходов составляют более 100 долларов за тонну мусора.

По причине столь высоких цен и юридических препятствий большинство твердых бытовых отходов все еще отправляется на старые свалки, где нет адекватной системы защиты окружающей среды. Например, из 6000 городских свалок в США, куда сбрасывается 75% (свыше 100 млн. т) твердых бытовых отходов в год, три четверти не изолированы, на 95% нет системы сбора фильтрата, на 75% не ведется мониторинга грунтовых вод. К сожалению, в нашей стране дело обстоит еще хуже.

Этот кризис продолжает обостряться: в ближайшие пять лет в США намечено закрыть около 1200 старых свалок, исчерпавших свою емкость или представляющих угрозу для среды, в то время как новых захоронений планируется построить вдвое меньше. В 1960-е гг. многие экологи думали, что наше общество, неразумно избавляясь от отходов, вскоре столкнется с нехваткой сырья. По иронии судьбы, его-то пока хватает, а выбрасывать мусор уже некуда.

Здравый смысл подсказывает, что даже при достаточных площадях под новые захоронения сама их система неустойчива. В итоге мы можем получить покрытый «пирамидами» ландшафт, а большая часть общества станет «жрецами», занимающимися ритуальным сбором проб подземных вод без ясного понимания, зачем это делается. К счастью, такое развитие событий не обязательно.

10.54. Возможные решения. Рециклизация

Рециклизация, т. е. вторичная переработка отходов, – очевидный выход из положения. Разумеется, многие предлагали его и раньше. В небольших масштабах стекло, бумага и алюминиевые банки рециклизуются уже десятки раз. Что же мешает перерабатывать практически весь утиль? Дело в том, что на пути широкомасштабной рециклизации отходов существует ряд препятствий. Однако, если определить эти трудности, их можно преодолеть, и в ряде случаев проблема уже решается. Рециклизация отходов представляет собой огромную развивающуюся отрасль промышленности с блестящим будущим.

10.55. Трудности на пути рециклизации

Основные препятствия, которые следует преодолеть на пути рециклизации отходов, следующие.

Сортировка. Мы привыкли выбрасывать все отходы в один контейнер и ликвидировать их как единое целое. Чтобы рециклизировать эту массу мусора, ее следует сортировать либо дома, либо уже после сбора.

Отсутствие стандартов. Сортировка затруднена отсутствием стандартов. Так, в составе сходных или даже одних и тех же продуктов могут быть различные типы пластмасс или бумаги.

Переработка. Должны существовать фирмы, заинтересованные в получении собранных материалов и переработке их в пользующиеся спросом товары. В противном случае все это опять же попадет на свалку.

Маркетинг. Необходим промышленный или потребительский рынок для покупки продукции, изготовленной из вторичного сырья. В противном случае перерабатывающая фирма обанкротится, а переработанный утиль вновь станет мусором.

Противоречия между государственным и частным секторами. Обычно сбор мусора производится местными властями, которые неохотно вникают (да, вероятно, и не должны вникать) в проблемы дальнейшей переработки отходов и реализации вторсырья; это дело частного бизнеса. Производственные фирмы в свою очередь предпочитают иметь дело с чистым, однородным сырьем, а мусор к таковому не относится. Поэтому, за редкими исключениями, они не хотят заниматься отходами. Такое отсутствие сотрудничества между местными властями и частным сектором часто служит тормозом на пути рециклизации.

Заинтересованность предпренимателей в сохранении сложившейся ситуации. Производя и продавая бутылки, консервные банки и другие товары одноразового пользования, которые тут же выбрасываются за ненадобностью, можно неограниченно долго получать громадные доходы. Поэтому предприниматели, занятые этим бизнесом, всегда выступали против внедрения любой формы рециклизации.

Скрытые расходы. Поскольку ликвидация мусора оплачивается государством, люди часто не представляют себе ее реальную стоимость. Они не подозревают, что в нее входят затраты на охрану грунтовых вод, очистку опасных мест и мониторинг среды. Без учета этих затрат нынешняя служба ликвидации отходов может показаться дешевой. Обсуждаемые альтернативы, напротив, выглядят дорогими, но в долгосрочной перспективе расходы на них будут меньше.

10.56. Пути решения проблем

Однако препятствия не могут служить оправданием для бездействия. Наоборот, их следует использовать как стимул для творчества. Сотни городов по всей стране так или иначе преодолевают

указанные проблемы и переходят к рециклизации. Ниже приведены некоторые основные пути поиска решений.

Партнерство правительства и бизнеса. В настоящее время растут и множатся фирмы, которые намерены обеспечивать весь цикл рециклизации отходов, а именно их сбор, переработку и производство товаров из полученных материалов. С ними местные власти заключают контракты, в основе которых лежит обязательство фирмы собирать и рециклизировать некоторый минимальный процент отходов, чтобы они не попадали на свалку. Местная администрация в свою очередь предоставляет таким фирмам определенные льготы типа «эксклюзивного» права на сбор отходов и продажу некоторых произведенных из них материалов на территории, находящейся под ее юрисдикцией. Кроме того, местные власти могут выступить в роли оптового покупателя некой доли бумаги, компоста или пластмасс из вторичного сырья. Понятно для чего нужны все эти гарантии? Без них фирма могла бы обанкротиться, и в результате проиграли бы обе стороны.

Сортировка. Отходы можно сортировать либо непосредственно на месте получения (в домах), либо после сбора на особых установках. В первом случае необходимы совместные усилия жителей, однако это способ недорогой, поскольку труд «добровольный». Технически все выглядит так: в определенном месте устанавливаются мусорные контейнеры «кодового» цвета, каждый из которых предназначен для определенного вида отходов пластмассы, металлов, стекла, бумаги, растительного мусора и т.д. Обычный мусоровоз буксирует за собой трейлер с разноцветными мусорными баками, и рабочие загружают в них мусор в соответствии с цветом. Несортированные отходы поступают, как обычно, в мусоровоз.

Другой вариант – это сортировка отходов на специальных установках. Такие станции уже построены и работают. Технологическая линия одной из них показана на рис. 10.26. Оборудование ее весьма дорогостоящее, расходы на эксплуатацию и технический уход также высоки, но выручка от продажи получаемой продукции почти полностью их возмещает. Еще один способ сортировки отходов – вручную на конвейере.

В странах третьего мира многие бедняки зарабатывают на жизнь тем, что копаются в помойках и перепродают «мусор». Однако это свидетельствует лишь об их вопиющей нищете и не может быть рекомендовано как шаг на пути к рециклизации.

Вторичная переработка и доходы. Существует множество способов вторичной переработки различных типов мусора, причем постоянно предлагаются новые. Во многих промышленно развитых странах вторичная переработка отходов промышленности, сельского хозяйства и бытового мусора осуществляется все более эффективно. Перечисленные отходы рассматриваются не просто, как мусор, а как сырье для получения

новой продукции. Достаточно упомянуть производство тротуарной плитки и строительных блоков из золы, образовавшейся при сжигании мусора, получении гаммы химических продуктов при переработки огромного количества автомобильных покрышек, получении металлов, пластмасс, бумаги, древесных композитов и другой полезной продукции.

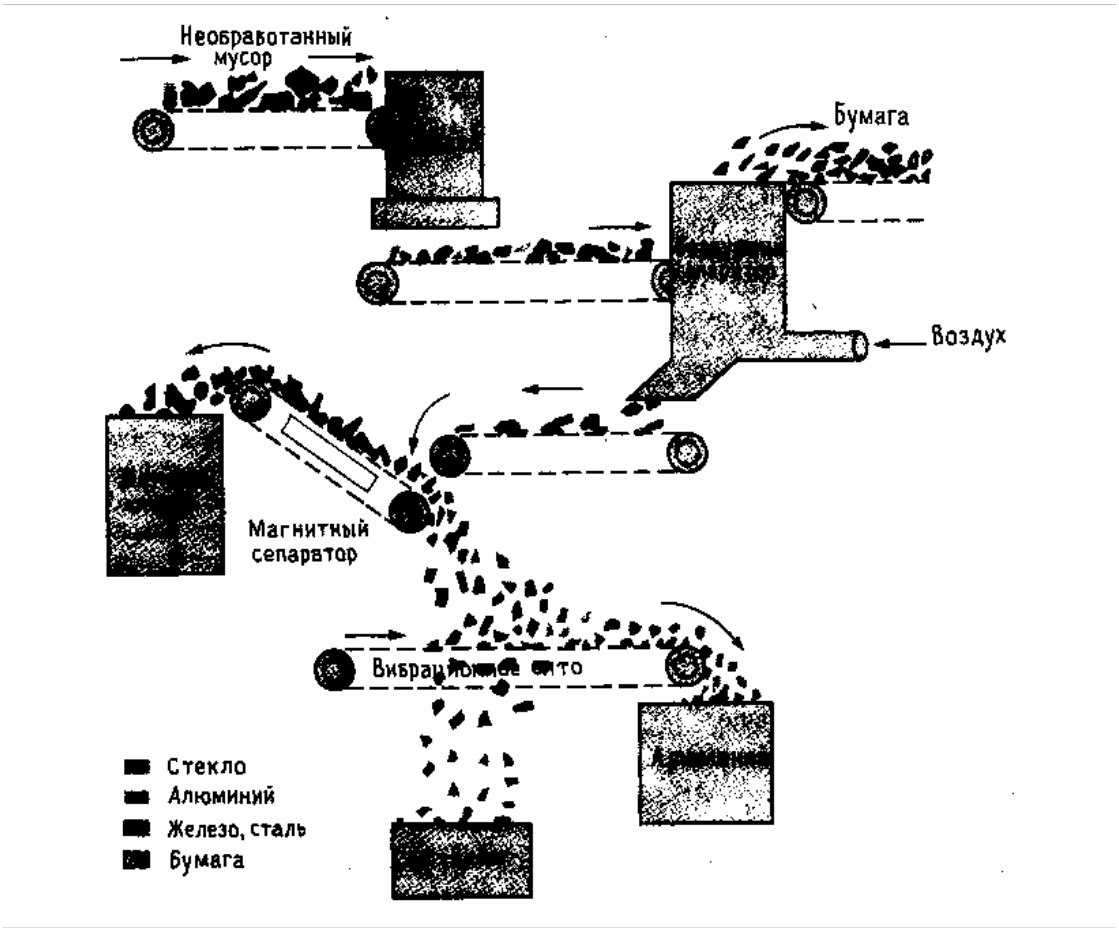


Рис. 10.26. Технологическая линия по сортировке твердых бытовых отходов.

Экономические аспекты вначале, разумеется, не могли быть особо благоприятными, однако, по мере совершенствования технологий переработки сырья, внедрения принципиально новых способов утилизации отходов появляется возможность говорить о том, что некоторые продукты дешевле получать, перерабатывая вторичные отходы, чем из традиционного природного сырья.

Наиболее широко применяемые технологии таковы:

- макулатуру снова измельчают в бумажную массу (пульпу), из которой изготовляют различную бумажную продукцию; ее можно также

перемалывать и продавать как целлюлозную изоляцию, измельчать и компостировать (см. ниже);

- стекло дробят, плавят и делают из него новую тару или дробят и используют вместо гравия или песка при производстве бетона и асфальта;

- пластмассу переплавляют и изготовляют из нее «синтетическую древесину», устойчивую к биодеградации и обладающую громадным потенциалом как материал для различных ограждений, настилов, столбов, перил и других сооружений под открытым небом;

- металлы плавят и перерабатывают в различные детали; получение алюминия из лома позволяет экономить до 90% электроэнергии, необходимой для его выплавления из руды;

- пищевые отходы и садовый мусор компостируют с получением органического удобрения.

- текстиль измельчают и используют для придания прочности макулатурной бумажной продукции;

- старые покрышки переплавляют с изготовлением новых резиновых изделий.

Кроме этих, предложены и внедряются сотни других промышленных методов переработки отходов для изготовления из них ценных продуктов. Таким образом, рециклизация становится все более выгодной, а потенциальная прибыль данной отрасли привлекает к ней все новые и новые фирмы, несмотря на заинтересованность некоторых старых компаний в сохранении современной ситуации.

10.57. Юридические аспекты рециклизации отходов

Местной администрацией принимаются различные юридические акты, обязывающие проводить рециклизацию или по крайней мере стимулирующие ее. К ним можно отнести следующие.

Законы об обязательной рециклизации. Во многих штатах США уже приняты законы, согласно которым каждый округ под угрозой прекращения финансирования из фондов штата обязан к определенному сроку ввести рециклизацию некоторой части отходов на своей территории.

Запрет на захоронение некоторых отходов и их состовляющих. На первом месте в этом списке стоит так называемый садовый мусор; так как объем его велик, его легко отделять от прочих отходов, компостировать до гумуса и использовать в садовом и парковом хозяйстве.

Такой запрет принят на сегодня в ряде штатов США: Висконсине, Иллинойсе, Миннесоте, Нью-Джерси, Пенсильвании и Флориде. Разумеется, повсеместно запрещено захоронение токсичных и взрывоопасных объектов, например автомобильных аккумуляторов.

Требование покупать продукцию вторичной переработки. Администрация штата может просто потребовать, чтобы все подчиненные ей конторы покупали какой-то процент изготовленной из макулатуры бумаги, дорожные службы использовали пластиковые дорожные знаки из вторсырья, а парковые хозяйства – компост, полученный в результате переработки садового мусора.

Предоплата ликвидации. Предоплату за ликвидацию мусора получают, прибавляя к цене каждого продукта в стеклянной, металлической или пластмассовой таре один-два цента. Речь идет о широком диапазоне товаров от напитков и шампуней до консервов для собак. Такая наценка ставит покупателя в известность, что уборка мусора требует затрат. Доходы от нее можно использовать для пропаганды программ рециклизации, финансирования экспериментальных работ в этой области, поощрения особо интересных достижений в ней, для любых других форм ее поддержки и стимулирования.

10.58. Компостирование

Один из способов переработки отходов, популярность которого быстро растет, – *компостирование.* Напомним, что оно заключается в естественном биологическом разложении (перегнивании) органического вещества в присутствии воздуха. Конечный продукт – гумусоподобное вещество, которое можно использовать как органическое удобрение. Этот же метод применяется и для обработки канализационного ила. Для чего ил-сырец отфильтровывают, смешивают с древесной стружкой или другим материалом для улучшения аэрации и складывают в кучи или компостные ряды. В компостных кучах бактерии и другие редуценты и детритофаги перерабатывают органическое вещество в питательную гумусоподобную массу. Патогенные организмы не выдерживают конкуренции, а тепла, выделяемого при дыхании, оказывается достаточно для их гибели. Если компостные куши хорошо аэрировать, при дыхании микроорганизмов будут выделяться только углекислый газ и вода. Неприятные запахи веществ, образующихся при *анаэробном* сбраживании, в этом случае отсутствуют. После 6–8 недель компостирования от древесной стружки отделяют гумус, готовый для применения на полях. Стружку можно использовать вторично.

В случае бытового мусора стружку можно заменить на компоненты мусора. Поскольку бытовые отходы обычно на 60–80% (и более, если включают садовый мусор) состоят из органики (бумага, пищевые отбросы), их также можно компостировать (рис. 10.27). Существует ряд фирм, занимающихся строительством и эксплуатацией предприятий по компостированию отходов, а также продажей необходимого для этого оборудования. Стекло, металлы и пластмассу отделяют либо до, либо после такой переработки, а затем при желании рециклизируют. Кроме

того, можно смешивать канализационный ил с бытовыми отходами и компостировать их синергически. Бумага способствует обезвоживанию канализационного ила и лучшей аэрации смеси, а ил ускоряет процесс разложения. Компост в качестве удобрения находит широкое применение при рекультивации земель, а также в сельском, садовом и парковом хозяйстве.

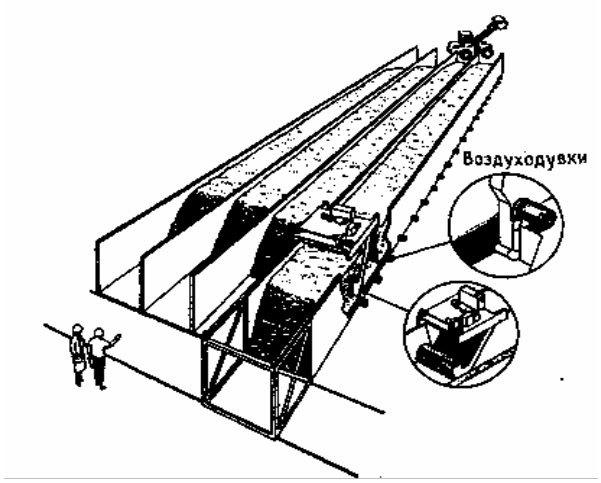


Рис. 10.27. Компостирование мусора. Выдерживание материала во влажном, но хорошо аэрируемом состоянии ведет к разложению бумаги, пищевых отбросов, садового и другого органического мусора до гумусообразной массы, причем этот процесс происходит без неприятного запаха. Здесь приведена «замкнутая динамическая система компостирования», которая позволяет непрерывно подавать отходы с одного конца и выгружать компост с другого. В случае необходимости можно ограничиться и специальным «баком» или ферментером

10.59. Отходы как источник энергии

Содержание в отходах органического вещества позволяет использовать их как топливо, хотя и низкокалорийное. Сжигание отходов для получения энергии – нечто среднее между идеальной рециклизацией и простым их захоронением. Ряд таких установок уже работает, еще больше строится; их задача – производство электроэнергии, которой всегда не хватает. При сжигании отходов во многом облегчаются трудности, связанные с сортировкой, переработкой и продажей вторичной продукции.

Самые ценные материалы, содержащиеся в отходах, – железо и алюминий можно при необходимости извлекать из золы. Прочие

негорючие остатки требуют захоронения, но, так как они составляют лишь 10–20% от исходного объема мусора, могильник будет функционировать в 5–10 раз дольше, чем без предварительного сжигания. Еще важнее то, что зола не подвержена ни разложению, ни усадке, и ее можно использовать в качестве наполнителя при строительстве дорог, насыпей и т.д. Иными словами, проблем с ней почти не возникает.

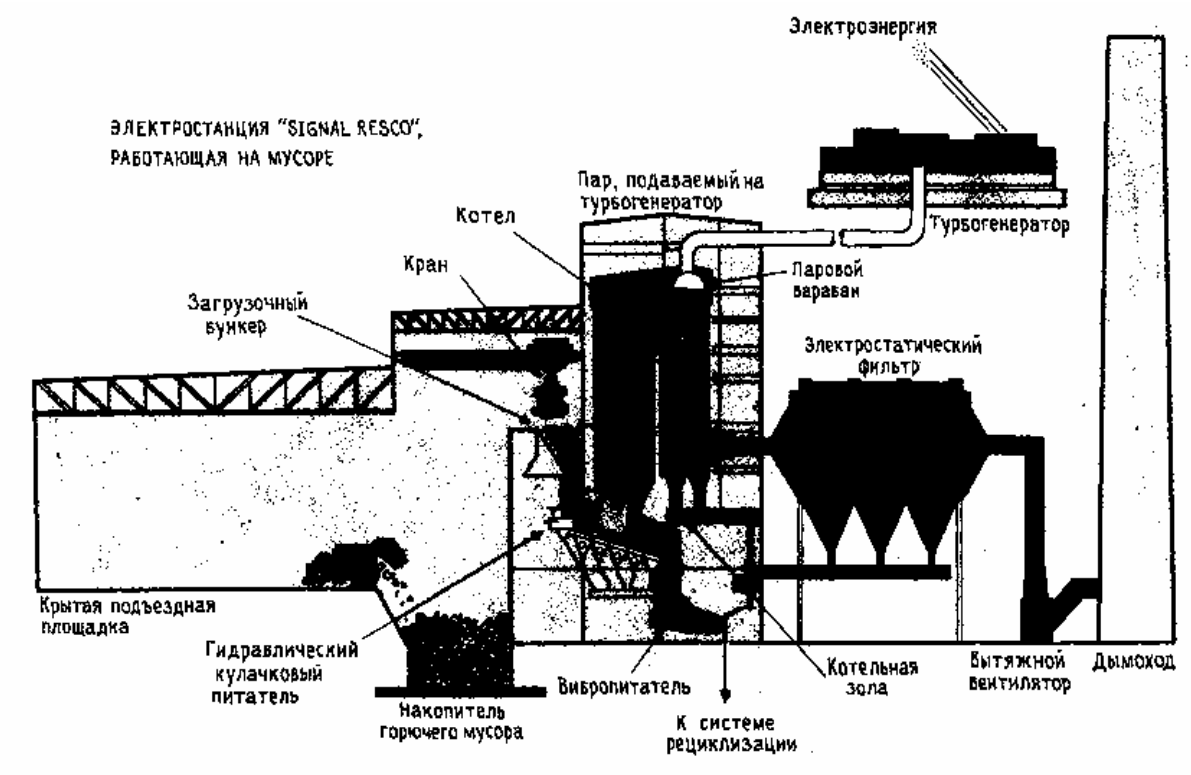


Рис. 10.28. Превращение твердых бытовых отходов в электроэнергию. Эта электростанция мощностью 60 МВт в Балтиморе (Мэриленд) сжигает в день 2000 т несортированных отходов, обеспечивая электроэнергией около 60000 домов. Загрязнители воздуха улавливаются электрофильтрами. Обратите внимание на чистоту и отсутствие дыма. Это хороший пример того, какими могут быть современные «помойные ямы»

На рис. 10.28 показана работающая на мусоре электростанция в Балтиморе (шт. Мэриленд), введенная в эксплуатацию в 1984 г. Здесь можно сжигать 2000 т отходов в сутки. Получаемый пар приводит в действие генератор мощностью 60 тыс. кВт, вырабатывающий электроэнергию, достаточную для 60 тыс. жилых домов. Загрязнение воздуха отработанными газами контролируется электрофильтрами.

Единственным недостатком этого способа можно считать то, что получение из отходов электроэнергии не позволяет их ни рециклизировать, ни компостировать.

10.60. Сокращение объема отходов

Как уже отмечалось, сильно возросшее за последние 30 лет количество отходов – результат прежде всего изменения образа жизни людей, в частности – все большего распространения предметов одноразового пользования. Существенно сократить объем отходов можно за счет увеличения срока службы таких вещей. Реутилизация продукции в ее прежнем виде – самая эффективная форма рециклизации. В первую очередь здесь следует обратить внимание на тару, в которой продаются напитки.

10.61. Бутылки одноразового и многоразового использования

До 1950-х гг. большая часть безалкогольных напитков и пива разливалась местными производителями в бутылки, которые можно было сдавать, получая их залоговую стоимость. Машины развозили бутылки и доставляли назад пустые, их отмывали и снова заполняли. Такая система эффективна лишь в том случае, когда расстояние между производителем и розничным продавцом относительно небольшое. Однако по мере увеличения расстояния транспортные издержки становятся слишком высоки, а потребителю приходится платить не только за напитки, но и за перевозку бутылок. В 1950-х гг. посредники, заинтересованные в расширении рынка сбыта, заметили, что транспортная наценка существенно сократится, если использовать легкую тару, которую можно выбросить и не везти обратно. И такой тип тары появился. Одновременно она оказалась очень выгодной для производителей упаковки, получающих прибыть от каждой выпускаемой ими бутылки или банки.

Благодаря мощной рекламе, направленной против традиционных бутылок и пропагандирующей удобство одноразовой тары как национального достижения, небольшая группа предпринимателей монополизировала рынок, а множество местных производителей напитков и бутылок в 1950–1960-е гг. закрыли свое дело. В то же самое время производство одноразовых бутылок и консервных банок выросло в крупную индустрию с оборотом в миллиарды долларов.

Средний человек выпивает в день около литра жидкости. В США свыше 250 млн. жителей. То, что большая часть этой жидкости разливается в одноразовую тару, которая затем выбрасывается, – пример крайнего безрассудства. Трудно вообразить более дорогостоящий и расточительный способ производства напитков.

Конечно, в таре одноразового пользования они стоят дешевле. Но сама она составляет около 6% всех твердых бытовых отходов, около 50% негорючих отходов и примерно 90% не поддающейся биодеградации части

мусора на обочинах дорог. Осколки этих бутылок могут поранить, не говоря уже о проколотых покрышках машин. Такая тара нежелательна и в экологическом отношении, поскольку производство и материалов, из которых она сделана, и ее самой загрязняет атмосферу. Все это скрытые расходы, не указываемые на товарном чеке. Покупатель платит не только за уборку мусора, но и за лечение порезов, смену автопокрышек, загрязнение воздуха и т. д.

Пытаясь изменить ситуацию, экоактивисты и организации, защищающие интересы потребителя, выступили с так называемыми «бутылочными биллями», призывающими вернуться от одноразовой тары к оборотной. Они предлагают распространить залоговую стоимость на любой вид тары. Поскольку за одноразовую тару она взимается впустую, потребители постепенно изменяют свое отношение к многоразовой таре и отдают ей предпочтение.

«Бутылочные билли» за последние 10 лет рассматривались почти в каждом штате. Всякий раз их встречало яростное сопротивление производителей напитков, тары и других заинтересованных кругов. Причина его ясна – экономические потери. Однако выдвигаемые аргументы формулируются тоньше – сокращение рабочих мест и повышение стоимости товара. Кроме того, утверждается, что количество отходов не уменьшится, так как покупатели просто не будут возвращать бутылки.

В большинстве случаев победа осталась за противниками «бутылочных биллей», организовавшими щедро финансируемые кампании протеста. Однако некоторые штаты (в 1988 г. их было девять) все же приняли эти законы, несмотря на сопротивление промышленной оппозиции. Их опыт показал, что аргументы противников «бутылочных биллей» не подтвердились; рабочих мест стало больше, цены на напитки не выросли, высокий процент бутылок возвращается, а их количество в отходах заметно уменьшилось. В ряде случаев местные пивовары и производители бутылок снова открыли свое дело, что укрепило местную экономику.

Успех законов о таре закрепляется все расширяющейся поддержкой их со стороны населения. Несмотря на выступления промышленников за отмену этих законов, ни один штат, где они были приняты, не пошел на уступки. При дальнейшем росте общественной сознательности уже в ближайшем будущем можно было бы принять общенациональный «бутылочный билль».

10.62. Другие способы

Если вещи не выбрасывать, а реутилизировать, мы добьемся сокращения отходов и экономии ресурсов. В связи с этим отрадно замечать растущую популярность уличных распродаж, «блошиных рынков» и других форм реализации подержанных товаров. Сократить количество

отходов можно также, понизив материалоемкость товаров, уменьшив их размер и повысив срок службы.

Глядя на скапливающийся за день мусор, нельзя не поразиться тому, какой мощный поток материалов всех видов течет в одном направлении - от места добычи ресурсов на свалку. Точно так же, как естественные экосистемы зависят от круговорота биогенов, устойчивое существование технологического общества в конечном счете будет зависеть от нашего умения рециклизировать или реутилизировать не только биогены, но и практически все виды материалов.

10.63. Комплексная программа ликвидации отходов

Важно понять, что делать ставку на один из методов ликвидации отходов необязательно. Можно использовать самые разнообразные сочетания рециклизации, компостирования и снижения объемов мусора. Более того, к рециклизации можно переходить постепенно, пробуя различные ее варианты и одновременно уменьшая количество захороненного мусора. Такая система одновременного использования различных методов носит название комплексной программы ликвидации отходов. Учет интересов всех сторон, имеющих отношение к данной проблеме, естественно, требует опытных менеджеров.

Рециклизация твердых бытовых отходов занимает одно из первых мест в списке важнейших государственных дел. Федеральное агентство охраны окружающей среды США (EPA) рассматривает ее как основу всей своей будущей политики. Однако на деле EPA не поспевает за фактическим решением этой проблемы на местном уровне. Города и округа вынуждены заниматься рециклизацией в силу самих законов экономики.

В 1980 г. стоимость захоронения одной тонны твердых отходов на северо-востоке США составляла 3 доллара. Сейчас, спустя 8 лет, она поднялась до 65 долларов и продолжает расти, так как новые требования, предъявляемые на федеральном и местном уровнях к захоронению отходов, становятся все строже. Сжигание, долгое время считавшееся альтернативой захоронению, еще дороже – свыше 100 долларов за тонну. Многие экологические проблемы, связанные, в частности, с выбросами в атмосферу пепла и кислотных газов, ограничили применение этого способа в крупных городах по всей территории США. В их числе Остин (Техас), Сан-Диего и Лос-Анджелес (Калифорния), Филадельфия (Пенсильвания), Лоуэлл и Холиок (Массачусетс), Чаттануга (Теннесси), Сиэтл (Вашингтон), Портленд (Орегон), Гейнсвилл (Флорида).

В то же самое время стоимость рециклизации снижается. Это происходит по двум причинам. Во-первых, поскольку все больше людей предпочитают рециклизацию, стоимость сбора отходов в перерасчете на

тонну падает: один и тот же мусоровоз забирает за одну ездку отходы большего числа домов. Законы об обязательной рециклизации приняты уже в нескольких штатах (Нью-Джерси, Род-Айленд, Коннектикут), а на местном уровне (округа Ислип в шт. Нью-Йорк, Перкаси в шт. Пенсильвания, Вудбери в шт. Нью-Джерси) города регулярно рециклизируют от 20 до 50% твердых бытовых отходов.

Во-вторых, получаемое вторичное сырье привлекает промышленников, что в отличие от сжигания или захоронения отходов выгодно для местной экономики.

Термин «добавленная стоимость» объясняет, каким образом местная экономика извлекает выгоду из рециклизации. Если город А продает 1 т стекла, использованного его жителями, он может получить за нее от 30 до 70 долларов в зависимости от чистоты утиля и близости стеклоплавильного цеха. Но если в городе А есть небольшой стекольный завод, это стекло принесет уже от 4000 до 7000 долларов за тонну в зависимости от ценности производимой из него продукции. Это и называется добавленной стоимостью: возросшая цена отражает труд рабочих, их профессионализм и налог на производство, способствующие развитию местной экономики.

Старые покрышки – сравнительно небольшой по объему, но неприятный вид отходов. Средний американец выбрасывает их ежегодно около 20 фунтов. По сегодняшним ценам стоимость ликвидации этой резины – около 10 долларов за фунт. Город размером с Ньюарк (Нью-Джерси), Толедо (Огайо) или Тусон (Аризона) платит около 700 тыс. долларов в год только за то, чтобы закопать старые покрышки. Это если свалки их принимают. Однако многие их них не хотят иметь дела с покрышками. У тех есть неприятное свойство через несколько лет вновь оказываться на поверхности почвы. В некоторых штатах, например в Миннесоте, захоронение покрышек запрещено. Их можно размельчить и сжечь. Но при сегодняшних ценах на нефть это принесет около одного цента за фунт топлива. Тонко размельченные покрышки можно добавлять в дорожный асфальт и получать на несколько центов больше. Но выгоднее всего превратить использованную покрышку в ценный конечный продукт.

Фред Старк – инженер-химик, президент фирмы "Rubber Research Elastomerics" (RRE) со штаб-квартирой в Миннеаполисе. Жидкий полимер, запатентованный Старком, при добавлении к измельченным покрышкам дает материал, названный им Тайрсайкл (Tire Cycle), способный конкурировать как с исходной резиной, так и с пластмассами.

Первый завод RRE открылся в городе Баббитт на севере Миннесоты в марте 1987 г. Главные заказчики – фирмы по литью термопластов. Добавив две части *Тайрсайкла* к одной части полипропилена, можно «улучшить основные свойства, сохранив высокие литьевые качества пластмасс». Так считает главный инженер завода Джон Старк III. Для этих

целей *Тайрсайкл* продается по 50 долларов за фунт, а сам композит резина/пластмасса используется для изготовления автомобильных дверей.

Экономика Баббитта окрепла еще более, когда туда перенес свое дело промышленник из Огайо, пожелавший развернуть производство непосредственно рядом с поставщиком сырья. Фирма "Whirlair Rubber Products", используя Тайрсайкл, изготовляет покрытия для полов жилых и служебных помещений.

Представьте, что город типа Толедо, Ньюарка или Тусона построил завод, как в Баббитте, и местные компании используют поставляемый им материал для производства готовой продукции. Местные власти могли бы сэкономить большую часть от тех 700 тыс. долларов, которые они платят ежегодно за ликвидацию покрышек, добавив несколько миллионов долларов к местному бюджету благодаря новой ориентированной в основном на экспорт деятельности.

Ключом успеха Тайрсайкла служат два обстоятельства. Во-первых, компания получила финансовую поддержку и от округа, и от штата. Во-вторых, товар, который она производит, – резиновая крошка, – стоит 35 долларов за фунт, а первичная резина – 65 долларов.

Таким образом, компания помогает городу решить проблему ликвидации отходов, одновременно внося свой вклад в местную экономику.

Что касается производства пластмасс, металла, стекла, бумаги, то фирмы вкладывают деньги в рециклизацию, поскольку использование вторсырья дешевле, сокращает энергозатраты, снижает потребность в очистном оборудовании и повышает срок службы оборудования. И наконец, озабоченность населения проблемой твердых бытовых отходов помогает рекламировать и реализовать продукцию из вторсырья.

Все это говорит о том, что возможности извлечения прибыли из твердых бытовых отходов неисчерпаемы.

10.64. Отходы мясоперерабатывающих предприятий и их реализация

Известно, что после забоя сельскохозяйственных животных и последующего приготовления мясных изделий, остаются, так называемые технические фабрикаты, такие, как кровь, кости, рога, копыта и др., которые, несмотря на содержание в них белка и других ценных продуктов, в большинстве случаев выбрасываются на свалки, отравляя тем самым окружающую среду.

Наиболее простой способ переработки таких отходов – это их сочетанный кислотно-ферментативный гидролиз, в результате которого могут быть получены продукты для пищевых, кормовых, микробиологических и даже лекарственных целей. В качестве простого

примера реализации метода гидролиза может служить приготовление пептона.

Пептоны, представляющие собой смесь свободных аминокислот и некоторого количества продуктов расщепления белка – пептидов, широко используются в микробиологии и биотехнологии в качестве питательных компонентов сред для культивирования микроорганизмов. Биологическая ценность пептона определяется в основном сбалансированным аминокислотным составом и способом получения из доступного и дешевого сырья. Для оптимального получения такого продукта необходимо знание кинетических закономерностей протекания процесса в целом и на отдельных стадиях. Как уже неоднократно говорилось ранее, кинетические характеристики любого биохимического процесса позволяют количественно оценить этот процесс и тем самым приблизиться не только к пониманию его механизма, но и к сравнению эффективности исследуемого процесса с другими процессами ферментативного гидролиза.

Чаще всего при изучении кинетики гидролиза сложных белковых субстратов в качестве основной функции отклика используют интегральные показатели количества концевых групп олигопептидов, освобождающихся в ходе реакции. Существенно меньшее внимание исследователей уделялось определению накопления свободных аминокислот в ходе ферментативного гидролиза, хотя, на наш взгляд, именно такие кинетические характеристики приближают исследователей к более близкому пониманию механизма исследуемого процесса. Зная закономерности накопления свободных аминокислот в процессе ферментативного гидролиза, можно попытаться сравнить их с особенностями накопления азота аминогрупп и посмотреть, имеется ли между ними определенное сходство и различие.

В качестве объекта исследования в данном случае была взята обезжиренная водная суспензия смеси белков мышечной и костной тканей свиней, так называемый мясокостный фарш, содержащий 18 г/л минеральных компонентов и 35 г/л белка, характеризующийся следующим аминокислотным составом (в г/100 г белка): Асп - 8.5; Тре - 1.8; Сер - 3.3; Глу - 15.6; Про - 1.7; Гли - 15.5; Ала - 11.1; Цис - 0.8; Вал -5.2; Мет - 0.4; Иле - 3.0; Лей - 6.2; Тир - 2.1; Фен -3.8; Гис - 2.8; Лиз - 6.1; Арг - 4.1.

В качестве ферментного препарата для гидролиза использовали активированный ферментный комплекс суспензии клеток поджелудочной железы свиней (СПЖ) с протеолитической активностью 9000 ед/г

В экспериментах по определению кинетических параметров гидролиза процесс проводили при соотношении фермент-субстрат 1 : 15 (по белку) при температурах 40–55°С, используя для контроля процесса известные методики.

10.65. Активация ферментного комплекса из поджелудочной железы убойных животных

Хорошо известна эффективность использования ферментного экстракта из поджелудочной железы свиней для гидролиза боенской крови. Этот экстракт было решено использовать и для данного процесса. Однако относительно низкая активность ферментного комплекса из поджелудочной железы убойных животных (ФПЖ) не давала возможность за короткое время добиться высокой степени расщепления белка. В связи с этим на первоначальном этапе исследований была предпринята попытка увеличить протеолитическую активность ФПК за счет подбора условий разбавления суспензии и инкубирования ее при различных температурах, о чем подробно изложено в работе.

Таблица 10.5

Значение констант активации и энергии активации ФПЖ свиней и к.р.с.

Вид	Температура, °С	Активация ферментного комплекса СПЖ		Инактивация ферментного комплекса СПЖ	
		Константа активации, $K_a x10^4$, c^{-1}	E_a, кДж/моль	Константа инактивации, $K_{ин} x 10^4$, c^{-1}	$E_a^{ин}$ кДж/моль
ФПЖ свиней	45	4,57 ±0,13	55,15 ±0,86	2,40 ± 0,03	60,24 ± 0,32
	50	5,63 ±0,1 8		3,27 ± 0,05	
	55	8,65 ± 0,22		4,97 ± 0,07	
ФПЖ к.р.с.	45	9,98 ± 0,93	8 1,39 ±0,85	1,02 ±0,02	81,21 ±0,45
	50	15,28±0,92		1,55 ±0,02	
	55	25,58± 0,77		2,60 ± 0,05	

Изучение термостабильности и протеолитической активности суспензии ФПЖ крупного рогатого скота (к.р.с.) и свиней в буферных растворах позволило рассчитать кинетические константы стабильности K_a

и $К_{ин}$, а также определить энергии активации $Е_а$ и $Е_а^{ин.}$ процессов активации и инактивации ФПЖ, представленные в табл. 10.5.

В результате проделанной работы был найден способ активации ферментного комплекса ФПЖ, заключающийся в получении суспензии поджелудочной железы с гидромодулем 0,5 (соотношением ФПЖ и жидкостью) и последующем термостатировании ФПЖ к.р.с. и свиней при 45°С в течение 1,5 ч и при 50 °С в течение 2 ч соответственно. ФПЖ к.р.с. и свиней имели pH-оптимум 7,0. Активированные ферментные препараты ФПЖ к.р.с. и свиней обладали протеолитической активностью 6000 и 9000 ПЕ/г соответственно, что в 1,5 – 2,0 раза превышало комплекс ФПЖ, полученный традиционным методом. Причем, как видно из полученных данных, активность ФПЖ свиней в 1,5 раза превышала активность ФПЖ к.р.с.; поэтому в дальнейшей работе был использован именно этот ферментный комплекс.

С целью изучения эффективности использования ферментных препаратов ФПЖ был проведен гидролиз 3% раствора сухого белкового экстракта мясокостного фарша панкреатином, а также неактивированным и активированным ФПС свиней. Как показали исследования, применение ФПК свиней обеспечивало выход свободных аминокислот из мясокостного фарша на уровне 45–50%, что примерно в 1,3–1,5 раза выше, чем использование панкреатина.

10.66. Гидролиз мясокостного фарша.

Для описания кинетических закономерностей протекания ферментативного гидролиза была использована кинетическая модель, предусматривающая наличие «быстрой» и «медленной» стадий процесса. Согласно этой модели, как уже отмечалось ранее, гидролиз белка рассматривают как сумму субстратов, скорость распада каждого из которых определяется его концентрацией и кинетическими характеристиками. В этом случае кинетические константы можно определить по уравнениям, вывод которых получается из преобразования уравнения (10.1). В этом случае в момент времени t (или τ) скорость гидролиза V, пептидных связей, обладающих близкой реакционной способностью, можно определить по уравнениям (10.1 – 10.3):

$$V_t = V_{мах} e^{-Kt} \quad , \qquad (10.1)$$

где V_{max} – максимальная скорость гидролиза, $г \cdot л^{-1} \cdot с^{-1}$; K_i – константа эффективности протекания процесса гидролиза пептидных связей i-того типа, $с^{-1}$, причем V_t будем условно считать равной P/t.

Подобное допущение можно считать обусловленным для гидролиза смеси белков смесью ферментов, каковым является ФПК. В случае, когда

$t \to 0$, очевидно $(P/t) \to V_o$, но так, как V_o в условиях многокомпонентности белков и ферментов в случае нашей модели определить практически весьма сложно и, как уже говорилось ранее, при гидролизе белков реакция идет по псевдонулевому порядку, то с известной долей вероятности в данном случае можно считать, что $V_o \approx V_{мах}^{эф.}$ Тогда пологарифмировав зависимость (10.1) получим

$$\ln V_\tau = \ln (P/t) = \ln V_{мах} - kt. \qquad (10.2)$$

На основание уравнений (10.1) и (10.2) легко определить эффективную константу Мехаэлиса $К_М$ по известному методу Холдейна.

$$К_М = V_{мах}/К_i \quad . \qquad (10.3)$$

На рис. 10.29 представлена экспериментальная зависимость накопления продуктов гидролиза суспензии мясокостного фарша от времени, выраженная в количестве свободных концевых групп продуктов гидролиза, освобождающихся в единицу времени. В результате линеаризации кинетических кривых гидролиза в координатах $P/t = f(t)$, условно считая, что гидролиз белков протекает в две стадии: «быструю», когда в белке расщепляются легко гидролизующиеся пептидные связи и «медленную», когда происходит гидролиз образовавшихся олигопептидов до пептидов меньшего размера и свободных аминокислот, удалось определить эффективные максимальные скорости гидролиза $V_{мах}$ и другие псевдокинетические константы (см. табл. 10.6). Анализируя полученные данные (табл.10.6) можно заметить, что значения энергий активаций на «быстрой» и «медленной» стадиях весьма близки между собой.

В табл. 10.6 приведены кинетические константы, полученные при анализе «быстрой» стадии процесса при температуре, наиболее оптимальной для практического проведения процесса гидролиза. Подобным образом можно вычислить кинетические константы для любой температуры до тех пор, пока процесс подчиняется уравнению Аррениуса.

На рис.10.30(а-е) представлены характерные зависимости накопления некоторых аминокислот в ходе ферментативного гидролиза мясокостного фарша при различных температурах. Подобный вид зависимостей был типичным и для других исследованных аминокислот. Аналогично приемам, используемым для определения общих констант расщепления белка, кинетические кривые выхода свободных аминокислот также удалось условно апроксимировать двумя прямолинейными участками, характеризующими «быструю» и «медленную» стадии процесса.

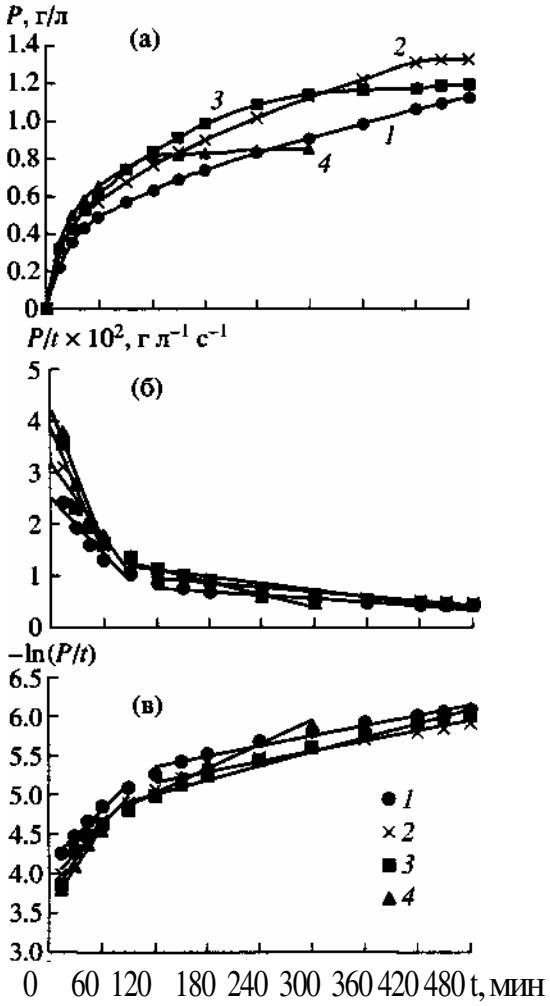


Рис. 10.29. Зависимость скорости накопления продуктов гидролиза: а – суспензия смеси белков мышечной и костной тканей в присутствии ферментного комплекса СПЖ свиней при различных температурах: 1 – 40; 2 – 45; 3 – 50; 4 – 55°С; б – графическое определение максимальных кажущихся скоростей: в – константы интенсивности процесса ферментативного гидролиза

В качестве примера в табл. 10.7 приведены кинетические константы, полученные при анализе «быстрой» стадии процесса при температуре, наиболее оптимальной для практического проведения процесса гидролиза. Подобным образом можно вычислить кинетические константы для любой температуры до тех пор, пока процесс подчиняется уравнению Аррениуса

Из полученных данных, было установлено, что наиболее интенсивно происходило накопление аргинина, лизина, лейцина и тирозина, о чем свидетельствовали достаточно высокие значения $V_{мах}$ для этих аминокислот как на «быстрой», так и на «медленной» стадиях процесса.

Несколько менее интенсивно происходило высвобождение фенилаланина, гистидина и валина. Для гистидина, аргинина и тирозина выход после 7 ч гидролиза при температуре 45°С составил 48 – 72%, а для

валина, лизина, лейцина и фенилаланина 24 – 38%. Аланин, серин и аспарагиновая кислоты образовывались в процессе гидролиза преимущественно на «быстрой» стадии. Выход аспарагиновой кислоты и глицина вообще не превышал 2%.

Таблица 10.6

Макрокинетические характеристики процесса гидролиза белков суспензии мясокостного фарша ФПЖ свиней

Макрокинетические характеристики процесса	Температура, °С			
	40	45	50	55
«Быстрая» стадия				
$V_{мах} \cdot 10^4$, г·л$^{-1}$с$^{-1}$ $K_i \cdot 10^4$, с$^{-1}$ $K_м$, г·л$^{-1}$	2,53 ±0,17 1,87 ±0,03 1,36 ±0,11	3,20 ± 0,28 2,02 ± 0,07 1,59 ±0,10	3,87 ± 0,38 2,75 ±0,17 1,41 ±0,12	4,25 ± 0,20 2,75 ± 0,03 1,54±0,11
E_a, кДж/моль	29,83 ±0,81			
«Медленная» стадия				
$V_{мах} \cdot 10^4$, г·л$^{-1}$.с$^{-1}$ $K_i \cdot 10^4$, с$^{-1}$ $K_м$, г·л$^{-1}$	0,93 ± 0,08 0,35 ± 0,02 2,67 ±0,1 8	1,1 ±0,08 0,37 ± 0,02 3,09 ± 0,20	1,38 ±0,10 0,50 ± 0,02 2,77 ± 0,20	1,63 ±0,13 0,85 ± 0,03 1,92 ±0,13
E_a, кДж/моль	32,20 ± 0,04			

Анализируя все вышесказанное, можно предположить, что ферменты поджелудочной железы гидролизовали в первую очередь актомиозин, миозин, миоглобин и затем уже коллаген и родственные ему белки, о чем свидетельствует низкое содержание в гидролизатах глицина, аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, серина, а также пролина, т.е. тех аминокислот, которые преимущественно содержатся в коллагене.

Энергия активации для валина, треонина, тирозина, аргинина, гистидина и фенилаланина также оказалась весьма велика (см. табл. 10.7), что может свидетельствовать о наличии в исследуемом ФПЖ протеаз, которые расщепляют большее количество пептидных связей, образованных указанными аминокислотами, и требуют для этого больших энергетических затрат.

При сравнении энергий активации освобождения аминокислот в ходе «быстрой» стадии процесса с интегральной энергией активации всего процесса в целом (табл. 10.6 и 10.7) можно видеть, что энергия активации для свободных аминокислот в 2–3 раза выше, чем энергия активации для всего процесса в целом.

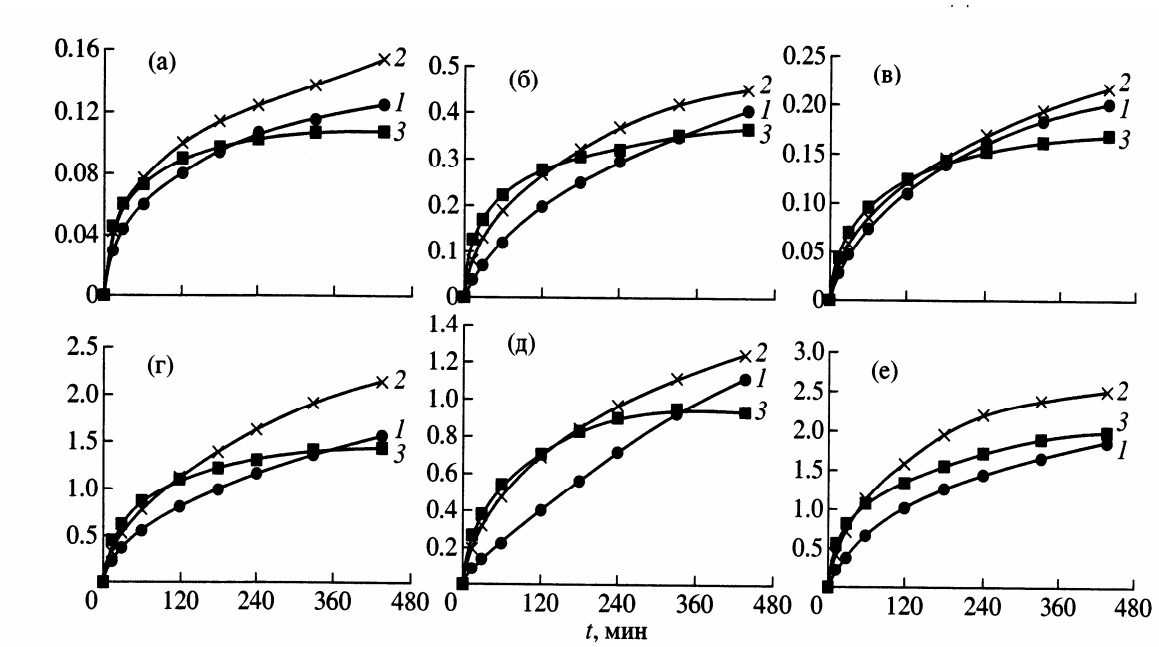


Рис. 10.30. Зависимость накопления аминокислот (с, г/100 г белка): а – аспарагиновая; б – треонин; в – глицин; г – лизин, д – валин; е – аргинин в процессе ферментативного гидролиза при различных температурах. 1 – 40, 2 – 45, 3 – 50^0

Таблица 10.7

Макрокинетические константы, энергия активации и выход аминокислот в процессе ферментативного гидролиза при 45°С на «быстрой» стадии

Амино-кислота	V_{max}x10^4, г/100 г бел-ка, $с^{-1}$	$K_i \cdot 10^4$, $с^{-1}$	$K_м$, г/100г белка	$E_а$, кДж/моль	Выход, %
Незаменимые аминокислоты:					
ИЛЕ	1,39 ±0,02	1,62 ±0,02	0,86±0,07	63,43 ± 0,33	21,9
ЛЕЙ	4,63 ±0,1 5	1,40 ±0,05	3,31±0,27	6 1,25 ±0,23	35,7
ЛИЗ	4,05 ±0,11	1,88 ±0,02	2,15±0,18	54,58 ± 0,01	34,9
МЕТ	1,06 ±0,12	3,00 ± 0,33	0,35±0,03	62,21 ±3,51	-
ФЕН	2,74 ±0,01	0,98 ± 0,02	2,79±0,21	69,68 ± 0,50	37,9
ТИР+ФЕН	3,61 ±0,17	1,22 ±0,07	2,97±0,22	83,78 ± 7,73	77,4
ТРЕ	0,95 ± 0,02	1,83 ±0,02	0,52±0,04	106,12 ± 1,46	25,0
ВАЛ	2,30 ± 0,02	1,67 ±0,02	1,38±0,11	106,72 ±6,25	24,2
Заменимые аминокислоты:					
АЛА	1,76 ±0,09	2,60 ± 0,03	0,68±0,05	52,88 ± 0,04	6,6
АРГ	5,01 ±0,06	1,37 ±0,02	3,66±0,29	81,19±2,31	62,0
АСП	0,49 ± 0,02	2,67 ± 0,03	0,19±0,01	38,84 ± 2,47	1,8
ГИС	2,82 ± 0,09	1,28 ±0,05	2,20±0,18	78,55 ± 2,35	47,9
ГЛИ	0,41 ±0,02	1,60 ±0,02	0,26±0,02	38,69 ±0,02	1,4
ГЛУ	1,50 ±0,01	1,75 ±0,02	0,86±0,06	67,60 ± 3,47	5,8
СЕР	1,21 ±0,03	2,38 ± 0,02	0,51±0,04	50,06 ± 0,06	14,6

Таблица 10.8

Физико-химические показатели опытно-промышленных серий ферментативных гидролизатов

Наименование показателя	Серия № Кс-1	Серия № Кс-2	Серия № КсМ-1	Серия № КсМ-2	Серия №КсМКр-1	Серия № КсМКр-2	Пептон по ГОСТ 13805-76
Внешний вид и цвет	Порошок однородный, светло-желтого цвета, гигроскопичный		Порошок однородный, светло-желтого цвета, гигроскопичный		Порошок однородный, светло-желтого цвета, гигроскопичный		Порошок аморфный однородный.
Запах	Характерный без гнилостного						характерный
Массовая доля влаги, %	7,0	6,8	6,7	6,9	7,5	7,2	Не более 7
Массовая доля белка, %	77,4	77,6	82,4	82,1	81,3	82,0	Не нормируется
Массовая доля жира, %	11,6	11,5	7,6	7,8	8,5	8,3	Не нормируется
Массовая доля золы, %	4,0	4,1	3,3	3,2	2,7	2,5	Не более 5
Водородный показатель, pH 1% раствора	5,72	5,75	5,68	5,71	5,83	5,81	6,5–7,0
Массовая доля азота аминогрупп, %	2,9	2,9	4,3	4,3	5,5	5,4	Не менее 3
Массовая доля общего азота, %	12,4	12,4	13,2	13,1	13,0	13,1	14–15
Степень конверсии белка, %	23,4	23,4	32,6	32,8	42,3	41,2	Не нормируется

Это вполне объяснимо, так как в полученных гидролизатах содержалось 15–20% свободных аминокислот, тогда как остальная часть

приходилась на олигопептиды различной молекулярной массы, для получения которых, вероятно, должно тратиться меньшее количество энергии, чем для получения свободных аминокислот.

Таблица 10.9

Содержание свободных аминокислот (св.) и полный аминокислотный состав (полн.) опытно-промышленных образцов гидролизатов, г/100 г белка*}

Аминокислота	Серия Кс-2		Серия КсМ-1		Серия КсМКр-2	
	полн.	св.	полн.	св.	полн.	св.
Незаменимые, в т.ч.	8,46	7,62	21,4	9,33	36,38	13,82
ИЛЕ	0,6	0,4	1,9	0,8	1,5	0,5
ЛЕЙ	1,4	1,4	4,3	2,1	8,3	2,8
ЛИЗ	2,1	2,1	4,3	2,1	7,7	2,4
МЕТ	0,2	0,2	0,4	0,3	1,7	1,7
ЦИС**	0,06	0,02	0,2	0,03	0,10	0,07
ФЕН	1,0	1,0	2,6	0,8	4,9	1,7
ТИР*	0,4	0,4	13	0,5	2,7	0,9
ТРЕ	1,0	0,6	2,8	0,9	3,2	1,0
ТРП	0	0	0	0	0,28	0,05
ВАЛ	1,7	1,5	3,6	1,8	6,0	2,7
Заменимые, в т.ч.	84,8	10,2	70,2	15,5	55,3	18,6
АЛА	9,6	1,1	7,8	1,6	6,8	2,3
АРГ	2,0	1,8	6,4	2,5	4,0	1,3
АСП	4,4	0,5	6,5	2,1	9,6	3,4
ГИС	1,0	1,0	2,5	1,3	4,9	1,8
ГЛИ	42,3	1,4	23,8	2,4	8,4	3,1
ГЛУ	11,8	3,3	10,5	3,5	14,6	4,5
ПРО	12,2	0,5	9,5	0,5	3,3	0,8
СЕР	1,5	0,6	3,2	1,6	3,7	1,4
Итого	93,2	17,9	91,6	24,8	91,7	32,5
E/N	0,10	0,75	0,30	0,60	0,66	0,74

** – Цистин, являясь полунезаменимой аминокислотой, обычно учитывается в сумме с метионином.

* – Тирозин, являясь полунезаменимой аминокислотой, обычно учитывается в сумме с фенилаланином.

На основании выше полученных закономерностей установлено, что эффективное время гидролиза составляло 2,5–3 ч при температуре проведения процесса 40–45°С.

Физико-химические характеристики и аминокислотный состав различных гидролизатов приведены в табл. 10.8 и 10.9.

При вышеназванных показателях:

1. глубина гидролиза мясокостного фарша составляла 35–40%;
2. содержание свободных аминокислот в высушенном гидролизате было не менее 25–30%;
3. содержание общего азота не менее 14%;
4. азота аминогрупп аминокислот и низших пептидов 4–6%;
5. жира не более 3%;
6. золы не более 2–3%;
7. влаги не более 7%.

Как показали биологические испытания на ряде микроорганизмов, полученный гидролизат аналогичен лучшим образцам пептона, выпускаемого в нашей стране и за рубежом.

10.67. Технологическая схема получения пептона

На основании проведенных исследований была разработана технологическая схема получения ферментативных гидролизатов из мясокостного фарша, приведенная на рис. 10.31.

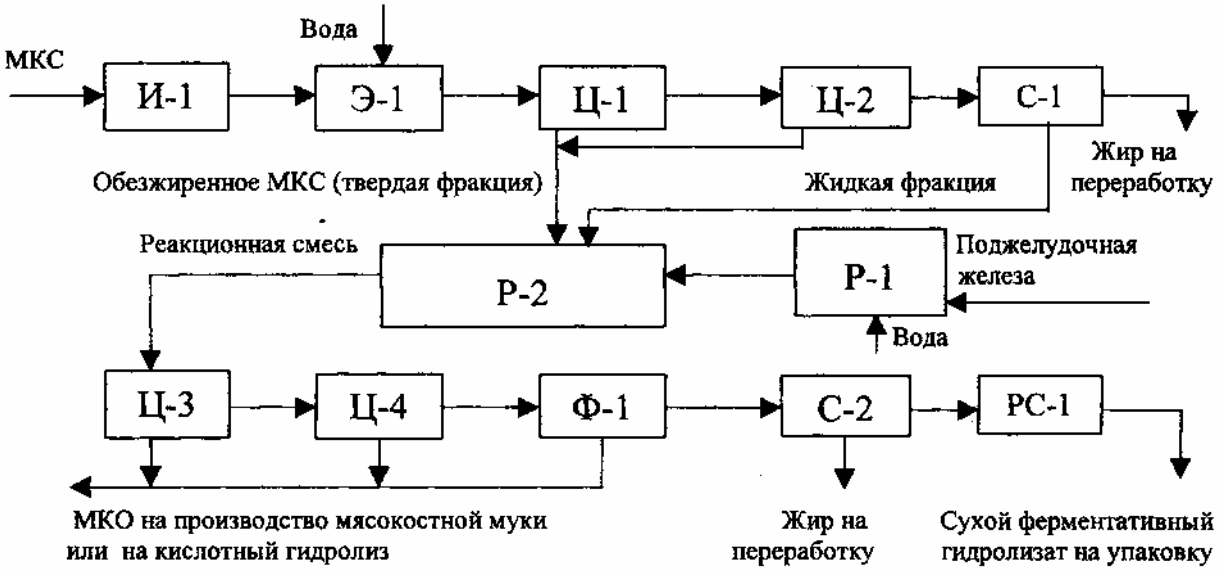


Рис.10.31. Технологическая схема производства ферментативных гидролизатов

Мясокостное сырье (МКС) измельчали на силовом измельчителе И-1 и обезжиривали в виброэкстракторе Э-1, промывая циркулирующей водой при 100°С. Полученную суспензию направляли на проточную

центрифугу Ц-1, где происходило разделение смеси на жидкую и твердую фракции. Жидкую фракцию с помощью центробежных насосных установок последовательно обезжиривали в шнековой центрифуге Ц-2 и сепараторе С-1. Обезжиренное МКС направляли в горизонтальный вакуумный котел Р-2, где смешивали с жидкой фракцией. Смесь нагревали при 130°С в течение 2 ч. Суспензию обезжиренного МКС охлаждали до 45°С, вносили ферментный препарат из реактора Р-1 и проводили гидролиз в котле Р-2 в течение 4 ч при 45°С и перемешивании. По окончании гидролиза реакционную смесь инактивировали нагреванием до 120°С, центрифугировали на проточно-разделительной центрифуге Ц-3 и шнековой центрифуге Ц-4 и отфильтровывали реакционную массу на рамном фильтр-прессе Ф-1 через пористый картон. Фильтрат направляли на сепаратор С-2 для удаления остатков жира, а после этого высушивали на распылительной сушильной установке РС-1 при следующих параметрах: температура на входе 140°С, на выходе 90°С.

По предлагаемой схеме были получены опытно-промышленные партии гидролизатов из следующего сырья:

Серии Кс-1 и Кс-2, включающие кость 1-й и 2-й категории.

Серии КсМ-1 и КсМ-2, включающие кость и субпродукты.

Серии КсМКр-1 и КсМКр-2, включающие мясокостное сырье и боенскую кровь.

Основные свойства полученных гидролизатов приведены в табл. 10.8 и 10.9. Наиболее эффективные образцы, существенно превосходящие образцы пептона, были получены из последних двух серий, так как белки крови существенно обогащали аминокислотный состав гидролизатов, в частности такой незаменимой аминокислотой как триптофан.

10.68. Переработка бумаги и древесины

В последнее время различные «белые гнили», смесь грибных ферментов, содержащих целлюлазы и лаказы, стали находить применение в бумажной и деревообрабатывающей промышленности для разрушения лигнинов. Возможности использования принципов биотехнологии для эффективной переработки бумажных отходов и древесины были показаны в разделе 6.8.

Следует отметить, что несмотря на длительный исторический период использования древесины, до настоящего времени не разработаны полностью универсальные схемы переработки отходов производства бумаги и древесины. В этой области предстят дальнейшие исследования и разработки.

Заключение

В заключение авторы хотели бы отметить, что основное содержание книги затрагивает экологические основы биотехнологических процессов переработки сложного многокомпонентного сельскохозяйственного сырья и древесины. Учебник разработан на базе учебно-методических пособий издательства МГУлеса «Экологические основы биотехнологических производств» и «Экологические основы производств. Взаимосвязь экологии, химии и биотехнологии», а также научно-технической литературы и опубликованных результатов научных исследований самих авторов. Он предназначен для студентов очного, заочного и дистанционного обучения по всем техническим специальностям. С другой стороны, книга может быть также использована студентами и аспирантами, занимающимися углубленными вопросами экологии, где необходимо знать основы экологической химии и современной биотехнологии.

Библиографический список

1. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Экологические основы биотехнологических производств. – М.: МГУ леса, 2002.– 400 с.
2. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Экологические основы производств. Взаимосвязь экологии, химии и биотехнологии – М.: МГУ леса, 2003.– 368 с.
3. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Биологически активные соединения из природных объектов. Свойства и структурно-функциональные взаимосвязи. – М.: МГУ леса, 2003. – 480 с.
4. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердутина А.В. Основы биохимической переработки животного и комбинированного сырья. – М.: Изд-во ВНИИмясной промышленности , 2003.– 116 с.
5. Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Методы практической биотехнологии. – М.: Изд-во ВНИИмясной промышленности , 2002.– 408 с.
6. Биотехнология //Под ред. А.А. Баева. – М.: Наука, 1984. – 308 с.
7. Биотехнология. Принципы и применение //Под ред. И. Хигинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988. – 480 с.
8. Квеситадзе Г.И., Безбородов А.М. Введение в биотехнологию. – М.: Наука, 2002. – 284 с.
9. Шустов С.Б., Шустова Л.В. Химические основы экологии. – М.: Высшая школа, 1990. – 295 с.
10. Экологическая химия. Основы и концепции // Под редакцией Ф. Корте. – М.: Мир, 1996. – 396 с.
11. П. Ревель, Ч. Ревель. Среда нашего обитания. – М.: Мир, 1994. Кн. I. – 340 с., кн. 2. – 296 с., кн. 3. – 291 с., кн. 4. – 191 с.
12. Б. Небел. Наука об окружающей среде. Как устроен мир. – М.: Мир, 1993. – Т. I. – 420 с., т. 2. – 328 с.
13. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. – М.: МГУ, 2001. – 254 с.
14. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И.. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн. I. Древесина и разрушающие ее грибы. – М.: Наука, 2001. – 264 с.
15. Болобова А. В., Аскадский А.А., Кондращенко В.И., Рабинович М.Л. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн. 2. Ферменты, модели, процессы. – М.: Наука, 2002. – 343 с.

Оглавление

Введение……. 3
Глава 1. МИКРООРГАНИЗМЫ КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛИ ВЕЩЕСТВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ, ИХ РАЗНООБРАЗИЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ…..……... 5
Глава 2. БИОФИЗИКА И СТРОЕНИЕ КЛЕТОК …….……. 9
2.1. Прокариотические клетки…….…….. 10
2.2. Эукариотические клетки …….…… 11
2.3. Фракционирование клеток …… 14
2.4. Важнейшие типы клеток …… 15
2.5. Бактерии …….. 16
2.6. Дрожжи …… 18
2.7. Плесени ……... 20
2.8. Водоросли и простейшие …….. 22
2.9. Растительные и животные клетки ……. 24
Глава 3. ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЖИЗНИ …….. …… 25
3.1. Липиды ……. 26
3.2. Жирные кислоты и родственные липиды …… 27
3.3. Омыляемые липиды …….. 29
3.4. Сложные липиды …….…… 31
3.5. Неомыляемые липиды …… 37
3.6. Стероиды …….. 42
3.7. Сахара и полисахариды …….. 50
3.8. Целлюлоза……. 54
3.9. Гликоген …….. 57
3.10. Декстраны …….. 58
3.11.Пектиновые вещества……. 59
3.12. Альгиновые кислоты и некоторые другие полисахариды……. 59
3.13. Нуклеиновые основания, нуклеозиды, нуклеотиды… …….. 60
3.14. Структура и функции нуклеиновых кислот ……... 69
3.15. Белки и аминокислоты ……. 78
3.16. Биохимические соединения смешанного строения …….. 95
3.17. Иерархия клеточной структуры …….. 103
Глава 4. ФЕРМЕНТЫ, ИХ СВОЙСТВА, КИНЕТИКА КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ИМИ РЕАКЦИЙ ……. 105
4.1. Выделение ферментов …….…... 109
4.2. Правила работы с ферментами……... 123
4.3. Фермент-субстратные комплексы и механизм действия ферментов……. 124
4.4. Кинетика ферментативных реакций. Уравнение Михаэлиса-Ментен……... 128
4.5. Влияние pH на кинетику ферментативных реакций……. 146
4.6. Влияние температуры на скорость ферментативных реакций…… 150
4.7. Методы стабилизации ферментов…….. 155
4.8. Ферментативные реакции в гетерогенных системах…… 158
Глава 5. ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ……... 164
5.1. Методы иммобилизации……. 165
5.1.1. Диазометод…… 166

5.1.2. Активация бромцианом……... 166
5.1.3. Карбодиимидный метод…….. 166
5.1.4. Метод алкилирования…….. 167
5.1.5. Метод иммобилизации с глутаровым диальдегидом…… 167
Глава 6. ПРОМЫШЛЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАТИВНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК…….. 180
6.1. Применение гидролитических ферментов…… 181
6.2. Протеолитические ферменты…… 183
6.3. Дезаминазы……. 187
6.4. Другие гидролазы, применяющиеся в медицине……. 188
6.5. Аминоацилазы……. 189
6.6. Применение эстераз…… 191
6.7. Применение амилаз, карбогидраз и изомераз…….. 193
6.8. Применение целлюлаз и лигнин разрушающих ферментов……... 197
6.9. Применение ферментных смесей, пектиновых ферментов и ферментов для электродов и генной инженерии…….. 212
Глава 7. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ…….. 216
7.1. Определение основных понятий……. 219
7.2. Различные концепции и их обоснование…….. 221
7.3 Направления исследований…….. 224
7.4. Практические основы экологической химии…… 225
7.5. Изменения во времени……. 226
7.6. Антропогенные изменения…… 232
7.7. Рост мировой экономики…….. 232
7.8. Сельское и лесное хозяйство…… 233
7.9. Горнодобывающая и другие отрасли промышленности…… 234
7.10. Пространственные изменении (локальные, региональные, глобальные)…….. 236
Глава 8. КОНЦЕПЦИИ И КРИТЕРИИ ИЗУЧЕНИЯ ВЕЩЕСТВ……... 238
8.1. Объем производства……. 240
8.2. Области применения…… 243
8.3. Распространение в окружающей среде……... 246
8.4. Перенос между различными средами…… 247
8.5. Поступление и накопление в живых организмах…… 257
8.6. Географический и биотический перенос…….…… 263
8.7. Устойчивость и способность к разложению…….…… 264
8.8. Превращения…… 268
8.9. Абиотические превращения. Окислительные процессы…….. 268
8.10. Восстановительные процессы…… 271
8.11. Гидролитические процессы…… 272
8.12. Фотохимические реакции…… 273
8.13. Фотофизические и фотохимические стадии……... 273
8.14. Фотореакции химических веществ в окружающей среде……. 275
8.15. Реакции посторонних для окружающей среды веществ с

природными материалами…….. 276
8.16. Реакции между различными посторонними для окружающей среды веществами……. 278
8.17. Биотические превращения…… 279
8.18. Соединения металлов……. 280
8.19. Органические посторонние вещества…… 282
8.20. Предсказуемость биотических превращений по структуре химических соединений……. 293
Глава 9. ПОНЯТИЕ О ВЕЩЕСТВАХ-ЗАГРЯЗНИТЕЛЯХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ…… 294
9.1. Хемосфера…….. 295
9.2. Токсичность. Стандарты качества окружающей среды…… 302
9.3. Воздействия на отдельные особи и популяции…… 311
9.4. Молекулярно-биологические воздействия…….. 312
9.5. Нарушения обмена веществ и регуляторных процессов в клетке под действием химических веществ…… 314
9.6. Мутагенность и канцерогенность…….. 316
9.7. Воздействия на поведение организмов…….……. 319
Глава 10. ПЕРЕРАБОТКА ОТХОДОВ…… 320
10.1. Переработка отходов, образующихся в процессе очистки воды, воздуха……. 320
10.2. Аэробная переработка отходов…… 321
10.3 Перколяционные фильтры…… 322
10.4. Активный ил…… 323
10.5. Принцип «псевдоожиженного слоя»……. 328
10.6. Аэробное разложение……. 330
10.7. Биологический контроль за системами микробиологической переработки отходов……. 335
10.8. Контроль за патогенностью……. 338
10.9. Извлечение полезных веществ…… 341
10.10. Вода……... 341
10.11. Удобрения……. 342
10.12. Корма для животных……. 343
10.13. Биологическая переработка промышленных отходов…….. 343
10.14. Отходы молочной промышленности .Сыворотка……. 348
10.15. Отходы целлюлозно-бумажной промышленности…… 349
10.16. Отходы от производства красителей……. 352
10.17. Биологическая очистка газов…….. 354
10.18. Биодеградация ксенобиотиков в окружающей среде…… 355
10.19. Участие микробных сообществ в биодеградации ксенобиотиков.. 356
10.20. Хлорпроизводные углеводородов…….. 358
10.21. Другие замещенные простые ароматические соединения…… 359
10.22. Полиароматические углеводороды…….. 360
10.23. Биодеградация нефтяных загрязнений…… 361
10.24. Пестициды…….. 362
10.25. Биодеградация поверхностно-активных веществ……... 364
10.26. Аэробная переработка отходов в сельском хозяйстве. Проблема хранения и переработки отходов…….. 366
10.27. Системы переработки отходов в аэробных условиях…….…. 367

10.28. Водоем для окисления……. 367
10.29. Каскадные бассейны…… 368
10.30. Канава Пасвира (*Pasveer ditch*)…….. 368
10.31. Переработка отходов сельского хозяйства в анаэробных условиях . Главные особенности процесса …… 369
10.32. Переработка отходов сельского хозяйства……. 369
10.33. Микробиологические основы процесса…….…….. 371
10.34. Современные разработки ……. 371
10.35. Использование протопластов в селекции растений. Вегетативное размножение……. 372
10.36. Изменчивость…… 373
10.37. Регенерация растений из протопластов…….. 374
10.38. Выращивание растений для опытов…… 374
10.39. Среды для выделения и размножения……... 374
10.40. Выделение протопластов……. 375
10.41. Рост каллуса…….. 375
10.42. Получение соматических гибридов…….…… 378
10.43. Захват протопластами микроорганизмов и ДНК……... 379
10.44. Переработка отходов, образующихся при загрязнении почвы. 380
10.45. Пути ликвидации твердых отходов…….. 380
10.46. Открытые горящие свалки…… 381
10.47. Захоронения…… 382
10.48. Проблемы, связанные с захоронением отходов……. 382
10.49. Вымывание веществ и загрязнение грунтовых вод…… 382
10.50. Образование метана…….…….. 363
10.51. Просадка грунта……. 363
10.52. Усовершенствование захоронений – попытка закрепить порочную практику…….. 384
10.53. Возрастание стоимости захоронений…….. 385
10.54. Возможные решения. Рециклизация…….. 386
10.55. Трудности на пути рециклизации…… 386
10.56. Пути решения проблем……. 387
10.57. Юридические аспекты рециклизации отходов……. 390
10.58. Компостирование…….…….. 391
10.59. Отходы как источник энергии…….…….. 392
10.60. Сокращение объема отходов…… 394
10.61. Бутылки одноразового и многоразового использования……... 394
10.62. Другие способы……. 395
10.63. Комплексная программа ликвидации отходов…… 396
10.64. Отходы мясоперерабатывающих предприятий и их реализация…….. 398
10.65. Активация ферментного комплекса из поджелудочной железы убойных животных…….. 400
10.66. Гидролиз мясокостного фарша……. 401
10.67. Технологическая схема получения пептона…….. 408
10.68. Переработка бумаги и древесины…… 409
Заключение...……. 410
Библиографический список……. 411
Содержание…… 416

Учебное издание

Андрей Дмитриевич Неклюдов
Андрей Николаевич Иванкин

Экологические основы биотехнологии

Редактор А.П. Головина

Оригинал-макет подготовил А.Н. Иванкин

Компьютерная верстка А.Н. Иванкина, А.Д. Неклюдова

По тематическому плану внутривузовских изданий учебной литературы на 2016 г., поз. доп.

Подписано к печати		Формат 60x88/16
Бумага 80 г/м^2 «Снегурочка»		Ризография
Объём 26 п. л.	Тираж 100 экз.	Заказ N

Издательство Московского государственного университета леса.
141005. Мытищи –5. Московской обл., 1-я Институтская, 1, МГУЛ
Телефон: (095) 588-57-62
e-mail: izdat@mgul.ac.ru

Ecological Principles of Biotechnology

Prof. Andrew D. Neklyudov
Moscow Forest State University

Prof. Andrew N. Ivankin
Moscow Forest State University

MFSU Publishers – Moscow – 2016