



Лекция № 5

**Потребности клеток в питательных веществах.
Принципы составления питательных сред.
Сырье для биотехнологической
промышленности.**

**Лекцию читает к.б.н доцент
Комбарова Светлана Петровна**

Потребности культур клеток в питательных и др. веществах

- **Каждый конкретный вид организмов, используемых в биотехнологии, строго избирателен к питательным веществам, что определяется физиологическими особенностями данного вида.**
- **В зависимости от того, что является источником энергии и питания для данного типа организмов, для них конструируют специальные питательные среды.**

- **Физиологические потребности клеток в питательных веществах можно выявить в приближенном виде, определив химический состав клеток.**

Однако в этом случае не учитываются количество и состав метаболитов, удаленных клеткой во внешнюю среду, и то обстоятельство, что состав клеточного вещества живых организмов зависит от условий среды обитания и варьирует в достаточно широких пределах.

- **Но все же, первоначальную ориентировку в выборе состава питательной среды, исходя из состава клеточного вещества клетки, сделать можно!**

- Исходя из строения и состава клеточного вещества, можно судить о необходимых для этого организма питательных веществах, которые должны присутствовать в питательной среде.
- Соотношение отдельных химических элементов, необходимых для нормального роста и развития данного организма, может заметно колебаться в зависимости от вида организма и условий его роста.

- **Однако есть общие закономерности и основные химические элементы, необходимые для всех без исключения микроорганизмов и потребляемые в процессе метаболизма в относительно больших количествах:**
УГЛЕРОД, АЗОТ, КИСЛОРОД и ВОДОРОД!
- Кроме того, все микроорганизмы нуждаются в фосфоре, сере, калии, натрии, магнии и др. макро- и микроэлементах.

- **УГЛЕРОД**, имеющий наибольшее биогенное значение среди всех элементов, входит в состав почти всех соединений, из которых построены живые организмы.
- Доля углерода в составе биомассы микроорганизмов составляет около 50%.
- В зависимости от источника углерода, необходимого для конструктивного метаболизма, микроорганизмы делят на две группы: **автотрофы** и

- **Автотрофы** - организмы, синтезирующие органические вещества из неорганических соединений (как правило, из диоксида углерода и воды).
- Автотрофы создают первичную биологическую продукцию, находясь на первом трофическом уровне в экосистемах и передавая органические вещества и содержащуюся в них энергию гетеротрофам.
- **Большинство автотрофов являются фотоавтотрофами**, которые имеют хлорофилл. Это — растения (цветковые, голосеменные, папоротникообразные, мхи, водоросли) и цианобактерии. Они осуществляют фотосинтез с выделением кислорода, используя неисчерпаемую и экологически чистую солнечную энергию.
- **Хемоавтотрофы** (серобактерии, метанобактерии, нитрифицирующие бактерии, железобактерии и др.) для синтеза органических веществ используют энергию окисления

- **Гетеротрофы** - организмы, использующие для питания органические вещества; в узком смысле слова – организмы, использующие органические соединения в качестве источника углерода.
- К гетеротрофам относятся человек, все животные, некоторые растения, большинство микроорганизмов и др.
- Среди гетеротрофов выделяют две большие группы: сапрофитов и паразитов.

- **Способность к усвоению того или иного углеродсодержащего субстрата в значительной степени определяется видом организма.**
- **Однако можно выделить общие закономерности.**

Наиболее доступны для большинства культур соединения, содержащие полуокисленные атомы углерода в группах - CH_2OH , - CHOH -, $=\text{COH}$ -, то есть сахара, органические спирты (маннит, глицерин и др.) и органические кислоты. Такие вещества, с одной стороны, обладают достаточно большим запасом энергии, выделяющейся при их окислении; с другой стороны, они легко вступают в окислительно-восстановительные

- **Нередко источником углерода служат высокомолекулярные соединения (ВМС), например, крахмал, целлюлоза, хитин или др. Однако такие вещества должны сначала расщепляться на составляющие их низкомолекулярные соединения, которые далее уже вовлекаются в биохимические процессы. Расщепление (гидролиз) ВМС происходит либо в процессе предварительной обработки сырья (например, при кислотном гидролизе) или непосредственно во время ферментации с помощью ферментов, выделяемых микроорганизмами.**

- **АЗОТ**, наряду с углеродом, является одним из четырех основных компонентов, участвующих в построении клетки.
- В расчете на сухое вещество **содержание азота в клетке составляет в среднем 12% у бактерий и 10% - у грибов.**
- Природный азот бывает в окисленной, восстановленной и молекулярной формах. **Легче всего организмами усваивается азот в восстановленной форме.** Однако при этом происходит подкисление в процессе ферментации культуральной жидкости, что приводит к торможению роста продуцента. Для предотвращения этого в питательные

- **В качестве источников азота микроорганизмы могут использовать органические соединения: аминокислоты, пептиды, белки.**
Белки, как и все высокомолекулярные соединения, потребляются после их расщепления на аминокислоты и пептиды с помощью протеиназ, поэтому расти на средах, содержащих в качестве единственного источника азота белки или продукты их частичного гидролиза (пептоны), могут лишь микроорганизмы, обладающие высокой протеолитической активностью.

- Наряду с пептонами используются субстраты, полученные при кислотном гидролизе белка (чаще всего казеина), в которые входят свободные аминокислоты. **Гидролизат казеина** содержит полный набор аминокислот (за исключением триптофана, разрушающегося при кислотном гидролизе) и **является универсальным источником азота**. При внесении гидролизата казеина в среду совместно с триптофаном клетки переключаются на так называемый **«аминогетеротрофный» тип питания**, потребляя аминокислоты в готовом виде. Подкисления или подщелачивания среды не происходит.

- **Окисленные формы азота**, в основном нитраты калия, натрия или аммония, также могут потребляться многими микроорганизмами. Однако нитраты предварительно восстанавливаются клетками с помощью последовательного действия двух ферментов: нитрат- и нитритредуктазы. Нитратный азот используется для микроорганизмов, не способных развиваться в кислой среде.
- **Важную группу представляют микроорганизмы, способные фиксировать молекулярный азот воздуха. Интерес представляют клубеньковые бактерии рода *Rhizobium***, которые в симбиозе с бобовыми растениями могут фиксировать молекулярный азот атмосферы, снабжая таким образом растения азотом.

- **ФОСФОР** необходим клеткам для синтеза ряда важнейших соединений - коферментов, фосфолипидов, нуклеиновых кислот, АТФ и др.

Органические соединения фосфора используются микроорганизмами как аккумуляторы энергии, освобождающейся в процессе окисления. В питательной среде фосфаты должны присутствовать в виде неорганических солей: одно - или двузамещенных фосфатов калия или натрия. Реже используются органические источники фосфора, например продукты разложения нуклеиновых кислот. Довольно большое количество фосфора содержится в таком

- **СЕРА** входит в состав аминокислот (цистеин, метионин), витаминов и кофакторов (биотин, липоевая кислота, кофермент А и др.).
- В природе сера находится в форме неорганических солей (в основном – сульфатов), в виде молекулярной (элементарной) серы или входит в состав органических соединений.
- Большинство клеток потребляют серу в форме сульфатов, который при этом восстанавливается до сульфидов.

- **Факторы роста**

Термин «**факторы роста**» используется для обозначения важных источников питания, таких как аминокислоты, витамины, пуриновые или пиримидиновые соединения, которые по каким-либо причинам клетки не могут синтезировать самостоятельно. Факторы роста необходимы клеткам в очень малых количествах.

- Микроорганизмы, которым в дополнение к основному источнику углерода необходим один или больше факторов роста, называют **АУКСОТРОФАМИ**.

- **ПРОТОТРОФЫ** не требуют ростовых

- **Микроэлементы**

Микроэлементы, такие как медь, цинк, кобальт, никель, хлор, натрий, кремний, молибден, марганец и др., необходимы также в малых дозах - для построения клеточных структур и нормального функционирования металлсодержащих ферментов, витаминов и др.

- **Предшественники** вносят в питательные среды для целенаправленного увеличения выхода конечного продукта. Они обычно представляют собой синтетические соединения, входящие в состав молекулы целевого продукта.

- **Вода** составляет 80-90% биомассы клеток. **Содержание воды** в растворе или в субстрате количественно **выражают величиной активности воды (a_w)**, то есть отношением парциального давления пара раствора (p) к давлению водяного пара (p_0).
- Для разбавленных сред активность воды практически совпадает с концентрацией воды. Для чистой воды $a_w = 1,0$; а для совершенно сухого вещества $a_w = 0$.
- **Микроорганизмы способны развиваться на питательных средах, в которых активность воды (a_w) находится в пределах от 0,63 до 0,93, причем для бактерий этот диапазон значительно уже (от 0,93 до 0,99), чем для дрожжей и микроскопических грибов.**

- Кроме сбалансированного состава питательной среды для культивируемого продуцента важную роль играет **pH среды** (**водородный показатель** — **мера активности** (в разбавленных растворах эквивалентна концентрации) **ионов водорода в растворе, количественно выражающая его кислотность**. Равен по модулю и противоположен по знаку десятичному логарифму активности водородных ионов, выраженной в молях на один литр.

- Каждый микроорганизм имеет интервал рН среды, в пределах которого он может развиваться. Однако есть и некоторые общие закономерности.
- Большинство бактерий хорошо развиваются при рН, близком к нейтральному (6,5-7,5).
- У грибов и дрожжей оптимум рН находится в кислой зоне (4,0-6,0).
- Например: при спиртовом брожении при рН 4,0 образуются диоксид углерода и этиловый спирт. При сдвиге рН до 7,5, кроме диоксида углерода и этилового спирта, образуется ещё уксусная кислота.

- Важным показателем является также **окислительно-восстановительный потенциал rH_2** - отрицательный логарифм давления молекулярного водорода, **выражающий степень аэробности культур.**
- В водном растворе, полностью насыщенном кислородом, $rH_2 = 41$, а в условиях полного насыщения среды водородом $rH_2 = 0$.
Таким образом, шкала от 0 до 41 характеризует любую степень аэробности.

- По отношению к молекулярному кислороду все микроорганизмы подразделяют на следующие основные группы: **АЭРОБЫ, АНАЭРОБЫ и ФАКУЛЬТАТИВНЫЕ АНАЭРОБЫ.**
- ***Облигатные аэробы*** (aeros – воздух) для осуществления процессов метаболизма нуждаются в молекулярном кислороде. Они не способны получать энергию путем брожения. Их ферменты осуществляют перенос электронов от окисляемого субстрата к кислороду.

- **Облигатные анаэробы** не используют молекулярный кислород. Более того, он для них токсичен!
- **Факультативные анаэробы** могут жить как при наличии, так и в отсутствии кислорода. Типичными представителями этой группы являются кишечная палочка, стрептококк, стафилококк. Кишечная палочка на среде с углеводами развивается как анаэроб, сбраживая сахара, а затем начинает использовать кислород, как типичный аэробный организм, окисляя до CO_2 и H_2O образовавшиеся продукты брожения (например, молочную кислоту).

Принципы составления питательных сред

- Для нормального роста микроорганизмов и биосинтеза целевых продуктов метаболизма недостаточно только присутствия в питательной среде всех необходимых компонентов.
- **Основной принцип составления питательных сред таков:**
Все элементы, входящие в состав клеточного вещества, должны находиться в питательной среде, причем в таких количествах, форме и соотношениях, которые клетки способны усваивать.

- Большое значение для биосинтеза многих целевых продуктов имеет **сбалансированность питательной среды по углероду и азоту, то есть соотношение углерода и азота C:N.** Дефицит одного из этих компонентов не может быть компенсирован избытком другого.
- Кроме того, из большого числа, например, источников углерода и энергии нужно выбрать именно тот, который наиболее соответствует физиологическим потребностям данной культуры.

- Для предварительного подбора количества компонентов питательной среды обычно пользуются данными химического состава биомассы. Если культура синтезирует и выделяет в среду значительные количества какого-либо продукта метаболизма, дополнительно требуется учитывать химическую формулу этого продукта. При определении количества глюкозы или другого углеродсодержащего субстрата следует учитывать, что гетеротрофы используют этот субстрат на конструктивные и энергетические нужды. Расход глюкозы на эти цели определяют по выходу АТФ.

- Если один из компонентов среды должен быть лимитирующим (важно,какой элемент исчерпывается в первую очередь), то его количество определяют по материально-энергетическому балансу, а остальные компоненты вносят в избытке.
- **Среды, составленные по описанным выше принципам, называют минимальными, они содержат минимум веществ, необходимых для синтеза заданного количества биомассы.**
- На практике обычно используют более сложные среды, способствующие интенсивному росту клеток и синтезу целевых продуктов.
- Для ауксотрофов определенные факторы роста должны обязательно входить в состав минимальной среды, так как без них рост культур

- **«Богатая» питательная среда** содержит, кроме необходимых для роста источников питания, **дополнительные вещества** (аминокислоты, витамины, предшественники нуклеиновых кислот и другие промежуточные соединения синтеза клеточных компонентов). Обогащение питательных сред приводит к увеличению скорости роста и изменению ферментного состава биомассы.
- **При подборе состава питательных сред часто используют математические методы планирования и обработки экспериментов**, что резко сокращает трудоемкость и длительность работы.

- **Потребности микроорганизмов в питании могут различаться качественно и количественно в зависимости от условий культивирования. На изменение потребностей в факторах роста способны влиять температура, рН, режим аэрации, перемешивание и др.**
- **Для начала роста небольшого количества посевного материала требуется более обогащенная среда, чем для начала роста популяции клеток с высокой плотностью.**

Требования, предъявляемые к питательным средам

- **В среде должны быть все необходимые для роста и развития химические элементы;**
- **Среда должна быть сбалансирована по химическому составу.** Это значит, что соотношение химических элементов питательной среды и главным образом соотношение органических элементов - C:N должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке;
- **Среды должны иметь достаточную влажность,** обеспечивающую возможность диффузии питательных веществ в клетку. Для грибов эта влажность обеспечивается содержанием влаги в субстрате не менее 12 %, для бактерий - не менее 20 %.

- **Среда должна иметь определенное значение pH среды.** Среди микроорганизмов различают **ацидофилы** (кислотолюбивые микроорганизмы), **алкалофилы** (щелочелюбивые микроорганизмы) и **нейтрофилы** (лучше всего растут в нейтральной среде с pH около 7,0). Следует помнить, что при стерилизации среды и в процессе культивирования микроорганизмов, кислотность среды может сильно изменяться. Во избежание изменения pH в среду добавляют буферные системы (фосфатный буфер или др.), CaCO_3 (для нейтрализации образующихся в результате культивирования органических кислот), вещества органической природы, обладающие буферными свойствами (аминокислоты, белки,

- **Среды должны быть изотоничными** для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки.
- **Среды должны обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом (rH_2)**, определяющим насыщение ее кислородом. Облигатные анаэробы размножаются при rH_2 не выше 5, аэробы – не ниже 10.
- **Среды должны быть стерильными**, что обеспечивает рост чистых культур микроорганизмов.

Классификация питательных сред

- По **консистенции** питательные среды делятся на **жидкие, плотные и сыпучие**.
- По **происхождению и составу** питательные среды делятся на **натуральные** (естественные), **синтетические** (искусственные) и **полусинтетические**. **Натуральные среды** готовятся из продуктов животного и растительного происхождения. Они содержат все ингредиенты, необходимые для роста и развития микроорганизмов. Основным недостатком этих сред является то, что они имеют сложный и непостоянный состав.

Наиболее часто применяемыми натуральными питательными средами являются мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ), предназначенные для культивирования бактерий, а также неохмеленное пивное сусло и сусло-агар, используемые для выращивания и накопления биомассы грибов и дрожжей.

Синтетические среды имеют в своем составе химически чистые органические и неорганические соединения в строго указанных концентрациях.

Полусинтетические среды в своем составе содержат химически чистые органические и неорганические вещества, (как и в синтетических средах) и вещества растительного или животного происхождения в качестве факторов роста для ускорения роста и развития микроорганизмов.

- По ***назначению*** среды делятся на **универсальные** (основные), **избирательные** (накопительные, селективные) и **дифференциально-диагностические**.

Универсальные среды используются для выращивания многих видов микроорганизмов.

Избирательные среды обеспечивают развитие только определенных микроорганизмов или группы родственных видов и непригодны для роста других. В такие среды, как правило, добавляют вещества, избирательно подавляющие развитие сопутствующей микрофлоры.

Дифференциально- диагностические среды

используются для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, основываясь на особенностях его обмена веществ. Состав этих сред позволяет четко выделить наиболее характерные свойства изучаемого микроорганизма.

Сырье для биотехнологической промышленности

- **Если в лабораторных условиях продуценты обычно выращивают на синтетических питательных средах строго определенного состава, то в промышленности стараются использовать более дешевые и доступные натуральные виды сырья, имеющие сложный и нестабильный химический состав (в том числе отходы различных производств).**

- **Вид сырья, его количество и источник выбирают в зависимости от:**
 - ***физиологических особенностей выращиваемой культуры*** (сырье должно содержать все необходимые компоненты для роста, развития данного продуцента и биосинтеза им целевых продуктов метаболизма);
 - ***цели культивирования;***
 - ***с учетом технико-экономических показателей*** (сырье должно быть дешевым, доступным и желательно возобновляемым)

- **В биотехнологической промышленности наибольшая доля сырья (более 90 %) идет на производство этанола. Производство хлебопекарных дрожжей требует 5 % расходуемого сырья, антибиотики — 1,7 %, органические кислоты и аминокислоты — 1,65 %.**
- **Ферментная биотехнология является крупным потребителем крахмала, так как только одной фруктозной патоки производится свыше 3,5 млн. т в год.**

- **С точки зрения экономики, сырье в биотехнологических производствах, особенно в крупнотоннажных, занимает первое место в статьях расходов и составляет 40—65 % общей стоимости продукции. При тонком биосинтезе доля сырья в общей себестоимости продукции уменьшается.**
- **Выбор между биосинтезом и химическим синтезом вещества определяется экономическими факторами. Вот почему такую важность имеет цена сырья. В этой связи вопросы рационального использования сырья, его удешевления и повышения качества имеют особое значение.**

- Одна из основных трудностей при реализации биотехнологических процессов в промышленности – низкое качество и нестандартность сырья, главным образом природного происхождения.
- С другой стороны, многие виды сырья, используемые в биотехнологической промышленности, представляют собой ценные пищевые продукты (глюкоза, сахароза, лактоза, подсолнечное или соевое масло и др.). Как следствие этого, высокая стоимость и перебои в снабжении этим сырьем.

Требования, предъявляемые к «идеальному» сырью

**Сырье должно быть: доступным,
дешевым, иметь стандартный
состав, быть стабильным при
хранении, хорошо растворяться
воде, легко усваиваться
микроорганизмами, не должно
относиться к пищевым
продуктам.**

Возможные пути решения «сырьевой проблемы»

- **Повышение эффективности использования компонентов сырья путем предварительной его обработки (измельчение, экстракция, гидролиз, отваривание, обогащение и др.).**
- **Повышение уровня стандартности сырья в результате строгого соблюдения технологии выращивания и переработки сельскохозяйственных культур. Выявление и внесение в технические условия на сырье параметров, характеризующих биологическую доступность сырья.**

- **Поиск новых нетрадиционных источников сырья, в первую очередь возобновляемых и недефицитных.**
- **Подбор для каждого технологического процесса резервных видов сырья (на случай перебоев со снабжением основным сырьем).**

В принципе, микроорганизмы способны ассимилировать любое органическое соединение, поэтому потенциальными ресурсами для биотехнологической промышленности могут служить все мировые запасы органических веществ, включая первичные и вторичные продукты фотосинтеза, а также запасы органических веществ в недрах Земли.

- Однако, каждый конкретный вид микроорганизмов, используемый в биотехнологии, весьма избирателен к питательным веществам, и органическое сырье (кроме лактозы, сахарозы, крахмала и др.) без предварительной химической обработки малопригодно для микробного синтеза.
- Принятое в настоящее время подразделение природных видов сырья на углерод- или азотсодержащее – довольно условно и основано лишь на преимущественном содержании тех или иных компонентов в сырье. Однако на практике такая классификация сырья удобна и находит широкое применение. Приведем примеры.

Углеродсодержащее сырьё

- В биотехнологической промышленности широко применяются **меласса и гидрол** — побочные продукты производства глюкозы из крахмала. Меласса характеризуется высоким содержанием сахаров (43—57%), в частности сахарозы.
- В дальнейшем необходимо учесть потенциальные возможности постоянно возобновляющихся сырьевых ресурсов — первичных продуктов фотосинтеза, в первую очередь **гидролизатов древесины и депротеинизированного сока растений**.

- В нашей стране ежегодно остается неиспользованной или нерационально используется около 1 млн. т **лактозы**, содержащейся в сыворотке и пахте.

В США из всего количества молочной сыворотки, образующейся при производстве сыра (ежегодно 20 млн. т), половина теряется со сточными водами.

В то же время известно, что из 1 т сыворотки можно получить около 20 кг сухой биомассы дрожжей. Кроме того, из сепарированной бражки можно выделить дополнительно около 4 кг протеина. Нерационально используется катюфельный сок, выделяемый из картофеля при производстве крахмала, а также альбуминное молоко, получаемое из сыворотки.

- До недавнего времени существовало мнение, что **органические кислоты** малодоступны для большинства микроорганизмов, однако на практике довольно часто встречаются микроорганизмы, успешно утилизирующие органические кислоты, особенно в анаэробных условиях.

Низкомолекулярные спирты и кислоты (метанол, этанол, уксусная кислота и др.) можно отнести к числу перспективных видов биотехнологического сырья, так как их ресурсы существенно увеличиваются благодаря успешному развитию технологии химического синтеза.

- **Целлюлозосодержащее сырье** после химического или ферментативного гидролиза и очистки от ингибирующих или балластных примесей (фенол, фурфурол, оксиметилфурфурол и др.) также может быть использовано в биотехнологическом производстве.
- В 1939 г. В. О. Таусоном была установлена способность разных видов микроорганизмов использовать в качестве единственного источника углерода и энергии n-алканы и некоторые фракции нефти.

Отличительной особенностью углеводородов по сравнению с другими видами биотехнологического сырья является низкая растворимость в воде. Этим объясняется тот факт, что только некоторые виды микроорганизмов в природе способны ассимилировать углеводороды. Максимальная растворимость n-алканов в воде около 60 мл/л при длине молекул от C₂ до C₄, но при увеличении цепи растворимость снижается.

Азотсодержащее сырье

- К наиболее дешевым и доступным источникам азотсодержащего сырья следует отнести кукурузный экстракт, соевую муку, гидролизаты дрожжей и др.
- Кукурузный экстракт – побочный продукт крахмало-паточного производства. Его получают упариванием замочных вод из-под кукурузного зерна до содержания сухих веществ 48-50%

Среды для выращивания клеток растений и животных

- Помимо источников углерода, азота и других минеральных компонентов, среда для клеток многоклеточных организмов содержит специфические стимуляторы и регуляторы роста. Клетки растений, как правило, требуют индолуксусную кислоту, кинетин и гиббереллиновую кислоту. Клетки животных нуждаются в ростовых веществах и незаменимых аминокислотах. Клетки растений и животных более чувствительны, чем микроорганизмы, к присутствию посторонних ингредиентов, поэтому требуют химически чистых компонентов среды.

- **Таким образом, необходимо отметить, что в области сырьевого обеспечения биотехнологических процессов наметился переход от дефицитного и дорогого сырья к использованию отходов различных производств, являющихся дешевым, доступным и, желательно, возобновляемым сырьем.**

Спасибо за внимание!

