



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЧАСТЬ I

НЕТРУСОВ
АЛЕКСАНДР ИВАНОВИЧ

БИОФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ
НА [VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ
[VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).



БЛАГОДАРИМ ЗА ОЦИФРОВКУ КОНСПЕКТА
СТУДЕНТКУ БИОФАКА МГУ
СЛАТИНСКУЮ ОЛЬГУ ВАДИМОВНУ

Содержание

Лекция 1. История микробиологии	8
Открытие Карла Геза	8
История микробиологии	9
Экология микроорганизмов.....	11
Открытие антибиотиков	13
Лекция 2. Бактерии и археи.....	15
Таксономические ранги	15
Метаногены.....	16
Галоархеи	17
Разнообразие биоорганизмов	18
Рост микроорганизмов	21
Витамины	22
Лекция 3. Свойства микроорганизмов	23
Функции витаминов	23
Химический состав E.coli.	25
Транспорт веществ в бактериальную клетку.....	26
Рост микроорганизмов. Культивирование.....	28
Непрерывное культивирование микроорганизмов	29
Влияние физико-химических факторов на рост организма (экофизиология организма).....	30
Лекция 4. Свойства бактериальных клеток.	33
Активность воды в бактериальной клетке	33
Влияние радиации на бактериальную клетку.....	35
Влияние температуры на бактериальную клетку.....	36
Влияние давления на бактериальную клетку	37
Черные курильщики.....	38
Рост микроорганизмов в зависимости от температуры.....	39
Влияние кислорода на бактериальную клетку. Активные формы кислорода..	39
Лекция 5. Анаэробные системы. Метаболизм.....	42
Влияние кислорода на анаэробов.	42
Изучение анаэробных ферментных систем.	45
Статистика смертей жителей США в разное время.....	46

Контроль роста микроорганизмов.	47
Метаболизм и "биохимическое единство жизни".	48
Способы получения и запасания энергии.	48
Пути расщепления сахаров.	49
Реакции окисления пирувата.	50
Кратко о брожении.	50
Лекция 6. Виды брожений.	51
Общая схема брожений.	51
Субстраты для брожений.	51
Спиртовое брожение.	51
Молочнокислое брожение.	53
Бифидобактерии. Их брожение.	55
Свойства пробиотиков и пребиотиков.	56
Пропионовокислое брожение.	57
Маслянокислое и ацетонобутиловое брожение.	58
Лекция 7. Схемы и виды брожений.	61
Ацетонобутиловое брожение. Схема и применение продуктов.	61
Аминокислотное брожение.	62
Патогенные клостридии.	63
Клостридии, фиксирующие азот.	63
Сукцинат-этанольное брожение.	64
Бактерии, осуществляющие смешанное брожение.	64
Общая схема всех брожений.	66
Лекция 8. Анаэробное дыхание.	67
Анаэробное дыхание.	67
Путь Вуда-Льюнгдала.	68
Механизм работы СО-дегидрогеназы-ацетил-СоА-синтазы.	68
Бактерии, имеющие путь Вуда-Льюнгдала.	69
Механизм достройки углеродного скелета ацетил-СоА.	69
Ацетогены в природных нишах.	70
Бактерии с ацетил-СоА путем.	70
Субстраты для ацетогенов.	71
Синтрофия ацетогенов и метаногенов.	72
Механизм образования ацетата в природе.	72

Лекция 9. Метаногены (в названии презентации ошибка — метагены).....	74
Анаэробное карбонатное дыхание.....	74
Метаногены.....	74
Субстраты для метаногенов.	75
Группы метаногенов.	75
Метогены как источник парниковых газов.....	75
Реакции, проводящиеся метаногенами.	76
Кофакторы метаногенеза. Культивирование метаногенов.	77
Образование метана из различных субстратов.....	77
Свойства <i>Methanosarcina barkeri</i>	80
Метаногены в морских осадках.	80
Лекция 10. Сульфатредукторы.....	82
Общая схема анаэробных дыханий.	82
Сульфатредукторы.	82
Классификация сульфатредукторов.	83
Природные соединения серы.	83
Автотрофные сульфатредукторы.....	84
Сероводород как корродирующий газ.....	84
Доноры электронов для сульфатредукторов.	84
Схема образования сероводорода бактериями.....	85
Пространственная ориентация электрон-транспортной цепи.....	86
Углеродный метаболизм сульфатредукторов.....	87
Сульфатредукторы как бродильщики.	87
Реакции сбраживания тиосульфата.	88
Симбиоз сульфатредукторов и фототрофов.	88
Схема коррозии металла сульфатредукторами.	89
Лекция 11. Сероредукторы «Железосерное дыхание»	90
Сероредукторы. Источники серы.	90
Примеры серовосстанавливающих бактерий.	90
Схема электрон-транспортной цепи.....	92
Серные бактерии в сельском хозяйстве.	94
"Железное" дыхание.....	94
Схема ЭТЦ у железоокисляющих бактерий.....	94
Топливные элементы на основе "железных" бактерий.	95

Лекция 12. Нитритное и фумаратное дыхание	97
Соединения азота в природе. Нитратное дыхание.....	97
Автотрофы, восстанавливающие нитраты.....	98
АнАммОкс процесс.....	98
Фумарат в природе. Фумаратное дыхание.....	99
Аэробное дыхание на Земле. Светящиеся бактерии.....	99
Бактериальная люминесценция.....	100
Лекция 13. Метилотрофы и метанотрофы	102
Метилотрофы. Их классификация.....	102
Систематика метанотрофов.....	104
Классы метанотрофов.....	105
Свойства метанотрофов типа I и типа X.....	105
Различие биохимических путей у метанотрофов.....	107
Систематика метиловых бактерий.....	107
Окисление метана.....	108
Свойства растворимой метанмонооксигеназы.....	108
Лекция 14. Биология метилотрофов и метанотрофов.....	110
Биология метанотрофов. Путь окисления метана.....	110
Углеродный метаболизм метилотрофов.....	111
Фиксация формальдегида.....	112
Сериновый цикл фиксации формальдегида.....	112
Метод радиоактивного мечения в изучении биохимических путей.....	113
Определение путей фиксации формальдегида.....	113
Метилотрофные дрожжи.....	114
Метаболизм метанола в пероксисомах.....	116
Пероксидазное действие каталазы.....	116
Перенос кетольной группы с сахаров в фиксации углерода.....	117
Лекция 15. Биотехнологии с использованием метилотрофов.....	119
Выращивание биомассы на средах с метаном.....	119
Биотехнология с использованием <i>Methylophilus methylotrophus</i>	121
Производство метилотрофных дрожжей.....	122
Процессы производства БВК на метаноле.....	123
Метилотрофы как биотрансформанты.....	123

Лекция 1. История микробиологии

Открытие Карла Вёзе

Карл Вёзе открыл два царства прокариот — Археи и Бактерии. Вначале он назвал эти две большие филогенетические ветви эубактерии (настоящие бактерии) и архебактерии (бактерии, которые более древние — самые древние организмы на земле). Через пять лет было предложено другое название — археи и бактерии, названия, не похожие. Причина в том, что во многих странах, где микробиологи подавали на гранты и утверждали, что надо изучать архебактерии, люди, которые выделяли гранты не понимали, зачем изучать ещё одну группу бактерий. Ведь всё и так изучено. Поэтому, было принято разделить эти названия, с 1991 года они везде называются археи и бактерии. В некоторых старых книжках ещё можно встретить эти названия (эубактерии и архебактерии), но это не правильные названия. Есть название, которое не закрепилось — галоархеи у архей, а вот название родов осталось — галобактерии (галококки). Возможна путаница, поэтому надо знать, что «гало» — это бактерии, которые растут при очень высоких концентрациях соли, которые доходят до насыщенных (37 % NaCl), только в таких условиях живут археи с приставкой «гало».

Ещё раз об открытии Карла Вёзе, который первым стал секвенировать 5'S и 16'S рибосомальные РНК. Теперь эти данные о секвенсе 16'S рибосомальной РНК достигает более 20-30 тысяч видов и последовательностей, которые когда-нибудь будут превращены в виды. Очень много последовательностей до сих пор неизвестны, потому как микроорганизмы не выделены в чистые культуры. Более того, у архей появляются новые филогенетические ветви, далеко друг от друга отстоящие, где присутствует всего один выделенный в культуре организм, а остальные последовательности которые окружают его и сидят на этих ветках, существуют в виде геномных последовательностей, которые кодируют последовательность 16'S рибосомальной РНК. Поэтому предстоит большая работа по подбору средств, на которых будут расти эти микроорганизмы.

Основное открытие Карла Вёзе было представлено на филогенетическом древе. Древа хорошо подтверждаются данными по секвенированию и представлены тремя ветвями: археи, бактерии, эукарии. Отросток из которого пошли все живые организмы на земле расположены ближе к центру (общий предок). Ученые, которые занимаются филогенией и эволюцией, считают, что от «общего предка» отделились сначала археи, а ветвь бактерии и эукарии какое-то время развивались вместе, после чего произошло разделение и самостоятельное развитие. На древе расположены филогенетические ветви, каждая из которой несет свои отростки, на концах которой сидят организмы либо последовательности 16'S рибосомальной РНК. (8:02) которая уже отсекутенирована. Длина отростков соответствует числу замен в нуклеотидной последовательности, которая поддается математическому расчету с помощью специальных программ, которые сравнивают последовательности всех со всеми и выстраивают филогенетические деревья. У архей с самого начала были две основные ветви: эвриархеоты (истинные) и кренархеоты («крен» — исток, более древние, из их предшественников произошли другие бактерии).

Отто Кандлер (Otto Kandler, биохимик университета Мюнхена) изучал липиды прокариотических организмов. У одних прокариот, к которым относятся галобактерии метанообразующие имеют совершенно другое строение липидов из которых состоят плазматические мембраны. После открытия Карла Вёзе о двух различных, далеко

отстоящих друг от друга филогенетических линий, всё стало на свои места: у архей, метаногенов, галобактерий липиды одного состава, а у бактерий, липиды другого состава. Был против названия «кренархеоты», предполагая, что возможно открытие более древней ветви архей. Так и случилось, более древнюю ветвь архей называли юнархеоты (юные археи). С тех пор были открыты наноархеоты, таумархеоты. Всего предложено на настоящее время 15 ветвей архей, но они ещё не узаконены. Главная причина — невозможность выделить чистую культуру, так как основание присвоения имени только на основе последовательности 16'S рибосомальной РНК некорректно.

Бактерии так же имеют очень много филогенетических ветвей на каждой из которых сидят организмы. Больших филогенетических ветвей у бактерий около 60. Каждый год выделяют новые организмы, а учитывая их количество в мире, это приводит к появлению новых организмов. Например, микробиота нашего кишечника, ещё очень много не выделено в чистые культуры видов (600 — 100 видов не изучено).

Эукарии так же имеют длинные филогенетические ветви к эукариотам, которые отделились на простейшие, грибы, слизевики и так далее. Где-то в самом конце, далеко от остальных организмов расположились растения, насекомые и животные. Интересным фактом, после формирования древа оказалось, что 16'S рибосомальной митохондриальной РНК эукариотических организмов и хлоропластов растений оказались на древе.

Таким образом, подтвердилась гипотеза, высказанная в 1970 годы, американским профессором-женщиной Линн Моргулис, о том, что хлоропласты и митохондрии — древние симбионты высших организмов. Когда-то, бактерии, похожие на бактерии, способные к хеми- или автотрофной жизни, проникла в клетки, эукариотических организмов, потеряла часть своих функций, но у нее осталась функция выделения собственного белка и превратилась в энергетическое депо эукариотической клетки. Все эукариотические клетки и организмы несут в себе митохондрии и соответственно, в митохондриях образуется большая часть АТФ, необходимая для энергетического обмена. Аналогично, с хлоропластами — древняя цианобактерия проникла в эукариотический организм и стала выполнять роль хлоропластов, выполняющих фотосинтез. Растения содержат в клетках и хлоропласты и митохондрии, которые несут в себе информацию о тех бактериях, что подтверждается данными сиквенса 16'S рибосомальной РНК. Так же, у митохондрий и хлоропластов свой аппарат синтеза белка, что так же подтвердилось (ранее, было гипотезами) научным фактом — сиквенс показывает, что это не эукариотические последовательности, а близкие к прокариотическим последовательностям.

История микробиологии

История микробиологии начинается с открытия живых микроорганизмов Антуаном Левенгуком в 1665-1667 годом. Антуан Ван Левенгук жил в городе Делфт, был торговцем сукном. Для выбора лучших тканей, нужно смотреть, как в них переплетены нити, для этих целей использовались увеличительные стекла. Левенгук до совершенства овладел искусством создания двояковыпуклых линз, которые делал вручную. Теоретический предел увеличения двояковыпуклых линз, что достиг увеличения в 270 раз (теоретический предел увеличения изображения двояковыпуклыми линзами — 300 раз). Для сравнения, современный оптический микроскоп увеличивает в 1300 раз (иммерсионный микроскоп). Левенгук изготовил за

жизнь сотню микроскопов, которые разошлись по миру. Пётр Первый привез после путешествия по Европе привез с собой два микроскопа Левенгука, которые по сей день хранятся в кунсткамере. Лесли Робертсон, которая занимается историей микробиологии, собрала несколько микроскопов Левенгука и попыталась сделать с их помощью фотографии современных препаратов микроорганизмов. В результате, фото получились размытыми, но на них было можно разглядеть очертания препаратов.

Левенгук описал движение микроорганизмов, отметил их огромное количество. Одна из его известных фраз: «во рту обычного человека содержится больше микроорганизмов, чем людей в соединенном королевстве, Великобритании». Помимо открытия микроорганизмов, Левенгук сделал многое для биологии: занимался изучением зубного налета, открыл наличие капилляров, подтвердил клеточное строение древесины. До настоящего времени сохранилось много работ Левенгука, всё благодаря тому, что он писал письма на древнеголландском языке, который перевели на английский и они были напечатаны в журналах соединенного королевства Великобритании, гораздо позже, чем было сделано открытие на самом деле.

После Левенгука, образовалась Делфтская школа микробиологии, в которой интенсивно развивалась микробиология, в которой работал Бейеринк, придумавший способ выделения микроорганизмов из живой природы.

В следующие 200 лет не было совершено значительных открытий в микробиологии, хотя ученые рассматривали объекты, выделяли чистые культуры и смотрели на окрашенные объекты. Следующий прорыв в микробиологии был сделан в 1860 — 1890 гг., Луи Пастером (Франция) и Кохом (Германия). Пастер стоял у истоков иммунологии, он первым открыл, что можно проводить вакцинацию от некоторых болезней, именно ему принадлежат первые опыты с вакциной и вакцинацией. Однако, Пастер занимался более прикладной наукой, по образованию, он был химиком-кристаллографом, изучал право- и лево- вращающиеся кристаллы молочной кислоты. Виноделы из родного города Пастера, Лилля, обратились к нему с просьбой помочь избавиться от болезни вина (фактически, требовалось устранить причину прокисания вина). Пастер придумал, что вино нужно прогреть, чтобы избавиться от тех микроорганизмов, которые начинают расти после определенного срока хранения. Так, появился прием, который сейчас известен под термином «Пастеризация» — нагрев до 80°C в течении 10 минут убивает микроорганизмы, таким образом, удалось спасти винный материал. После, Пастер понял, что нужно полностью исключить контакт вина с кислородом, чтобы предотвратить образование уксусно-кислых бактерий (которые не развиваются в анаэробных условиях), который и вызывают порчу вина. Пастер открыл жизнь без кислорода, «закрыв» явления самозарождения жизни. Пастер опроверг теорию абиогенного происхождения жизни, доказав, что в пригодный для использования материал, попадает микроорганизм, и развивается. Он выделил несколько чистых культур азотфиксирующих микроорганизмов.

Спор Пастера с Либихом продолжался в течении 7 лет. Химики доказывали, что спиртовое брожение, это чисто органический процесс, а образование осадка после сбраживания/ферментации сахаров в этанол, это побочный процесс выпадения в осадок «органических телец», не связанный с присутствием живых организмов, ведь процесс брожения протекает в анаэробных условиях. Дело в том, что в 19 веке, ученые всего мира придерживались идеи о невозможности существования жизни в бескислородной среде. Пастер же доказал существование ряда анаэробных организмов, способных

существовать без организма. На примере дрожжей он доказал существование таких организмов и выиграл спор, под которым так же была большая экономическая подоплека — от исхода спора зависело, кто будет контролировать производства вина, пива, спирта и др.. Для этого, надо было установить, к какому процессу относится брожение — химическому или биологическому. Так, Пастер взял патент на производство пива.

Параллельно с Пастером, в Берлинском институте работал Роберт Кух, который занимался открытием новых форм болезнетворных микроорганизмов. В 19 веке люди страдали от инфекций и часто умирали от таких болезней, как чума и холера (эпидемии которых уносили тысячи жизней по всему миру), не зная, как с ними бороться и не имея никакого представления об антибиотиках. Проблема требовала решения. Кох занимался выделением возбудителей таких заболеваний, как сибирская язва, холера, чума. В его лаборатории разработали несколько технических средств, которые до сих пор используются в микробиологии — чашка Петри (названа по имени аспиранта, который описал конструкцию двойной, закрывающейся сверху чашкой с бортиками, исключая тем самым попадание микроорганизмов внутрь). В лаборатории Коха первыми открыли и стали применять агар. Его ассистент, Хессе, пожаловался жене на необходимость отвердевания среды для выращивания микроорганизмов — использовались срезы картофеля и желатин. Желатин, это белок, поэтому, микроорганизмы содержащие протеазы, проедали желатин и проваливались, превращая среду в «бульон» из которой невозможно достать колонии микроорганизмов. Жена Хессе предложила попробовать использовать то, что все немецкие женщины в то время применяли для изготовления желе — агар. Так, агар, который применялся в пищевой промышленности, стал применяться для выращивания микроорганизмов и по сей день является препаратом №1 в микробиологии для получения твердых сред. В лаборатории Коха были сформулированные так называемый постулаты или триады Коха:

1. Микроорганизм, который вызывает болезнь, должен быть выделен в чистом виде;
2. Этот микроорганизм должен в чистой культуре заразить организм, который должен заболеть и иметь точно такие же симптомы;
3. Из заболевшего подопытного животного нужно выделить возбудитель болезни в чистой культуре и культуры, выделенные из подопытного и заболевшего животного (человека) должны полностью совпадать по свойствам.

Экология микроорганизмов

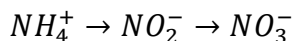
В конце 19 — начале 20 века, микробиология получила бурное развитие, благодаря Мартину Бейеринк и профессору Сергею Николаевичу Виноградскому (Санкт-Петербургский университет), которые изучали микроорганизмы в природе. С этого момента началось развитие экологии микроорганизмов и экологических приемов выделения микроорганизмов.

Мартин Бейеринк в 1895 году был назначен первым профессором микробиологии Делфтского университета в Голландии. Бейеринк открыто демонстрировал нелюбовь к студентам, считая, что они отвлекают его от науки. Всю жизнь провел с двумя сестрами, которые так же были его ассистентками на работе. После присуждения звания профессора, Бейеринк потребовал, чтобы его лаборатория располагалась в том же здании, в котором он будет проживать, чтобы не тратить время

на дорогу. Требование было выполнено, это здание сохранилось до сих пор. Бейеринк занялся изучением микроорганизмов и их выделением из природы. Он выделил анаэробные азотфиксирующие организмы, а также, выделил много микроорганизмов, участвующих в круговороте азота, серы и углерода. Он придумал много способов выделения микроорганизмов. Например, создал метод накопительной культуры — создание специальных условий, чтобы селективно из природной пробы с росли бы те организмы, которые было необходимо выделить. Таким образом происходило обогащение микроорганизмов, которые требовались на фоне других микроорганизмов, что облегчало выделение чистой культуры. Он основал Делфтскую школу, которая ведет начало с его работ и до сих пор остается ведущей школой в области микробиологии.

Сергей Николаевич Виноградский (место рождения — г. Городок под Киевом), отец — управляющий банка, брат занимался банковским делом, сам же Сергей Николаевич закончил школу в Киеве и решил, что пойдет в юриспруденцию. Через два года он поступил в Санкт-Петербургский государственный университет, перешел на естественнонаучный факультет и закончил кафедру физиологии растений. После, поехал на стажировку в Страсбург (Франция) к Де Бари — знаменитый ученый, занимавшийся грибами. У него, Виноградский стал заниматься изучением микроорганизмов, занимающихся восстановлением соединением серы, в частности *Biggeatoa*, обитающих в поверхности осадков неглубоких каналов, где образовывался сероводород, диффундирующий из ила на поверхность, где и начинался процесс окисления сероводорода. Виноградский наблюдал за данным процессом в проточной камере. На основании наблюдений и количественного анализа поглощения сероводорода и выделения кислорода, и серной кислоты, он сделал заключение, что *Biggeatoa* черпает энергию для существования и фиксации CO_2 , из окисления неорганических соединений. Он назвал этот процесс «аноргооксидация» (неорганическая оксидация), сейчас, этот термин носит название «хемолитотрофия». Он впервые доказал существование микроорганизмов, которые получают энергию из окисления неорганических соединений. Так, был открыт новый образ жизни.

После смерти Де Бари, Виноградский вернулся в Санкт-Петербург, где его назначили профессором на кафедру бактериологии в Санкт-Петербургском государственном университете, где он занимался нитрифицирующими микроорганизмами. Там, он выделил нитрификаторов первой и второй фазы. В своих научных работах — «Мемуарах», он указывал, что выделил организмы, которые окисляют аммоний (аммиак) по схеме:



В то же время, в Великобритании ученые Франкланды, выделили микроорганизмы, которые окислили аммоний до NO_2^- . Однако, в историю открытия нитрификации попало только имя Виноградского, хотя современники и утверждали, что культура, которую он выделил была не чистой, так как процесс нитрификации двухстадийный.

В декабре 2015 года в журнале *Science* вышла статья с описанием организма из рода *Nitrosospira*, напрямую окисляющего NH_4^+ в NO_3^- . Виноградский получил известность в России, но в 1905 году из-за состояния здоровья и следствием постоянных конфликтов с сотрудниками лаборатории, которые считали, что необходимо заниматься только возбудителями болезней, он бросил науку, вернулся в Городок и занялся жизнью просвещенного помещика — вел сельское хозяйство,

занимался выведением нового вида лошадей, новых сортов пшеницы и т.д.. После революции и гражданской войны, он решил эмигрировать на пароходе из Одессы в Белград, где основал кафедру микробиологии в Белградском университете. Там, с 1925 года он начал публиковать статьи по тематике железоокисляющих микроорганизмов. После, был замечен французскими учеными и был приглашен в престижный и ведущий европейский Институт Пастера. Он отказался, поставив условие размещения лаборатории в тихой деревне. Такое место нашлось в деревне Бри, в которой он проработал до 1953 года до самой смерти. В это время он занимался почвенными культурами микроорганизмов, выделили железо-, азот-, серо- окисляющие бактерии. Его Мемуары были переданы в академию наук СССР, потом были утеряны и найдены впоследствии в 1990-х годах. Мемуары Виноградского были расшифрованы и опубликованы с комментариями.

Открытие антибиотиков

В 1927 году Александр Флеминг (врач, работал в больнице святой Марии, Лондон) открыл пенициллин, занимаясь поиском лекарства от золотистого стафилококка. Изначально он проводил опыты с лизоцимом, который действует на пептиды глюкан, растворяет его, вызывая гибель клеток. Один раз, он уехал в отпуск, оставив чашки Петри с золотистым стафилококком не помытыми. По возвращению, он обнаружил, что на некоторых Чашках вырос зеленый гриб Пенициллин, вокруг которого растворились колонии стафилококка. Флеминг сделал вывод, что Пенициллин содержит вещества, вызывающие гибель золотистого стафилококка. Он начал выделять это вещество, которое назвал «пенициллин». Однако, будучи врачом, а не биологом, безуспешно. В 1939 году вспомнили, о существовании вещества пенициллина, который подавляет рост грамположительных микроорганизмов. Именно такие организмы вызывают гангрену (газовую гангрену), которая стала широко распространена среди солдат. Попадая в организм, гангрена приводит к необходимости ампутации конечности.

Флори и Чейн стали искать способ очистки пенициллина, производимого с помощью микробиологического матраса. Выход пенициллина Флеминга — *Penicillium notatum* составлял около 1-2 ед/мл. В 1945 году Флори, Чейну и Флемингу была присуждена Нобелевская премия за открытие пенициллина и способа его очистки. Зинаида Васильева Ермольева, создала продуцент пенициллина 28 ед/мл, что так же считается малым количеством. Современное производство *P. chrysomalus* достигает объемов 7 миллионов ед/л или 7 г/л. Флори и Чейн поставили перед собой задачу повысить выход пенициллина и нашли, что лучше всего пенициллин растет в подгнившей дыне. Из первого обнаруженного штамма-продуцента было получено 7 ед/мл пенициллина. Для улучшения выхода, штамм обрабатывали различными мутагенами, проводя селекцию. Для этого из каждой колонии после мутагенеза отбирали самые высокопродуктивные штаммы и проводили мутагенез заново. На настоящий момент, пенициллин самый производимый антибиотик в мире. 90 % всего производства антибиотиков расходуется в сельском хозяйстве и выводится из организма животных в природу, накапливаясь и приводя к образованию устойчивых к пенициллину организмов. Производители сельского хозяйства утверждают, что без антибиотиков невозможно производство необходимого объема товарного мяса, во

избежание голода. Из-за тесного содержания животных на сельскохозяйственных фермах, болезнь приводит к полному вырезанию поголовья животных.

После распространения антибиотиков в мире, Зelman Ваксман считал, что в почве множество микроорганизмов, среди которых постоянно происходит борьба друг с другом. Для подавления роста конкурента возможно выделение антибиотиков среди этих организмов. Он установил, что стрептомицеты синтезируют токсичные антибиотики, которые нельзя применять. В 1952 году он был удостоен Нобелевской премии по медицине.

В базе данных, находятся 50'000 антибиотиков, но их нельзя использовать из-за их токсичности. Для каждого вещества существует свой способ превращения в нетоксичный антибиотик, однако, эта модификация занимает много времени.

К 1960 годам во всем мире была сформирована технология производства антибиотиков. После открытия структуры ДНК была открыта трансформация микроорганизмов, перенос голый ДНК в клетку, открыты фаги, транспозоны, трансдукция, реструктурирующие молекулы, гены и др.. В основном, генетические исследования ведутся на *Escherichia coli* из-за детально изученного генома и механизма работы с ним. Так же, используются стрептомицеты. С 1960-1970 х годов берет начало биотехнология микроорганизмов, с помощью которых получают полезные вещества от аминокислот, стероидных гормонов до белков человека — интерферонах.

Лекция 2. Бактерии и археи

Таксономические ранги

Сегодня рассмотрим, как отдельные реакции биокибернетических систем менялись с эволюцией, как приспосабливались к изменению окружающих систем. Сравнивая организмы, которые стоят на разных ветвях филогенетического древа, уже количественно можно проследить, например, скорость этой самой эволюции.

Таблица 2.1. Пример классификации таксонов

Домен	<i>Bacteria</i>
Филум	<i>Proteobacteria</i>
Класс	<i>γ- протееобактерии</i>
Порядок	<i>Eubacteriales</i>
Семейство	<i>Eutrobacteriaceae</i>
Род	<i>Escherichia</i>
Вид (подвид)	<i>E. coli</i>

На прошлой лекции мы говорили, что Карл Вёзе который впервые начал продвигать идею трехдоменного филогенетического порядка всех живых организмов. Он первым открыл, что среди прокариот есть 2 больших домена — это археи и бактерии. Затем, стали изучать в чем же различия между бактериями и археями и нашли целый ряд различий между этими двумя доменами прокариот. Отмечают, что больше сходства было обнаружено между археями и эукариями, чем между представителями двумя доменами прокариот. В таблице 2.2 наглядно представлен эти отличия.

Таблица 2.2. Отличия домен прокариот

Свойства	Bacteria	Archaea	Eukarya
Оформленное ядро	-	-	+
Внутриклеточные органеллы	-	-	+
Клеточная стенка	Пептиды глюкан + мурамовая кислота	Различные типы пептидов, мурамовой кислоты нет	Различные типы пептидов, мурамовой кислоты нет
Липиды мембраны	Сложные эфиры глицерина с кислотой + органическая кислота	Простые эфиры глицерола + спирта	Как у <i>Bacteria</i>
Газовые вакуоли	+	+	-
Полицистронная мРНК	+	+	-
Рибосомы (размер)	70 S	70 S	80 S
Фактор элонгации 2	Не чувствителен к действию	Чувствителен к действию	Чувствителен к действию

	дифтерийного токсина	дифтерийного токсина	дифтерийного токсина
Чувствительность к Хлораномеколу и канамицину	+	-	-
Чувствительность к анизомикину	-	+	+
ДНК-зависимая РНК-полимераза	Один класс	Один класс	3 класса
Структура РНК- полимераз	Простые субъединицы (4 субъединиц)	Сложная структура (8 — 12 субъединиц)	Сложная структура (12 — 14 субъединиц)
Чувствительность к рифампицину	+	-	-
Метаболизм			
Сходства АТФаз (по структуре субъединиц)	-	+	+
Способность к метаногенезу	-	+	-
Фиксация атмосферного N ₂	-	+	-
Хлорофильный фотосинтез	+	-	+
Хемолитоавтотрофия	+	+	-

Липидные структуры формируют бислой, когда мембрана с двух сторон окружена гидрофобным слоем, а внутри мембраны гидрофильное состояние, что хорошо видно на электронной микрофотографии — средний слой мембраны более электронно-прозрачен.

У Archaea, остатки спиртов иногда достигают 18 — 22 углеродных единиц и так же формируют гидрофильные и гидрофобные области мембран. Часто, у архей хвосты мембранного бислоя имеют на конце СН₃ группу и образуют непрерывную цепочку без гидрофильного состояния. Мембраны без гидрофильного просвета характерны для архей, проживающих в экстремальных условиях высокой температуры, солености и pH. Так, получается однослойная мембрана, некоторые ученые связывают с устойчивостью архей к различным неблагоприятным условиям. Так же, считается что эти мембраны трудны для проникновения различных факторов, сохраняя таким образом клетку в неизменном виде

Метаногены

Считается, что археи более древний вид прокариотического организма, которые выжили на Земле в течении долгого периода эволюции, когда другие более развитые организмы завоевывали свое пространство на земле отвоевывали места питания, субстраты у более примитивных древних организмов. С появлением кислорода, у

микроорганизмов появилось больше энергии, но все-таки археи существуют до нашего времени, и они существуют в таких местах обитания, в которых у них мало конкурентов. Например, для метаногенов это полностью анаэробные места обитания. Метаногены не переносят кислород, очень небольшая часть метаногенов может бороться с вредным для них действием кислорода с помощью ферментных систем которые реагируют на присутствие кислорода или перекиси водорода. Этим процессам посвящены специальные исследования, а во многих лабораториях мира.

Метаногены занимают очень важную экологическую нишу на земле — они стоят у последнего этапа преобразования отмершего органического вещества в возобновляемые вещества. Они образуют метан на последнем этапе разложения органического вещества. Образуют метан и CO_2 не только из органического вещества, а также из водорода и CO_2 . Это тоже очень важная вещь, например, для функционирования синтрофных микроорганизмов и они единственные, кто может разлагать многоуглеродные соединения — ацетат (более 2 углеродов). Остальные субстраты метаногенезе это одноуглеродные соединения — метанол, метилсерные соединения, метилированные амины, CO_2 . Они строгие анаэробы, живут, занимая такие экологические ниши где нет кислорода — это болота и заболоченные участки суши, осадки озер, иногда остатки морей. Там метаногены не могут конкурировать с сульфат-редукторами — сульфат редукторы быстрее и эффективнее перерабатывают органические вещества в энергию в CO_2 , расщепляют их. Но в тех местах где нет, например, нитратов или сульфатов, метаногены чувствуют себя превосходно, поскольку у них нет конкурентов. Метаногены единственные организмы на земле, которые могут разлагать ацетат в незасоленных местах обитания, если есть сульфат нитрат, то ацетат очень легко разлагаются в анаэробных условиях, поскольку переносятся электроны с ацетата может функционировать цикл Кребса в анаэробных условиях тоже, запретов. В анаэробных условиях, там, где нет сульфата нитрата, там проблема разложения остается, потому что нет таких организмов кроме метаногенов, которые могли бы расщеплять ацетат. Ацетат расщепляется метаногенами очень эффективно, есть специальная группа метаногенов — ацетокластические, так называемые метаногены, которые из ацетата образуют CO_2 и метан. Обнаружено большое разнообразие семейства метаногенов, так что, это очень такая распространенная и разветвленная группа организмов, относящихся к археям.

Галоархеи

Большая группа, которую изучают с начала 20 столетия, это так называемые галоархеи — это микроорганизмы, которые растут в очень засоленных местах обитания. На земле есть несколько таких засоленных мест — это солевые озера. Например, в России, это Эльтон, Баскунчак, мертвое море в Израиле. Микроорганизмы так же растут в солевых озерах, на поверхности засоленной рыбы. Галоархеи — анаэробы, у них мало конкурентов потому что они могут выдерживать насыщенный раствор NaCl и при этом расти. У галоархей есть специальные системы, которые позволяют выбрасывать ненужные и токсичные для них ионы из клеток с помощью специальных механизмов транспорта. У галоархей обнаружен специальный тип фотосинтеза, так называемый бактериальный фотосинтез которые идет с помощью родопсина. Родопсин — это белки которые занимают положение и реагирует на свет реагируют выбросом протона, то есть, работает как протонная помпа. По своей

структуре, напоминает механизм работы человеческого глаза, поэтому эти микроорганизмы изучаются очень давно и очень интенсивно, для понимания, как функционирует система распознавания света и что происходит при освещении родопсина. В клетке присутствует так называемый быстрый и медленный родопсин. Родопсины, которые реагируют на свет, позволяют клетке двигаться в область наилучшего / оптимального освещения для оптимального освещения, поэтому родопсины в клетке разные.

Метаногены и галоархеи относятся к филогенетической линии *Euryarchaeota*.

Crenarhaeota — серометаболизирующие археи, которые могут окислять и восстанавливать серу в анаэробных условиях. Живут они в очень экстремальных условиях высокой температуры, низкого pH, поскольку при окислении серы за счет кислорода воздуха получается ион серной кислоты. Горячие серные источники распространены в области вулканической деятельности при разных видах разломов земной коры, при сдвиге платформ. К таким очагам относятся долина гейзеров на Камчатке, Йеллоустонский национальный парк, ряд вулканических островов близко к Японии. Другими словами, в условиях горячих и кислых серных источников можно найти эти микроорганизмы, которые являются и аэробами и анаэробами, они и автотрофы и гетеротрофы, они растут в таких специфических местах обитания где у них практически отсутствуют конкуренты, что может служить причиной, по которой эти археи сохранились до сих пор.

Kurarchaeota (юные археи). В данную линию выделено 2-3 организма. В последнее время выделяют ещё несколько филогенетических линий у архей — *Nanoarchaeota* и *Taumarchaeota*, в которых так же выделены, очищены и могут культивироваться максимум 2-3 организма. В год предлагают, примерно 2-3 новых филогенетических линий, обсуждают их плюсы и минусы выделения в новые таксономические ранги.

Разнообразие биоорганизмов

Разнообразие микроорганизмов посвящено очень много исследований. Во всем мире люди интересуются биоразнообразием, в том числе и биоразнообразием микроорганизмов. На прошлой лекции приводился пример того, сколько организмов присутствует на земле, и сколько идентифицировано среди растений, животных, микроорганизмов. Микроорганизмы самой неисследованной группой организмов на земле. Нам известно менее 1 % от всех микроорганизмов, которые растут, мы знаем их последовательности 16 S рибосомальной РНК, но не можем культивировать эти микроорганизмы. Приводился пример, что даже в таком распространенном местообитании и, казалось бы, давно должно быть изучена, как толстый кишечник человека: около 50 — 60% видов микроорганизмов которые не культивируются, которые растут только в кишечнике. Мы не знаем их потребностей, питательных потребностей, поэтому мы их не можем культивировать в лаборатории. Все время стараются выделить все новые и новые микроорганизмы, идентифицировать их, но пока что это невозможно. Но техника не стоит на месте, в микробиологии очень сильно помогает изучение отдельной клетки. Сейчас, есть такие приборы, которые могут секвенировать геном отдельной клетки, но всё равно остается проблема с культивированием, но по крайней мере, известно, что конкретная клетка принадлежит к определенному таксону, что позволяет идентифицировать клетку и провести

количественный анализ. Однако главной проблемой остается процесс идентификации и выращивания микроорганизмов в лабораториях, потому что без этого невозможно представить метаболизм. Возможно только представить, из данных генома, как может идти метаболизм. Но вы не знаете какие гены экспрессируются, какие гены молчат какие гены не участвует в метаболизме, какие гены присутствуют и отсутствуют, то есть, вы можете только предположить, какой метаболизм у этой бактерии.

Принято считать, что прокариотические микроорганизмы маленькие, а эукариотические организмы — большие. Так, прокариотическая клетка это 1-3 микрон в диаметре, а в длину 1 микрон в диаметре, если это палочки или кокки — 2 микрона в диаметре. Однако уже давно известно, что есть более-менее большие клетки прокариотических микроорганизмов, например, это клетки *Beggiatoa*, которые могут достигать в длину до 100 микрон с диаметром 50 микрон, и которые хорошо видны под световым микроскопом. Первый гигантский прокариот был выделен из кишечника, рыбы-хирурга который обитает в красном море. Оказалось, что в кишечнике этой рыбы находятся микроорганизмы, которые называются *Epulopiscium fishelsonii*. Это клетка веретенообразной вытянутой формой с щелью, размер её достигает 600 микрон — 0.6 мм. Такую клетку можно видеть невооруженным глазом. Внутри клетки образуется от 1 до 7 дочерних клеток, которая выходят через боковую щель материнской клетки. После выхода, они начинают свою собственную жизнь и имеют размеры 600 микрон в длину и 80 микрон в диаметре. Эти клетки плавают за счет жгутиков, скорость передвижения была установлена 2,4 см/мин. Аналогичные клетки были выделены из тех же рыб (рыба-хирург), которые водятся на большом барьерном рифе в Австралии. Таким образом, такие клетки приурочены к определенному виду рыб. Но это не самые большие клетки, которые были обнаружены. В 90-х годах у берегов Намибии, были обнаружены гигантские сферические клетки с диаметром 750 микрон. Эти клетки имели самый большой диаметр — от 600 до 750 микрон. Эти клетки практически набиты маленькими капельками серы, которые очень хорошо отражают солнечный свет. Капельки серы находятся в гигантских вакуолях, которая занимает практически весь объем клетки. Эти клетки на свету отражают хорошо свет, имеют слабое свечение, за что получили название серная Намибии Маргарита. Такие же клетки от того же вида были обнаружены на другом континенте, у берегов Чили, но оба места обитания характеризуется специфическим явлением, которое называется апвеллинг. Апвеллинг, это явление, когда с суши постоянно дует сильный ветер, который сгоняет прибрежные воды в глубь открытого океана туда, а соответственно их заполняют воды, которые поднимаются со дна и уже на дне, поскольку это ещё довольно мелкие места, скапливается органическое отмершее вещество. Соответственно, органика поднимает к поверхности сероводород, который является субстратом для Маргариты, и уже они окисляют сероводород и откладывают серу внутри клетки. Если сероводорода мало они постепенно начинают окислять серу, превращая ее в ион серной кислоты и фиксирует при этом CO₂. Некоторые являются миксотрофами — когда могут одновременно фиксировать CO₂ и использовать органическое вещество. Эти микроорганизмы формируют большие скопления — на 1 м² можно насчитать до 42 г сырых клеток. В таблице 2.3. представлено сравнение размеров и объемов разных клеток.

Таблица 2.3. Сравнение размеров и объемов разных клеток

V, мкм ³	Размер, мкм	Вид
---------------------	-------------	-----

200 * 10 ⁶	750	<i>Thiomargaritum</i>
3 * 10 ⁶	600 * 80	<i>Epulopiscium</i>
1 * 10 ⁶	160 * 50	<i>Beggiatoa</i>
1-2	1,2 * 0,5	<i>E.coli</i>

Прокариотические клетки, которые всегда считались маленькими, невидимые человеческому глазу, могут различаться по объему в 200 миллионов раз, это и есть биоразнообразие прокариотических клеток. С другой стороны, эукариотические клетки являются большими по размеру (средний размер эукариотической клетки 50 — 100 микрон), они хорошо видны под световым микроскопом, даже с не очень большим увеличением. Обычно, бактериальные фильтры, которые применяли для фильтрации воды они имеют диаметр пор 0.45 мкм и 0.22 мкм. Считалось, что через эти фильтры ни один из микроорганизмов пролезть не может, потому что фильтры будут задерживать всё. Через такие фильтры довольно сложно фильтровать, они довольно быстро забиваются, даже титрование 50 — 100 миллилитров проходит с трудом. Фильтры такого размера считались достаточными для применения (бактериальный фильтр), однако 15 лет назад при использовании ультрафильтров в мировом океане обнаружили водоросли, которые содержат в себе хлоропласты, митохондрии и все остальные необходимые органеллы в клетке, размером 1-2 микрон — *Nanochlorum eukaryotum*. Эта микроскопическая водоросль была обнаружена, только когда были применены ультрафильтры. Их интенсивно изучают, из-за маленьких размеров, чтобы понять, как она функционирует. Оказалось, что таких клеток в мировом океане на поверхностных водах довольно много и соответственно, эти клетки вносят значительный вклад в первичную фиксацию CO₂ на земле и океанах, они должны быть учтены в глобальных расчетах экологов и ученых, которые занимаются расчетами глобальных циклов углерода.

Другие обнаруженные мелкие бактерии, которые были названы ультрамикробактериями, и получили название *Shingomonas sp.* (далее, указывается номер). Их выделяют методом последовательных разведений, это не простой способ, так как на выходе получается 0.01% от всех живых клеток ультрамикробактерии. Размер клеток 0.05 — 0.09 мкм³, что соответствует диаметру шара 0.25 — 0.30 мкм. Эти микроорганизмы являются олиготрофами, они растут на очень разбавленных средах с низкими концентрациями питательных веществ. Для роста им нужен аланин и глюкоза, скорость транспорта 0.01 нм/мг белка, если с такой скоростью будет потребляться глюкоза из раствора, который можно обнаружить в свободном виде в мировом океане, то скорость генерации этих водорослей будет достигать 25 лет, что невозможно по экологическим соображениям. Тогда, было выдвинуто предположение, что микроорганизм растет в виде биопленки. Обычно, биопленки формируются на поверхности каких-то веществ — кусочек песка или скалы, поверхность растения, или даже поверхность рыбы. На таких местах обитания, концентрация глюкозы из раствора стремится собраться в форме кристаллов — на более устойчивой поверхности концентрация глюкозы может возрасти от 10 до 100 раз, поэтому, соответственно и время генерации таких микроорганизмов может быть и выше чем у обнаруженной в природе. Поэтому больше нельзя утверждать, что микроорганизмы прокариоты маленькие, а организмы эукариоты — большие, и среди тех и других встречаются исключения как по размеру, так и по своему метаболизму.

Рост микроорганизмов

Рост микроорганизмов начинается с питания. Питательные особенности микроорганизмов очень разнообразны. Таблица 2.4 позволяет оценить и представить себе, как можно использовать энергию, источники энергии и углерод уже из разных источников макро- и микроорганизмами.

Таблица 2.4. Использование энергии и углерода микро- и макроорганизмами

Источник энергии	Донор электронов	Источник углерода	Название типа питания
Свет	Неорганическое вещество (вода для растений, сера для микроорганизмов)	Неорганическое вещество	Фотолитоавтотрофы (растения и микроорганизмы)
Свет	Органическое вещество	Неорганическое вещество	Фотоорганавтотрофы (микроорганизмы)
Свет	Неорганическое вещество	Органическое вещество	Фотолитогетеротрофы (микроорганизмы)
Свет	Органическое вещество	Органическое вещество	Фотоорганогетеротрофы (микроорганизмы)
Химическое вещество	Неорганическое вещество	Неорганическое вещество	Хемолитоавтотроф (микроорганизмы)
Химическое вещество	Органическое вещество	Неорганическое вещество	Хемоорганавтотроф (микроорганизмы)
Химическое вещество	Неорганическое вещество	Органическое вещество	Хемолитогетеротроф (микроорганизмы)
Химическое вещество	Органическое вещество	Органическое вещество	Хемоорганогетеротроф (животные, микроорганизмы)

Все 8 типов питания могут осуществляться микроорганизмами, и только 2 типа питания присущи растениям и животным. Метаболические возможности и биоразнообразие микроорганизмов гигантское, они могут использовать большое количество веществ, которые содержат углерод или минеральные вещества. При выращивании микроорганизмов, нужно создавать среды, в которых они нуждаются, что является нетривиальной задачей для микробиологов. Чтобы узнать все вещества, необходимые организму, необходимо потратить время на выяснение всех необходимых веществ, добавить их в среду питания, а также, установить концентрацию веществ, в которой они должны находиться для роста микроорганизма. Такой эксперимент был сделан в 1950 годы для молочнокислого организма, который проводит гетероферментативное молочное брожение. Эти микроорганизм хорошо развиваются на средах с молоком и различных органических отварах, но их состав до сих пор неизвестен, поэтому они до сих пор носят название «сложные среды с неизвестным составом». Когда поставили задачу выяснить деятельность этого организма (молочнокислые бактерии одни из самых требовательных микроорганизмов к составу питательных сред), установили, что среда содержала 124 компонента для роста

микроорганизма с той же скоростью, как и на природных средах, содержащих молоко. Сейчас разработано более 300 питательных сред, но большинство из них неизвестного состава — они натуральные, на натуральных отварах, на них растут микроорганизмы, потребности которых неизвестны, так как не можем выделить эти микроорганизмы в чистом виде. Сейчас, изучается, какие нужны витамины микроорганизмам и какие функции они выполняют. С другой стороны, существуют микроорганизмы, которые являются автотрофами. Для функционирования и роста им вообще не нужны никакие вещества — они синтезируют все вещества из простых минеральных веществ. Например, эти автотрофы растут на минеральной среде, источником углерода них является глюкоза, а все витамины и аминокислоты они синтезируют сами для себя, поэтому такие микроорганизмы легко выращивать. С другой стороны, есть микроорганизмы среди метаногенов, анаэробных архей, которые растут на средах, содержащих водород и в газовой фазе, поэтому нужно или перемешивать среду, или барботировать стерильной смесью водорода и CO₂. Такие микроорганизмы очень часто требует добавки жидкости рубца в пропорции 50 мл на литр среды. Что находится в жидкости рубца, так необходимого микроорганизмам — причина длительного исследования.

Витамины

Витамины необходимы для любого организма поскольку это кофакторы ферментов. Часть витаминов человек получает с пищей, часть витаминов, например, группы В, образуют наши собственные микроорганизмы, живущие в кишечнике, поэтому мы не зависим от пищевых источников витаминов, которые не синтезируются в нашем организме. Например, человек должен потреблять витамин С 50 миллиграмм в день ежедневно. Если не употреблять витамин С на протяжении длительного времени, то, как путешественники, которые отправлялись в широты Арктики и Антарктики, заболевали цингой — это довольно серьезное заболевание, от которого можно умереть. Лечится цинга добавкой витамина С. Коренные народы восполняют дефицит витамина С путем поедания сырого мяса, рыбы, пьют ещё теплую кровь убитых животных. Из мяса они получают достаточное количество витамина С поэтому они обычно не болеют цингой, а путешественники, которые такие виды пищи не особенно воспринимают, заболевают. Еще один известный случай был в Японии. С приходом технологий японцы перешли на использование так называемого, полированного риса — рисовую шелуху отшелушивали в больших барабанах, и оставалось только ядро риса. После, началась эпидемия, которую японцы назвали бере-бере. Так, было установлено, что болезнь вызвана дефицитом витамина В, который находился в рисовой шелухе. Альтернатива — пить пиво, например, потому что в пивных дрожжах находится большое количество витамина В и людям у которых возникает фурункулез (тоже дефицит витамина В) прописывают пить пивные дрожжи. Пивные дрожжи продают в аптеках, раньше продавали на пивных заводах как остатки от пивного производства. При их употреблении, болезнь очень быстро проходила.

Лекция 3. Свойства микроорганизмов

У некоторых микроорганизмов очень сложные питательные требования к субстрату, среде обитания и питания. У других, довольно простые — они могут синтезировать все необходимые вещества сами. Микроорганизмы делятся по питательным потребностям на гетеротрофы, автотрофы и др.. Для того чтобы осуществлять метаболизм, клетке нужны функционирующие ферменты. Простетические группы ферментов содержат вещества необходимые для синтеза клеточных компонентов. Для функционирования нормального метаболизма в клетке присутствуют витамины, большая часть из которых являются кофакторами различных ферментов.

Функции витаминов

Парааминобензойная кислота парааминобензойная кислота является предшественником фолиевой кислоты в организме, а фолаты — производные фолиевой кислоты участвуют в качестве протетических групп и в качестве переносчиков C1 фрагментов — фрагментов, состоящих из 1 углеродной единицы (одного углеродного атома). Они могут иметь разную структуру, это метильные радикалы, СО-группы, СН-группы и другие. Фолиевая кислота принимает участие в C1 метаболизме — переносе C1 радикалов СН₃-группы.

Биотин (витамин Н) — принимает участие в ферментативном биосинтезе жирных кислот, реакциях бета декарбоксилирования и в очень важных кожных реакциях фиксации CO₂ (гетеротрофная фиксации CO₂)

Кобаламин (витамин В₁₂) — участвует в восстановлении и переносе фрагментов C1 цепей, а также принимают участие в синтезе дезоксирибозы и синтеза ДНК

Липоевая кислота (витамин N) — принимает участие в переносе от ацильных групп и альфа-кетоглутарата

Никотиновая кислота, ниацин (витамин В₅) — предшественник пиридин нуклеотида NAD (никотинамидадинуклеотида), участвует в переносе электрона в окислительно-восстановительных реакциях, связанных с восстановлением пиридиндинуклеотида.

Пантотеновая кислота — является предшественником кофермента а. CoA — это центральный метаболит клетки, а ацетилCoA играет очень важную роль в клетке предшественников и является субстратом цикла Кребса. Поэтому CoA производные различных жирных кислот играют очень большую роль в клетке и, соответственно, активирует пантотеновую кислоту, ацетил и другие ацильные производные клетки.

Рибофлавин (витамин В₂) — является предшественником таких флавинов, как флавиномононуклеотид и флавинадениндинуклеотид (FAD). Вовлечен в метаболизм флавопротеинов и флавиновых ферментов.

Тиамин (витамин В₁) — участвует в реакции альфа декарбоксилирования и входит в простетическую группу транскаталазы.

Витамин В₆ — участвует в превращении amino- и кетокислот

Витамины группы В, принимают участие в транспорте электронов электрон-транспортной цепи и в синтезе сфинголипидов компонентов мембраны (клеточной оболочки).

Гидроксаматы иногда причисляют к витаминам иногда нет, но это вещества, которые способствуют переносу железа внутри клетки. Если при нормальных условиях,

при доступе кислорода и при нормальных значениях pH около 7 железо не представляет собой а осадок, то закиси железа являются практически нерастворимым соединением, потому что константа растворимости этих веществ 10^{-18} моль, а считается, что клеткам доступны вещества, у которых в конце растворимости не менее 10^{-9} моль, то есть нМ. Железо является очень важным компонентом в любой клетке любого организма и микроорганизма, поскольку железо входит в состав цитохромоксидазы, железосерных соединений, железосерных кластеров многих ферментов, входит в очень большой круг ферментативной активности, и в виде компонента самих коферментов. Поэтому микроорганизмы, участвуют в транспорте железа через цитоплазматическую мембрану с помощью гидроавтоматических свойств. Они обладают разным строением, но их общим свойством является то, что они связывают трехвалентное железо, переносят его через цитоплазматическую мембрану в внутри клетки. Внутри клетки трехвалентное железо восстанавливается до двухвалентного железа. У двухвалентного железа к гидроксаматам сродства практически нет, поэтому двухвалентное железо отваливается от гидроксамата, гидроксамат снова транспортируются вне клетки и цикл снова повторяется.

Кофермент М — компонент архейных клеток, метаногенов. Принимает участие в биосинтезе метана.

Важными элементами клетки являются микроэлементы — обычно, это ионы металлов. Немного уделим внимание макро- и микроэлементам среды выращивания клеток. К макроэлементам относятся такие вещества, которые содержатся в большом количестве в среде (соединения С, Н, О, N, S, Р, Na, К, Mg, Са) — концентрации достигают миллимолярных значений. Существуют вещества, которые нужны в микромолярных концентрациях — микроэлементы. Микроэлементы так же очень важны для питания человека, если организм лишен микроэлементов, то какие-нибудь функции будут угасать, некоторые ферменты не смогут синтезироваться так как содержа в активных центрах этот микроэлемент, а организм не сможет расти без этих элементов. Обычно, потребность в микроэлементах удовлетворяется с обычной водой. Питьевая вода содержит микроэлементы, но если, например, готовить пищу и пить только дистиллированную воду, то дефицит микроэлементов наступит довольно быстро, а например, все поверхностные воды, которые поступают в наш водопровод, содержат достаточное количество микроэлементов. Очень редко на земле есть области, где того или иного микроэлемента не хватает. Тогда, нужно специальным образом доставлять микроэлементы с пищей.

К микроэлементам относятся такие металлы как:

Хром требуется животным для метаболизма глюкозы. Для микроорганизмов функция хрома не известна.

Кобальт является структурным элементом витамина В12. Витамин В12 нужен для метаболизма С1 соединений, а кобальт расположен как раз в середине кольца витамина В12. Соответственно он принимает участие в транскарбоксилазных реакциях и переносе одноуглеродных единиц

Медь является компонентом цитохромоксидазы. Цитохромоксидаза — это фермент, который стоит на конечном этапе электрон транспортной цепи митохондрий и у бактерий и у архей, дышащих кислородом, это основной фермент, взаимодействующий с кислородом. Супероксиддисмутазы и купридоксины так же содержат медь. Купридоксины это небольшие голубые белки, которые содержат медь в

качестве активного центра этих белков. Супероксиддисмутазы — это ферменты которые превращают супероксид радикал в менее токсичную перекись водорода и таким образом они избавляют клетку от кислородного стресса или стресса вызываемого активными формами кислорода, такими как супероксид радикал.

Марганец является активатором многих ферментов. Супероксиддисмутазы также имеют марганец и у растений это очень важно, что входит в состав фотосистемы 2, которая расщепляет воду на протоны и кислород.

Молибден участвует в фиксации атмосферного азота микроорганизмами, входит в состав нитратредуктазы, сульфитоксидазы, некоторых формиадегидрогеназ и оксотрансфераз.

Никель входит в состав большинства гидрогеназ, ферментов, которые или поглощают водород и расщепляют его на протоны и электроны или наоборот, выделяющие гидрогеназы из двух протонов и двух электронов делают молекулу водорода. Кофермент F430 так же содержит никель — это компонент метанвыделяющей системы архей. СО-дегидрогеназа и уреазы (фермента, расщепляющий мочевину).

Селен входит в состав некоторых гидрогеназ, формиадегидрогеназ, кислоты селеноцистеин.

Вольфрам входит в состав некоторых формиадегидрогеназ, оксотрансфераз и ферридоксин оксидоредуктаз.

Ванадий входит в ванадийсодержащую нитрогеназу и бромзависимую пероксидазу.

Цинк является компонентом карбоангидразы — фермент, который способствует растворению CO₂ в воде и РНК и ДНК полимераз. Соответственно, много ДНК-связывающих ферментов зависит от цинка.

Железо некоторые относят к микро, некоторые к макроэлементам потому как входит в состав большого количества элементов, это цитохромоксидазы, цитохромредуктазы (содержат гем, в состав которого входит железо), каталазы, пероксидазы, железосерные белки, оксигеназы и нитрогеназы.

Химический состав E.coli.

Если посмотреть на состав микробной клетки, E.coli (Таблица 3.1)

Таблица 3.1. Химический состав клетки E.coli

Молекула	% от веса	Количество молекул на клетку	Видов молекул
Всего макромолекул	96	24'610'000	Около 2500
Белки	55	2'350'000	1850
Полисахариды	5	4'300	2
Липиды	9,1	22'000'000	4
ДНК	3,1	2,1	1
РНК	20,5	255'500	660
Мономеры	3		350
Аминокислоты +	0,5		100

их предшественники			
Сахара + их предшественники	2		50
Нуклеотиды + их предшественники	0,5		200
Неорганические ионы	1		18
Всего	100		

Вес одной клетки *E.coli* составляет $2,8 \cdot 10^{-13}$ гр. Огромное количество веществ должно быть синтезировано, для этого нужны питательные вещества для этого нужно. поступление питательных веществ в клетку.

Транспорт веществ в бактериальную клетку

Транспорт — особый механизм, который позволяет с затратой энергии переносить в клетку различные нужные вещества и создавать в клетке положительный градиент этих веществ по сравнению с теми концентрациями, которые существуют вне клетки (в окружающей среде) и очень многие вещества в природе доставляются в клетки микроорганизмов с помощью транспорта, поскольку в природе не существует таких больших концентрации веществ, которые аналогичны тем, что мы даем в лаборатории в питательные среды для выращивания микроорганизмов поскольку мы хотим вырастить микроорганизмы как можно быстрее, получить как можно большую биомассу. Это наша задача. В природе таких концентраций нет, даже если они каким-либо образом поступают в экосистемы, то он очень быстро расходуется — поскольку в природе очень много желающих употребить «вкусный» субстрат. Ученые, которые занимаются экологией микроорганизмов, установили, что в природе микроорганизмы все время живут в таких стрессовых условиях, который назван термином — условия обжорства-голодания-обжорства. Когда очень много питательных веществ одновременно поступают в какую-то экологическую нишу, например при листопаде в почву с деревьев попадает огромное количество листьев — это вброс огромного количества целлюлозы, которая начинает употребляться микроорганизмами в аэробных условиях. Обычно это грибы, которые быстро разлагают, в аналогичных условиях, это анаэробные клостридии, которые начинают проводить гидролиз животных остатков и, соответственно, из опавших листьев появляются не только целлюлоза, присутствует еще и лигнин. Сообщества организмов постепенно и с разной скоростью начинают переваривать, но листья довольно быстро перевариваются и исчезают, и снова наступает период голодания для обитателей почвенных экосистем. Так, существующие системы транспорта помогают клеткам преодолеть низкие концентрации веществ, которые в природных экосистемах существуют с пригодной для функционирования ферментов клеток, потому что все ферменты работают с низкими скоростями. Если что-то и сможет преодолеть этот барьер, который определяется константой Михаэлиса K_m . Все микроорганизмы работают в соответствии с этими константами, очень редко когда субстрат присутствует такой концентрации чтобы не превысить константу Михаэлиса. Обычно они все работают под значениями K_m .

При рассмотрении транспорта, рассмотрим диффузию — чем выше концентрация субстрата, тем выше скорость диффузии. Как только скорость диффузии достигнет барьера мембраны, диффузия прекращается, но поскольку в клетке постоянно идет потребление того вещества, которое диффундирует то скорость потребления и диффузии вещества должны быть равны. Соответственно, для живой клетки диффузия может продолжаться бесконечно.

Скорость транспорта довольно быстро нарастает в области низких концентраций и максимальная скорость достигается при низкой концентрации субстрата. Отсюда, можно рассчитать половину максимальной скорости, в точке пересечения находится константа Михаэлиса для транспортных систем. K_m имеет очень низкое значение, обычно, мкМ концентрация, а для некоторых микроорганизмов обнаружены K_m в нано диапазоне (нМ/мин на мг белка), которые обеспечивают нормальную скорость транспорта.

Диффузия бывает простая и так называемая, «облегченная». Во всех учебниках написано, что «диффузия — это не зависящий от энергии процесс, проходящий без затрат энергии». Это как раз и есть определение облегченной диффузии, когда в цитоплазматической мембране есть специальные транспортные белки, позволяющие быстро осуществлять диффузию. Благодаря наличию белков транспортеров, этот вид транспорта носит название «облегченная диффузия». Однако, белки работают и затрачивают какую-то энергию, поэтому, скорее всего, облегченная диффузия идет с небольшими затратами энергии, которую очень трудно измерить и многие склоняются к тому что, может быть, она протекает без затрат энергии.

Существует четыре механизма вторичного транспорта.

Первичный транспорт осуществляет транспорт протонов через цитоплазматическую мембрану. Будет образовываться положительный заряд снаружи и отрицательный внутри. Таким образом, градиент протонов является энергетическим зарядом клетки для осуществления других видов транспорта. Все остальные виды транспорта — вторичные.

Симпорт — с помощью первичного транспорта на мембране клетки существует наведенный градиент протонов положительный и отрицательный. Импорт бывает двух видов по градиенту протонов снаружи: протоны вносятся внутрь клетки с помощью транспорта снаружи — электронейтральный симпорт. Одновременно с этим, внутри клетки идет второй вид симпорта, который называется электрогенным — когда предварительно приведенному градиенту, протоны входят внутрь клетки и одновременно с этим входит какой-то нейтральный субстрат или вещество;

Антипорт — протон заходит внутрь клетки, а в противовес ему из клетки выходит положительно заряженное вещество, это электронейтральный антипорт. Электрогенный антипорт сопровождается выделением из клетки нейтрального вещества;

Унипорт — по градиенту протонов какой-то катион входит в клетку, с другой стороны, анион может выходить из клетки. Этот вид транспорта всегда электрогенный, поскольку диссипируется протонный градиент;

Перенос (транслокация) групп — начинается с переноса группы с фосфоенолпируват на фермент E1, образуется фосфатная группа. Затем, фосфатная группа переносится на системную группу, которая называется Н-протеин (гистидиновый фермент, белок, содержащий большую долю гистидина в составе).

После, фосфат переносится на систему А, затем в систему В и в конечном итоге, всё переносится на субстрат, который транспортируется в клетку белком переносчиком через мембрану. Субстрат попадает в клетку и фосфорилируется в клетке.

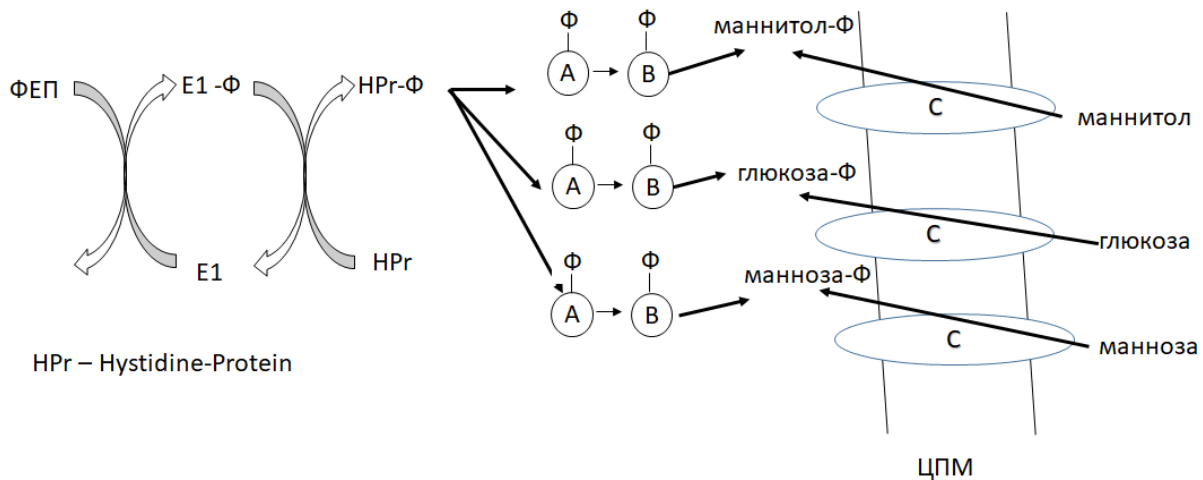


Рисунок 3.1. Транспортная система *E.coli*.

В основном, эксперименты были проведены на *E.coli*. Компоненты транспортной системы А, В и С специфичны для каждого сахара и спиртов. Системы Е1 и Н-белков действуют для всех сахаров и спиртов одновременно, поэтому, это не специфические системы

Рост микроорганизмов. Культивирование

Если организм будет развиваться без ограничений, и будет претерпевать бинарное деление (из одной клетки через время генерации образуется две клетки в геометрической прогрессии). Для *E.coli* время генерации в бульоне при 37 С, высокой аэрации составляет 20 минут. Для среды человеческого кишечника — 20 часов, то есть, клетки *E.coli* испытывают нехватку веществ, стрессовые факторы, анаэробные условия. При оптимальных условиях, популяция клеток *E.coli* через 48 часов достигнет $2,2 \cdot 10^{23}$ и их общий вес составит $0,78 \cdot 10^{30}$ г, что в 150 раз больше веса Земли.

Самая быстрорастущие клетки относятся к светящимся бактериям, симбиотным видам, время генерации — 8 минут.

Примеры генерации биомассы в сутки на основе объема в 500 кг биомассы/сутки:

Крупнорогатый скот +0.5 кг

Соя + 5 кг

Дрожжи + 50000 кг

Потенциал роста микроорганизмов огромен, чем они активно пользуются. Например, этот процесс активно используется на дрожжевых заводах (большая индустрия во всем мире).

Непрерывное культивирование микроорганизмов

Для ученых всегда было большой задачей получение клеток (микроорганизмов) в одной и той же фазе роста. Обычно, микроорганизмы развиваются по так называемой кривой роста, которая представляет собой кривую со стадиями:

- Лаг-фаза — культура, принесенная в новую среду, адаптируются к ней и имеют низкую интенсивность роста. В этот момент в клетке идут подготовка к делению — накопление или синтез необходимых веществ;
- Логарифмическая кривая (кривая экспоненциального роста) — короткая, исчерпываются питательные вещества из среды, рост происходит в замкнутом объеме, накапливаются метаболиты, накапливаются клетки, снижение диффузии кислорода, что сдерживает развитие культур.
- Стационарная фаза (фаза замедления роста)
- Фаза отмирания

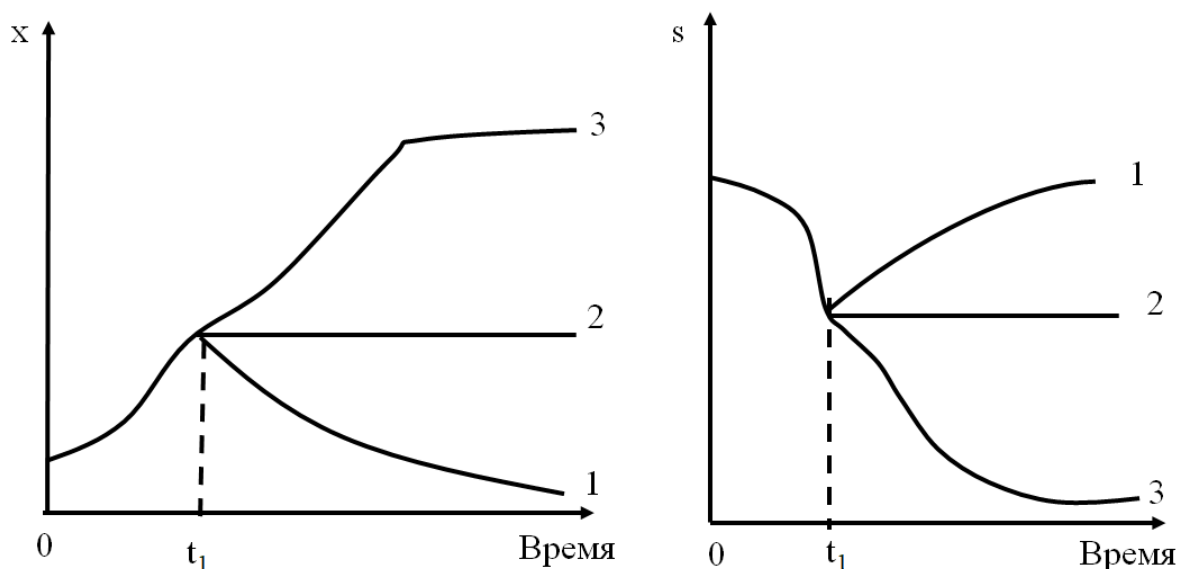


Рисунок 3.3. Кривая непрерывного культивирования микроорганизмов

Каждая фаза характеризуется определённым состоянием и физиологией клетки, поэтому, всегда было интересно получить клетки из экспоненциальной фазы, когда ферментативные активности клеток находятся на максимуме, биомасса высокая, клетки активны и всегда одинакового качества. В 1925-1927 гг, в институте микробиологии в Праге был разработан способ культивирования микроорганизма. Его принцип заключался в том, что в какой-то точке экспоненциальной фазы, когда клетки ещё активны, включали проток и клетки оставались на одном и том же уровне в проточных условиях культивирования. Достигалось это с помощью наличия стерильного резервуара среды, из которого среда непрерывно поступает в ферментер, который перемешивает культуру. Чтобы не было переполнения ферментера, на уровне устанавливают слив из которой с той же скоростью, среда с клетками поступает в приёмник, который находится в холодильнике для снижения скорости метаболизирования клеток. С помощью таких приёмов непрерывно долго достигается

получение клеток в одной и той же фазе роста. Не смотря на простую схему работы прибора, добиться хороших условий культивирования сложно.

При непрерывном культивировании, возможно три исхода:

Клетки начинают расти до культивирования, во время t включается проток, до этого времени, концентрация субстрата снижалась с исходного уровня S до S_d :

N_1 — количество подаваемой среды в ферментер уравнивает скорость деления, оптическая плотность неизменна (верный теоретический расчет). Концентрация субстрата не меняется.

N_2 — скорость подачи среды опережает рост клеток, происходит вымывание культуры из ферментера. Оптическая плотность снижается. Концентрация субстрата увеличивается до исходного уровня (значение концентрации в резервуаре)

N_3 — подача среды осуществляется с 90% скоростью от роста клеток, есть возможность выйти на стационарный уровень. Идеальный случай, у клеток есть в запасе 10% скорости. Концентрация субстрата снизится до уровня S_1 .

Непрерывное культивирование осуществляют в двух вариантах — в стадии хемостата и турбидостата. В хемостате обычно регулируется скорость роста, концентрация субстрата или каких-нибудь компонентов клетки, можно контролировать, например, содержание микроэлементов, кислорода. Регулирование работы хемостата всегда связано с регулированием химического состава среды и лимитирующих факторов роста клеток. Второй тип непрерывного культивирования — турбидостат (от turbidity — плотность, мутность), в котором система контроля за ростом микроорганизмов осуществляется с помощью отвода среды на датчик (фотометрическая ячейка). Сигнал от проходящего света улавливается фотозадающим элементом, сигнал от которого идет на электрическую цепь, которая оказывает обратную связь на работу перистальтического насоса. Система работает следующим образом: на фотометрическую ячейку постоянно прогоняется жидкость с клетками, ячейку регистрирует оптическую плотность потока с клетками, сигнал с ячейки идет на работу перистальтического насоса. Если концентрация клеток падает, то подается сигнал и перистальтический насос снижает скорость работы — снижается количество среды за счет чего увеличивается плотность клеток (скорость роста клеток не меняется), при достижении определенного лимита клеток, подается другой сигнал и перистальтический насос начинает работать с большей скоростью — среды становится больше, клетки разбавляются, оптическая плотность снижается, рост клеток увеличивается снова. Система контроля турбидостата не совершенна, потому что клетки любят прикрепляться к поверхности фотометрической ячейки, она обрастает клетками, что приводит к образованию биопленки, которая не вымывается, что приводит к постоянной ошибке измерения. В итоге, контролировать турбидостатная система становится всё сложнее и сложнее, и в конце концов весь контроль сводится на нет. Турбидостатные системы применяются реже, чем хемостатные.

Влияние физико-химических факторов на рост организма (экофизиология организма)

К химическим факторам, оказывающим влияние на физиологию микроорганизмов относятся соли, например NaCl (Таблица 3.2). По отношению к концентрации соли в окружающей среде или в субстрате, микроорганизмы делятся на 4 группы, которые называют галосоли.

Таблица 3.2. Группы галосолей

	Требуется NaCl в среде	Пример
Галотолерантные	0 — 2 М	<i>Streptococcus</i>
Слабые галофилы	0.2 — 0.5 М	Светящиеся бактерии
Средние галофилы	0.5 — 2.5 М	Морские организмы
Экстремальные галофилы	2.5 — 5.2 М	Галоархеи

Организмы, произрастающие в среде с 5.2 М NaCl встречаются в мертвом море, озере Баскунчак, солеварни. При разных концентрациях соли доминируют галоархеи — от голубого до красно-коричневого, что можно наблюдать на солеварнях.

Таблица 3.3. Концентрация соли в клетках *Halobacterium atirubrum* (археи, живущие при насыщающих концентрациях NaCl)

Ион	Концентрация в среде	Концентрация в клетке
Na	3.3 М	0.8 М
K	0.05 М	5.3 М
Mg	0.13 М	0.13 М
Cl	3.3 М	3.3 М

Данные таблицы 3.3 говорят о том, что клетки замещают вредный для них ион Na^+ на ион K^+ . Замещение протекает с помощью антипорта — выбрасывается Na^+ и закачивается K^+ .

На Земле существуют места с совершенно разными значениями pH — от горячих кислых источников, где pH может опускаться до 0.5, до солевых и щелочных озер где pH может достигать 10-11. Во всем этом диапазоне pH живут микроорганизмы, которые процветают и выдерживают эти условия. Некоторые микроорганизмы, например, уробактерии, которые разлагают мочевины, выделяют большое количество аммиака, аммиак имеет резкощелочную реакцию. Соответственно pH для этих бактерий может быть до 10-10.5, поскольку они выдерживают большое количество аммиака которые сами образует. Следующий пример того как ионы аммиака влияют на микроокружение это рост *Helicobacter pylori*. Это микроорганизм, который научился жить в желудке человека с низкими значениями pH, который в желудке нормального человека составляет 1. Не смотря на то, что *Helicobacter* не размножается в условиях экстракислого значения pH желудочного сока, он приспособился. Он залезает под эпителий желудка и начинает разлагать белки, выбрасывая ион аммиака в среду. Ион аммиака создает более нейтральное окружение вокруг бактерии. Таким образом, он защищает себя выбрасывая аммиак, питаясь тканями желудка. Поэтому, наличие *Helicobacter pylori* приводит к язве желудка. Одним из эффективных способов бороться с ним — есть красный перец.

E.coli растет при нормальном pH = 7. Если снизить значение pH до 5, то в ответ на изменение концентрации протонов в среде в 100 раз, *E.coli* начинает реагировать синтезом шаперонов — белков, позволяющих изменить конфигурацию тех белков, которые денатурируются при резкой смене pH. Белки-шапероны помогают восстановить нормальную активность поврежденных белков.

Обычно, микроорганизмы, произрастающие в неблагоприятных средах, пытаются выживать, регулируя вокруг себя pH микроокружения.

Лекция 4. Свойства бактериальных клеток.

Активность воды в бактериальной клетке

Вода и играет очень важную роль в метаболизме клетки. Без воды не проходят ферментативные реакции. Поэтому, когда воды клетки нет, никакой и активности нет, она просто отсутствует. Активность воды выражается значком, который меняет свое значение от 0 до 1. Если a_w равно 0 — это абсолютная сухость — воды нет. Если 1, то это капельная вода. a_w — это отношение давления паров воды над раствором каких-то веществ к давлению воды над абсолютно чистой дистиллированной водой — осмотическое давление в клетке. Вода всегда стремится в те области микроокружения, где наибольшая концентрация веществ, например, солей, то есть, если у вас стоят два раствора, в одном из них раствор соли, а в другом чистая вода и они разделены полупроницаемой мембраной, то вода будет стремиться по направлению к раствору соли. Соответственно, давление будет несколько подниматься и будет различно по разные стороны полупроницаемой мембраны — осмотическое давление. Если создать такие условия, что в клетке, за пределами цитоплазматической мембраны будут создаваться или искусственно вноситься какие-то вещества, которые будут иметь большие a_w , осмотическое давление или большую концентрацию растворенных веществ, вода из клетки будет стремиться уходить по направлению к этому веществу, то есть градиенту и, соответственно, клетка будет обезвоживаться.

Например, эксперимент по плазмолизу и деплазмолизу клеток лука. Для этого, на стеклышко с крупными клетками луковой чешуи капали глицерин. Глицерин начинал вытаскивать воду и цитоплазма сжималась, иногда превращаясь в круглые соединения. После, глицерин убирали докапывали дистиллированную воду, цитоплазма снова расширялась и занимала весь объем. Явление плазмолиза и деплазмолиза основано на эффекте транспорта воды из клетки через цитоплазматическую мембрану и транспорта воды внутрь клетки через ту же самую мембрану. Это значит, что осмотическое давление в клетках грамположительных микроорганизмов может достигать 20 атмосфер. Одномолярный раствор любого соединения в недиссоциированной форме дает давление 22,4 атмосферы, 10% раствор сахарозы (0,29 M) даст давление осмотическое 6,5 атмосфер, а 10% раствор NaCl (72, 02 M) даст давление в 37 атмосфер. Поэтому для консервирования продуктов применяют такие концентрации сахарозы или NaCl против клеток микроорганизмов, которые потенциально способны были бы образоваться на консервированных продуктах. Вся вода уходит, прекращается сам метаболизм (Таблица 4.1)

Таблица 4.1. активность воды в продуктах веществ

Материалы (вещества)	Активность воды	Микроорганизмы
Чистая вода	1	Caulobacter Spirillum
Кровь человека	0.995	Streptococcus E.coli
Морская вода	0.98	Псевдомонады, морские представители рода Vibrio
Хлеб	0.950	Грамположительные палочки
Ветчина, кленовый сироп	0.90	Грамположительные кокки

Салями	0.85	<i>Saccharomyces roxii</i> (дрожжи)
Фруктовые джемы	0.80	<i>Penicillium</i>
Соленая рыба, соленые озера	0.75	Галобактерии
Кукурузные хлопья, конфеты, сухофрукты	0.70-0.60	Ксерофильные грибы

Микроорганизмы, которые растут в условиях сниженной активности воды выработали приспособления, которые помогают удерживать воду в цитоплазматической мембране, чтобы она не выходила в окружающую среду. Удерживая воду, микроорганизмы могут расти развиваться и размножаться. В этом им помогают так называемые совместимые растворители или осмолиты. Совместимых растворителей много, в настоящее время у разных микроорганизмов находят разные осмолиты при разной активности воды.

Таблица 4.2. Совместимые растворители (осмолиты)

	Синтез осмолитов	Минимальная активность воды
Бактерии-нефототрофы	Глицин-бетаин Пролин (грамположительные микроорганизмы) Глутамат (грамотрицательные микроорганизмы)	0.90
Пресноводные цианобактерии	Сахароза Трегалоза	0.98
Морские цианобактерии	Альфа глюкозил глицерин	0.92
Морские водоросли	Манит Пролин Гликозиды Диметилсульфон-пропионат	0.92
Цианобактерии соленых озер	Глицин-бетаин	0.90-0.75
Галофильные аноксигенные фотосинтезирующие бактерии рода <i>Ectothion rhodopsia</i>	Глицин-бетаин Трегалоза Эктоин	0.90-0.75
Экстремально галофильные археи	K^+ в клетку (в обмен на Na^+)	0.75
<i>Dunaliella</i>	Глицерол	0.75
Ксерофильные дрожжи	Глицерол	0.70
Ксерофильные грибы	Глицерол	0.62

Глицерол — самый мощный осмолит, который удерживает воду внутри клетки, поэтому, клетки могут расти при высокой степени засушенности и низкой активности воды. Глицерин-бетаин был впервые обнаружен в корнеплоде сахарной свеклы, которая синтезирует сахарозу в большой концентрации, соответственно из клетки вода

при такой концентрации уходит в сторону сахарозы (в межклетники), то есть, клетка теряет воду. Чтобы избежать потерю воды, свекла приспособилась синтезировать глицин-бетаин, который удерживает воду внутри клетки не давая ей уйти в межклетники. Второе вещество, на которое стоит обратить внимание — эктоин, синтезируется не только фототрофными бактериями, хотя в них он впервые был обнаружен, но и некоторыми метилотрофными бактериями и другими микроорганизмами. Сейчас, даже налажено биотехнологическое производство этого осмолита, его экстрагируют из клеток микроорганизмов, очищают и добавляют в косметические крема, которые помогают увлажнять кожу удерживая воду на поверхности кожи и не давая ей высыхать, применяется в косметологии.

Влияние радиации на бактериальную клетку

Радиация — очень вредное воздействие для ДНК, РНК нуклеиновых кислот и живые организмы в целом. Человечество узнало о радиоактивных веществах еще со времен работы Кюри с радием, выработало меры защиты. После, когда начали изучать влияние радиации на микроорганизмы, выяснили, что есть некоторые микроорганизмы чрезвычайно устойчивые к действию радиации. Примером таких это кого микроорганизмы являются *Deinococcus radiodurans* (устойчивые к радиации). Этот организм может выдерживает в 10000 раз большее облучение, по сравнению, например, с клетками и *E.coli* и может также продолжать расти. Причина такого устойчивого поведения *Deinococcus* до сих пор до конца не выяснена. Некоторые исследователи считают, что это связано с активностью репарационных систем клетки, которые очень быстро и эффективно репарируют повреждения ДНК и кроме того, содержание одновременно нескольких геномов — до 10 геномов на клетку. Второй, более мягкий тип излучения, которое влияет и на человека — ультрафиолетовое излучение. Ультрафиолетовые лучи с максимумом действия длины волны 260 нм соответствуют максимуму поглощения ДНК. Соответственно, при действии ультрафиолета с максимумом воздействия 260 нм, будет наблюдаться максимальное воздействие на клетку. Много исследований провели на клетках *E.coli* по действию радиации, и выяснили, что у *E.coli* есть две степени защиты против воздействия ультрафиолетового излучения — это так называемая темновая репарация и светоактивируемая репарация ДНК. При темновой репарации, клетки, подвергнутые действию ультрафиолета, при удерживании в темноте начинают постепенно репарировать повреждения которые вызывают ультрафиолетовое излучение. Основное действие ультрафиолета на клетки с максимумом длины 260 нанометров это появление в ДНК так называемых тиминных димеров, когда в двух нитях ДНК их тимины в определенных положениях сшиты между собой, что необратимо для репликации ДНК и, соответственно, в этом месте разойтись не может. Клетка погибает по причине отсутствия репликации. Однако, клетка имеет защитные механизмы, она узнает эти тиминные димеры, рестриктазами вырезает, после, ДНК-полимеразы заполняют брешь и лигазы сшивают. Клетки восстанавливают свою ДНК тоже самое практически происходит и при светоактивируемой репарации, однако репарационные системы клетки активируются видимым светом и в работу включаются система других ферментов, но их действие примерно одинаково.

В природе, на микроорганизмы, которые живут в экстремальных местах, обычно действует несколько факторов (температура давление, аэрация. влияние соли), поэтому

в природе трудно, вычленить влияние какого-то одного фактора. На фоне одних факторов действуют и другие.

Влияние температуры на бактериальную клетку

До 1988 года во всех учебниках по микробиологии, стояла такая фраза, что «максимальная температура для роста живых организмов на земле это 88°C». Где-то в конце 1980 годов начались исследования по поиску так называемых термофильных микроорганизмов а Первым из пионеров в этой области микробиологии был Томас Брук. Профессор Томас Брук работал в иллинойском университете в г. Курбана, это примерно в 200 км к югу от Чикаго, штат Иллинойс, Томас Брук поставил себе цель найти термофильные микроорганизмы из различных мест обитания. В то время, микробиологи нашли места обитания для своих исследований для отбора проб в Йеллоустоунском национальном парке, как и в других близких к вулканическим областям земли, где есть гейзеры горячие источники которые бьют из под земли с температурой больше чем 100°C, но на поверхность выходит 100° C, и вокруг них образуются горячие озера в которых рН довольно низкий и может достигать 2-1.5. Все это следствие того что в таких местах живут микроорганизмы, которые окисляют сероводород. Сероводород поступает из под земли с водой гейзера и одновременно происходят два процесса: сероводород окисляется кислородом воздуха, превращаясь в серу, сера откладывается на близлежащих камнях (отсюда название yellow stone — желтые камни), и кроме того там же присутствуют микроорганизмы которые окисляют соединения серы. Восстановленные такие как сероводород образуют в начале серу молекулярно, а затем серную кислоту и вот в горячих серных озерах, которые есть так же на Камчатке или Японии — везде где имеются геологические разломы, есть повышенная вулканическая активность. Оказалось, что есть микроорганизмы, которые могут жить при 90° при 100°, максимальная температура которая зафиксирована в научной литературе и микроорганизм который растет при максимальной температуре это 121 градус Цельсия. При таких температурах, обычно стерилизуются жидкие микробиологические среды, это как раз температура, которая возникает в автоклаве при достижении в автоклаве избыточного давления в 1 атмосферу (температура 121 градус). Мы считаем, что наши среды стерильные после такой обработки, а вот этот организм которые растет при 121°C с максимальной скоростью развивается при этой температуре, поэтому, естественно, его нельзя вырастить на поверхности в условиях обычной температуры. Это метаноген, анаэроб и его выращивают именно в таких сосудах под давлением развивая давление 1 атмосферу, нагреве сред до 121°C. Только при таких условиях он растет, более того он не растет если температура опускается ниже чем 90°, поэтому если вы будете искать микроорганизмы которые растут, например, при повышенных температурах но будете ставить ваш автоклав для того чтоб там развелись какие то микроорганизма до температуры 90° там ничего не вырастет — эти микроорганизмы там расти не будут, для них слишком холодно (таблица 4.3).

Таблица 4.3. Температура при которой развиваются организмы

Организм	Температура, °C
Животные	
Водные позвоночные	До 38

Насекомые	До 50
Растения	До 50
Эукариотические микроорганизмы	
Простейшие	До 47
Водоросли	До 70
Грибы	До 58
Прокариоты	
Фототрофы	До 84
Хемолитотрофы	До 121
Гетеротрофы	До 110

Для того, чтобы расти при таких температурах термофильным организмам (все эти механизмы до конца не поняты, но некоторые данные имеются) требуются более стабильные белки, которые имеют более высокую температурную стабильность. Не теряющие свою активность, мембранные липиды относятся к так называемым тугоплавким мембранным липидами, что можно сравнить с разными по качеству жирами, например, если мы возьмем подсолнечное масло, масло коровье (обычное сливочное масло) и сало и поместить их при одной и той же температуре, например, в холодильник при 4° С, то подсолнечное масло будет жидкое, масло сливочное будет более-менее плотное, а сало будет просто твердое. Если мы поместим их при температуре — 5°, то подсолнечное масло будет жидкое, а при температуре, например, а — 10°, оно может замерзнуть, то же самое происходит с липидами — в клетке при повышении температуры липиды становятся все более и более жидкими и при какой-то температуре они просто перестают функционировать. Мембрана начинает протекать в обе стороны и клетка перестает функционировать она просто погибает, что и является причиной тому, что при очень высоких температурах мембрана и еще остается более тугоплавкие и содержат больше гликополимеров.

Белки, обычно и ДНК и РНК так называемого Г-Ц типа у которых есть три водородных связей из нуклеотидов этих полимеров. Рибосомы также более термостойкие, они продолжают функционировать при более высоких температурах и мембраны практически всех термофильных архей имеют трехслойные мембраны (а не монослой в отличие от обычных архей). Как функционирует ДНК при таких температурах не до конца понятно, потому что даже если из самых термофильных микроорганизмов выделяют ДНК, то все равно, выделенная и очищенная ДНК плавится при тех же температурах 94-95°, как и выделенная не из термофильных организмов. Она полностью становится одноцепочечной и, казалось бы, не должна функционировать при таких температурах на что, некоторые ученые считают, что для интеграции стойкости этих ДНК и РНК, помогают какие-то белки типа гистонов, что ещё не до конца изучено молекулярными биологами.

Влияние давления на бактериальную клетку

По отношению к давлению, микроорганизмы различаются на пьезочувствительные (выдерживают давление до 1 атм., после прекращают свой рост), пьезотолерантные (до 400 атм.), пьезофильные (растут в диапазоне 400-1400 атм). При изучении микроорганизмов, проживающих в глубоких слоях океана и на дне глубоких

впадин океана, где давление достигает таких высоких значений. Так, на дне Мариинской впадины давление достигает 1100 атмосфер. В изучении таких микроорганизмов большую роль сыграла лаборатория в соединенных штатах Америки в Bloodshole, штат Массачусетс. Эта лаборатория была рассекречена в 1957 году, до этого она была закрытой военно-морской лабораторией военно-морских сил соединенных штатов Америки, где изучали действие высоких давлений на организм человека. В 1957 году её рассекретили и туда пустили гражданских исследователей. В начале 1960 годов там стал работать Хольге Янош, который защитил кандидатскую диссертацию в Германии, а уже после, переехал работать в соединенных штатах Америки, где и стал профессором. Он всю жизнь посвятил исследованию глубоководных горизонтов и микроорганизмов, которые там развиваются. Именно он обнаружил существование таких микроорганизмов, которые не растут, если не приложить давление больше, чем 400 атмосфер и нашел микроорганизмы, которые развиваются при 1100 атмосфер, но не могут выше, чем 1400 атмосфер. Пока что не обнаружены микроорганизмы, которые бы развивались при более высоких давлениях чем 1400 атмосфер. Для проведения таких исследований, соответственно требуется специальная аппаратура. При лаборатории была мастерская, в которой конструировались специальные батискафы, которые опускались на глубины 2-4 км. Пробоотборники, которые позволяли отбирать пробы грунта и воды из разных горизонтов самых глубоких мест. Так же, требовалось специальное оборудование, которое позволяло выращивать микроорганизмы и отбирать пробы. Когда в термостате находятся микроорганизмы, которые растут при давлении в 1000 атмосфер, что составляет 1000 кг на 1см², должны быть такие затворы, которые бы не позволяли содержимому выплескиваться при разборке.

Черные курильщики

Новые виды микроорганизмов, которые растут при высоких давлениях в глубине океана, обычно приурочены к местонахождению черных курильщиков (сипы). Черные курильщики представляют собой небольшие такие извержения газов, которые постоянно пробиваются со дна океана (из земной коры) и несут с собой газы, которые насыщены, например, сероводородом, водородом и метаном. Обычно, они имеют высокую температуру, но встречаются и холодные. На самых больших глубинах микроорганизмы остаются анаэробными и их местонахождение так же приурочено к каким-то впадинам, где тоже могут быть черные курильщики. В этих местах образуются довольно крутые градиенты. Например, вырывающиеся из таких сипов, газы могут иметь температуру в 350°C, а на градиенте там 2-3 метра, температуры уже сравниваются с температурой на дне океана, обычно это от 2 до 4° C. Вот на таких градиентах поселяются микроорганизмы, которые могут использовать эти восстановленные неорганические соединения (сероводород, водород и метан) и расти за счет фиксации CO₂ из толщи морской воды, кислород и минеральные вещества так же присутствуют в среде. Микроорганизмы развиваются выдерживают очень высокие при этом давление и относятся к пьезотолерантным и пьезофильным микроорганизмам. Другой вид микроорганизмов входит в состав симбиозов, например, с глубоководными креветками или беспозвоночными, они даже обеспечивают метаболизм самого животного.

Рост микроорганизмов в зависимости от температуры

Если говорить о влиянии температуры на микроорганизмы, то микроорганизмы можно разделить на несколько групп:

Психрофильные (-10 — +10 °C)

Психротрофные (0-30 °C)

Мезофилы (10-50 °C)

Термофилы (40-90 °C)

Экстремальные термофилы (80-120 °C)

С увеличением температуры, скорость роста возрастает линейно и подчиняется закону Q_{10} , который гласит, что с увеличением температуры на 10 градусов, скорость реакции увеличивается в 2-4 раза. Скорость роста достигает максимума в максимальной температуре роста, при её достижении, наблюдается резкое снижение скорости роста, потому что ферментные системы и мембранные липиды не выдерживают таких температур и метаболизм прекращается.

Влияние кислорода на бактериальную клетку. Активные формы кислорода.

По отношению к кислороду, микроорганизмы делятся на 5 групп:

Таблица 4.4. Микроорганизмы по отношению к кислороду

Микроорганизм	Отношение к O_2	Тип метаболизма	Пример организма	Местообитание
Аэробы				
Облигатные	Требуют присутствия O_2	Аэробное дыхание	<i>Micrococcus luteus</i>	Воздушные массы, частички пыли, колонии с мясобо-агаром, кожа
Факультативные	Не требуют присутствия O_2 (в присутствии O_2 растут лучше)	Аэробное дыхание в присутствии O_2 Брожение в отсутствии O_2	<i>E.coli</i> Дрожжи	Толстый кишечник, виноградные ягоды
Микроаэрофилы	Требуют присутствие O_2 для роста в минимальных количествах (1-5%)	Аэробное дыхание	<i>Begeatoa, Spirillum</i>	Озерная вода, поверхность озерного ила

Анаэробы				
Аэротолерантные	Не требуют присутствия O_2 , их рост не стимулируется O_2	Брожение	Молочно-кислые бактерии, стрептококки	Продукты молочнокислого брожения, верхние дыхательные пути
Облигатные	O_2 угнетает и приводит к гибели	Брожение, анаэробное дыхание	Метаногены, ацетогены, сульфатредуцирующие бактерии	Ил, болота

Кислород появился на Земле около 1.8 млрд лет назад и обязан своим появлением цианобактериям. Считается, что цианобактерии были первыми организмами, которые стали развивать вторую фотосистему, которая приводит к окислению воды и появлению кислорода. После появления кислорода появился новый акцептор электронов, что привело к получению клетками большей энергии и эволюция развития организмов пошла гораздо более быстрыми темпами по сравнению с анаэробным миром.

Кислород так же является отрицательным фактором для некоторых ферментных систем организма. При переносе электронов на кислород возникают так называемые активные формы кислорода (АФК). При переносе на кислород 4 электронов возникают оксиданионы, данную реакцию осуществляет цитохромоксидаза. Она переносит по 1 электрону, в промежутках возникают кислород разной степени восстановленного состояния, в результате получается молекула воды. Поскольку всё происходит в комплексе цитохромоксидазы, АФК не выходят из комплекса и не оказывают влияния на цитоплазму клетки. В растительных и животных организмах данный процесс происходит в митохондриях.

При переносе на ферментную систему 2 электронов, происходит образование перекиси водорода H_2O_2 , реакцию осуществляют флавиновые ферменты, которые содержат в активном центре флавопротеины (переносят два протона и два электрона на кислород). Таких ферментов много, например, глюкозооксидаза, оксидазы аминокислот, ксантиноксидаза, и др.. Все флавиновые оксидазы при каталитическом акте приводят к образованию перекиси водорода.

При переносе 1 электрона на кислород, происходит образование вещества, получившего название супероксидрадикал. К их появлению приводит действие ферментов альдегидоксидаз и НАДН-оксидаз. Супероксидрадикал является чрезвычайно токсичным веществом для клетки, он может реагировать с перекисью водорода, что приводит к образованию гидроксилрадикалу. По степени вредного действия на ферментативные системы клетки, ДНК, РНК, эти радикалы распределяются следующим образом в порядке убывания: гидроксилрадикал, супероксидрадикал, перекись водорода.

Перекись водорода встречается в нитрофилах при встрече с микроорганизмами, что приводит к гибели микроорганизма внутри нитрофила — действие иммунной системы крови.

У аэробных микроорганизмов, которые постоянно встречаются с вредным действием кислорода, которые обусловлены АФК, клетки аэробов научились бороться с помощью фермента каталазы. Каталаза расщепляет H_2O_2 на воду и кислород, таким образом H_2O_2 быстро исчезает. Число оборотов каталазы достигает 40'000/сек — самый быстрый фермент на Земле. Пероксидазы обладает сходным действием с каталазой, осуществляют разные реакции: субстрат + $H_2O_2 \rightarrow$ окисленный субстрат + вода. Каждая пероксидаза работает с определенным субстратом.

Супероксиддисмутаза (СОД) нейтрализует супероксидрадикал, превращая его в менее токсичную перекись водорода.

Среди АФК есть так же синглетный кислород. В присутствии света, фоточувствительный пигмент возбуждается, приводя к образованию синглетного кислорода, который так же очень токсичен для клетки. Ферментных систем, которые бы нейтрализовали синглетный кислород не открыто, в клетке он тушится каротиноидом.

Лекция 5. Анаэробные системы. Метаболизм

Влияние кислорода на анаэробов.

Кислород отрицательно действует на аэробные микроорганизмы, для них кислород губителен вследствие образования активных форм кислорода (АФК), которые у аэробных микроорганизмов гасятся за счет различных ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза), которые отсутствуют у анаэробов. Поэтому, если кислород проникает в микрообитание анаэробов, то на кислород сбрасывают электроны ферменты анаэробов, вследствие чего образуются АФК, которые не тушатся у анаэробов. На протяжении нескольких десятилетий исследований, было установлена классификация анаэробов в связи с отсутствием в них защитных систем, поэтому, они не выдерживают контакта с кислородом. В последние 15 лет активно ведется поиск толерантных систем у анаэробов — аэротолерантные группы анаэробов. В результате, были обнаружены группы микроорганизмов, которые ранее относили к анаэробам, но они до разной степени оказались устойчивыми к действию кислорода. Некоторые из них даже способны взаимодействовать с кислородом. Эксперименты с сульфатредуцирующими бактериями (анаэробные микроорганизмы, проживающие в морских местообитаниях, засоленных озерах или почвах, окисляют неорганические вещества и сбрасывают электрон на сульфат, образуется сероводород. Сероводород тоже участвует в защите от кислорода и микроокружения, поскольку он химически связывает кислород и поэтому их микроокружение становится быстро пригодным для анаэробов), показало, что среди некоторых сульфат редукторов есть виды, которые активно борются с проникновением кислорода в микроокружение. Эти эксперименты были проведены в Германии, а затем в других странах, но первым оказался Герберт Ципеонка (профессор Вольденбургского университета), который впервые увидел, что некоторые сульфат редукторы взаимодействуют с кислородом. Он решил продемонстрировать это наглядно и сделал следующий эксперимент: он применил так называемые плоскопараллельные капилляры. Плоскопараллельные капилляры, это капилляры которые вытянуты из стекла и у них плоские стенки, поскольку, если вы будете работать с круглыми капиллярами, которые тоже можно легко сделать, отражение света от стенок не позволит вам хорошо наблюдать происходящее внутри этого капилляра. Плоскопараллельные капилляры, которые были изобретены и сделаны впервые нашим исследователям в 1930х годах и введены в практику, был а исследователь почвенных микроорганизмов Перфильев. В честь него, плоскопараллельные капилляры называются «плоскопараллельные капилляры Перфильева», они позволяют наблюдать всё что происходит внутри капилляра через параллельные стенки и прокачивать через капилляр различные соединения. Герберт Ципеонка сделал аэробный плоскопараллельный капилляр и начал проводить с ним опыты. Он поместил суспензию сульфат редуцирующих микроорганизмов в центр этого капилляра под микроскопом он поместил пузырек воздуха и наблюдал за поведением *Desulfovibrio vulgaris*. Он заметил, что микроорганизмы, которые в среде были вначале в беспорядочном состоянии, начали концентрироваться вокруг шарика кислорода и образовывать скопления, как будто их привлекал сам кислород. Более того, он заметил, что подвижные клетки входят в кислородную зону, затем разворачиваются и выходят из неё, как будто они чувствуют/измеряют концентрацию кислорода и выходят там, где концентрации кислорода мала. То есть, они как бы активно нападают на кислород и начинают с ним бороться (предложена аналогия —

«как пожарники борются с огнем»). Более того, оказалось, что *Desulfovibrio vulgaris* имеет систему защиты, чтобы бороться с таким явлением, как присутствие кислорода в среде. Они активно потребляют кислород и восстанавливают его до воды за счет водорода. Они имеют гидрогеназу и в присутствии кислорода передают электроны с гидрогеназы на цитохром С, а цитохром С на кислород, кислород при этом превращается в нейтральную воду, которая никак не влияет на клетки. Так, кислород убирается из системы. После, с помощью химических экспериментов, он обнаружил, что чистая гидрогеназа (очищенный фермент) и чистый цитохром С переносят электроны на кислород со скоростью 1.5 мМ/мин на мг белка — эта величина подсчитана не на чистых ферментах, а на клетках. Перенос электрона на кислород не кислород не сопряжен с получением энергии, это холостое окисление водорода для того, чтобы быстро убрать кислород из микроокружения клетки, поскольку обычные дыхательной системы они работают на уровне нМ, где-нибудь 100 — 300, максимум, 500 нМ/мин на мг белка. Такие скорости приводят к сопряжению переноса электронов на кислород и запасания энергии. В этом эксперименте с потреблением кислорода, кольцо кислорода из среды микроорганизмов постепенно, через какое-то время, сжимается и в конце концов кислорода в этом пузырьке нет и, поэтому, всё снова превращается в равномерно распределенную суспензию микроорганизмов. Когда начали работу с поиском систем, которые позволяют анаэробам в некотором смысле переживать неблагоприятные условия при контакте с кислородом, было уже известно, что некоторые метаногены (строгие анаэробы) — археи, которые выделяют метан, проживающие на рисовых полях, по крайней мере, два раза в год встречаются с кислородом, потому что когда осушают рисовые поля и растения уже дают урожай, то среда становится более менее кислородсодержащей, но как только она заболачивается, снова мгновенно возникает метаногенез. То есть, нет никакого периода, который нужен был для микроорганизмов, чтоб они, например, снизили популяцию путем отмирания, до начального уровня синтеза метана. При очередном заболачивании земель, сразу начинается бурный синтез метана, а это значит, что все микроорганизмы остаются живыми. Действительно, было показано, что они переживают такие кратковременные или даже долговременные (около месяца) контакты с кислородом.

Рисовые поля, это система, которая осушается дважды в год, заболачивается и уже в заболоченность высаживается рис. Покрытые водой почва очень быстро становится анаэробной. Проникновения кислорода через хотя и небольшой слой воды происходит очень медленно, он очень быстро употребляется еще в верхнем сантиметре почвы, поэтому, на несколько сантиметров вглубь и дальше — это все анаэробная зона, где развиваются метанобразующие археи. Эти микроорганизмы образуют большое количество метана, который поступает в атмосферу. Рисовые поля являются очень большим источником метана атмосферы, а метан считается вторым по значимости тепличным или парниковым газом в атмосфере, поскольку первый по количеству газ в атмосфере это CO₂, а второй по количеству это метан. Однако, отражательная способность для тепловых/инфракрасных лучей у метана в 25 раз выше чем у CO₂, поэтому даже такие небольшие концентрации метана, которые появляются в атмосфере дают очень значимый эффект. Второй по значимости источник метана на земле, это жвачные, к которым относятся коровы, овцы, козы, жирафы, ламы и так далее. Этих животных тоже большое количество на Земле, при своем пищеварении они выделяют большое количество метана, из переднего желудка (рубца у коров).

Среди таких микроорганизмов были выделены чистые культуры и обнаружены культуры, у которых есть ферменты антиокислительной защиты. На кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, эту работу начал Александр Иванович Нетрусов, которую после продолжил Брюханов Андрей Леонидович. Работа выполнялась в сотрудничестве с наземным институтом микробиологии Макса Планка в Марбурге, ФРГ. Были выделены геномы микроорганизмов и в одном из них были обнаружены самые активные каталазы. Выделенные ферменты после секвенирования показали, что эти гены в ответ на действия кислорода, увеличивают синтез каталазы и супероксиддисмутазы. Все эти ферменты регулируются кислородом, тогда это были пионерские работа в мире но сейчас Брюханов Андрей Леонидович ту же самую работу продолжает уже с сульфат редуцирующими бактериями, толерантными к кислороду. Он занимается сульфат регулируемыми бактериями черного моря. Оказалось, что сульфат транслирующие бактерии толерантны и прекрасно себя чувствует и хорошо выделяются с окисленных вод черного моря — воды, которые ближе к поверхности, хоть бактерии и являются сульфатредуцирующими. Они ведут свой образ жизни так как им предписано природой, они восстанавливают сульфат, образуя сероводород, но уже в аэробной зоне, это очень важно для создания систем препятствующих коррозии металла потому что сероводород является очень мощным корродирующим элементом, он вызывает коррозию даже нержавеющей металлов со временем и с его появлением нужно бороться. Вся работа должна была проводиться в алюминии в анаэробных условиях, сначала потому, что некоторые ферменты оказались чувствительны к кислороду, а некоторые нет. Вообще говоря, работа по выявлению анаэробных микроорганизмов и по выделению чистых культур анаэробных микроорганизмов, оказалась возможным, после середины 50 годов XX века в университете в калифорнии в Дэвисе, где работал Роберт Хангейт (Robert Hungate). Он разработал специальную технику для работы с анаэробными микроорганизмами. Основным родом его деятельности были жвачные животные, он описал практически весь цикл переваривания целлюлозы в рубце жвачных животных и показал, как за счет целлюлозы и белка микроорганизмов, присутствующих в рубце, осуществляется анаэробное превращение целлюлозы. Для выделения чистой культуры анаэробных микроорганизмов, Хангейт разработал технику, которая носит название техника Хангейта. Главной идеей была разработка крутящихся анаэробных пробирок, из которых получались чистые культуры микроорганизмы. Суть изобретения и техники состояла в том, что пробирка помещалась в постоянно крутящийся с медленной скоростью зажим. Так, пробирка постоянно находилась в наклонном состоянии. На винтовом зажиме крепилась пробка, посередине была септа из бутилированной резины, которая помещалась в пробирку. Предварительно, подготавливались стерильные анаэробные среды (методом продува), которые и помещались в пробирку. Расплавленный агар медленно застывал, превращусь в слой внутри пробирки. После, все помещалось на горелку Босена. Стерильный газ вводился на капилляре (обычно, стерильный азот), поэтому, при открытии пробирки, в нее не поступал кислород, сохраняя анаэробную среду. Стерильная петля прижималась к одному краю пробирки, которую во время вращения пробирки превращалась спираль. На этой спирали возникали колонии микроорганизмов, которые можно выделить в чистые культуры. Таким образом было выделено множество анаэробный культур — метаногены, ацетогены, бродильщики,

сульфатредукторы и прочее. Если не нужно выделять на агаре, то пробирки заливаются необходимой средой, затыкаются резиновой пробкой с алюминиевым колпачком, который защищает от случайного выскакивания пробки от образующегося внутри пробирки давления. После, септу протыкают стерильным шприцом, отбирают культуру из жидкости и смотрят за её развитием. Далее, из пробирок культуры перемещаются в бутылки, которые так же затыкаются резиновыми пробками и закрываются алюминиевым колпачком, где и происходит размножение микроорганизмов в больших количествах.

Изучение анаэробных ферментных систем.

Следующий этап — выращивание микроорганизмов в ферментерах. Ферментеры продувают газом без кислорода, стерилизуют, вносят посевной материал. Очень часто, например, метаногены растут на смеси газов (например, водород и CO_2), поэтому, необходимо постоянно пробульживать питательную среду. То есть, на входе два газа, на выходе — три газа, при этом, могут требоваться довольно высокие температуры, до 70°C. Затем, наступает период, когда интересно узнать, каким образом происходит образование продукта — изучение на биохимическом уровне. Для этого необходимо вырастить культуру и отцентрифугировать её анаэробно. Для этого, есть специальные стальные стаканы с навинчивающимися пробками, в которые заливается культура под продуванием азотом. Затем, чтобы получить эту массу, стаканы переносят в так называемые анаэробные боксы. Анаэробный бокс представляет собой сооружение из толстого гибкого пластика с рукавами для возможности работы в перчатках. С одной стороны, есть шлюз, в который помещаются те материалы с которыми необходимо работать. Для этого, закрывается дверца, откачивается воздух вакуумными насосами, затем заполняется инертным газом, затем вы можете изнутри уже открыть вторую дверцу и все необходимое поместить внутрь этого бокса, например, центрифужные стаканы. После, внутри этого бокса, биомассу в этих стаканах помещаете в ультразвуковую установку для разрушения клеток. Клетки разрушаются, превращаясь в гомогенат с теми ферментами, которые вас интересуют, затем вы заполняете внутри этого бокса центрифужные стаканчики, с тем, чтобы фракционировать биомассу. Заполняете, закрываете стаканчики, выносите из бокса, центрифугируете. Снова вносите в бокс, получаете экстракты, которые начинаете фракционировать, например, сульфатом аммония, снова получаете фракции, их снова центрифугируют. В итоге, через какое-то время, осуществляете вынос фракции через шлюз анаэробного бокса. Определяете активность фракции, в кюветах, которые тоже анаэробные со специальными пробками, чтобы можно было добавить субстрат или акцептор. После, проводите счет на спектрофотометре. Иногда, маленькие спектрофотометры ставят прямо внутрь анаэробных боксов и работают там. Для определения активности фракции, фракцию помещают на хроматографическую колонку, так же, в анаэробном боксе. Все буферы, коллектор фракций — анаэробные и находятся внутри анаэробного бокса. Хорошо, если ферменты не термочувствительные, если они термочувствительные, то весь анаэробный бокс переносится в холодную комнату (оператор должен быть достаточно хорошо одет, чтобы не замерзнуть во время работы с фракциями ферментов). После, когда получились пробирки с активными фракциями, уже анализируют их, выделяют чистые ферменты, и ставятся эксперименты по определению кофакторов этих ферментов и так далее. С помощью такой длительной

процедуры в конце концов было установлено, что очень многие факторы анаэробов чувствительны к кислороду, и при контакте с кислородом они мгновенно инактивируются и вся активность пропадает. В таком случае, необходимо начинать всю процедуру с самого начала.

В анаэробном боксе, поддерживается атмосфера без кислорода (любой пластик, течет по кислороду, и поэтому трудно удержать от проникновения кислорода извне), внутри постоянно, 24 часа в сутки, работает вентилятор, который прогоняет весь объем газа вместе с молекулами приходящего туда кислорода через сетки, наполненные платиновым катализатором. Платиновый катализатор — это алюминиевые шарики, на поверхность которых напылен тонкий слой платины. На платине происходит реакция кислород + водород — реакция гремучего газа. Так, что весь объем газа в анаэробном боксе содержит 8-10% водорода, всё, остальное — азот. Водород должен присутствовать постоянно, есть специальные датчики на кислород и водород и оператор должен все время обращать внимание, чтобы водорода было 8-10%, а у кислорода были практически нулевые показатели. На этих платиновых шариках постоянно находится кислород, который взаимодействует с водородом, в результате чего образуется вода. Воду нужно убирать, ведь бокс — это замкнутый, герметичный объем. Поэтому, ставят осушители — силикагель, который голубой-ярко синий в сухом состоянии, при насыщении водой становится розовым или бесцветным. При насыщении водой их регенерируют: силикагель вынимают, высушивают в сушильных шкафах и помещают обратно. То же самое, происходит и с платиновыми шариками, их регенерируют с определенной частотой, например, раз в неделю, ставят сушильные шкафы при температуре около 250°C на сутки, и они за это время регенерируют по своей возможности. Такие циклы повторяются несколько раз, потом катализаторы приходится выбрасывать — платина начинает отравляться, например, следами сероводорода, который может образовываться при манипуляциях с клетками микроорганизмов. Если активно работать с анаэробным боксом, то он потребляет довольно большое количество газа — примерно стандартный баллон в 50 литров уходит за неделю и каждую неделю надо ставить новый баллон для поддержания анаэробного бокса в активном состоянии. Поэтому, работа с анаэробным боксом по получению чистой культуры, выделению из нее ферментов и кофакторов, достаточно хлопотная и дорогостоящая задача, которую могут позволить немногие лаборатории в мире.

Статистика смертей жителей США в разное время.

Микробиологи сталкиваются с разными проблемами. С одной стороны, технологи микробиологи общего профиля, сельскохозяйственные микробиологи, стараются вырастить микроорганизмы, чтоб посмотреть, что они делают как они устроены, их биохимические пути и так далее. Микробиологи, которые работают с патогенными микроорганизмами, ищут способ, каким образом подавить активность микроорганизмов, каким образом препятствовать их развитию в здоровом человеке, здоровом животном или растении. Таблица 5.1. представляет интересные данные американских ученых о количестве смертей на 100'000 жителей США в начале 20 века и в его конце. Рассматривались первые десять самых опасных болезней.

Таблица 5.1. Ежегодное количество смертей на 100'000 жителей США

1900 год		2000 год	
Болезнь	Количество смертей	Болезнь	Количество смертей
Грипп и пневмония	200	Болезни сердца	310
Туберкулез	190	Рак	190
Гастрозентериты	150	Инсульт	90
Болезни сердца	150	Несчастные случаи	50
Инсульт	100	Грипп и пневмония	40
Заболевания почек	90	Диабет	30
Несчастные случаи	70	Цирроз печени	25
Рак	50	Самоубийства	20
Детские болезни	45	Атеросклероз	10
Дифтерия	30	Убийства	7
Суммарно	1070	Суммарно	772

Согласно таблице 5.1., резко уменьшилось количество смертей, вызываемых микроорганизмами, вирусами (выделено жирным). С другой стороны, на первые места вышли не очень значимые болезни — рак, сердечно-сосудистые. Это указывает на то, что в середине 1950х годов, в массовую медицинскую практику вошли антибиотики, которые спасали жизни многих людей. Статистика по России говорит, что в год 928 смертей на 100'000 жителей. На первом месте болезни сердца, рак, несчастные случаи, алкоголизм и наркомания.

Контроль роста микроорганизмов.

У человечества постоянно возникал вопрос, каким образом препятствовать развитию нежелательных микроорганизмов. Вещества или способы, которые препятствуют массовому развитию нежелательных микроорганизмов классифицируют в 5 различных групп: антимикробные агенты, которые вызывают приостановку роста или гибель микроорганизмов, агенты, которые вызывают приостановку роста, но не гибель микроорганизмов, называют бактериостатические, а те которые вызывают гибель микроорганизмов — бактерицидные препараты или агенты.

1 группа: вещества которые повреждают поверхности клеток, поверхность клеточных структур, например, это 70% этанол, который вызывает коагуляцию поверхностных белков, и таким образом, является бактерицидным агентом, фенолы, крезолы, нейтральные мыла, поверхностно активные вещества, которые повреждают цитоплазматической мембраны — это всё вещества, которые повреждают поверхностные клеточные структуры.

2 группа: ферментные яды, которые повреждают ферменты. Например, тяжелые металлы — медь, ртуть, свинец. Они связывают –SH- группы белков, нарушая четвертичную структуру белков. Другие агенты, например, CO (угарный газ) или цианиды (-CN) блокируют цепь переноса электронов на уровне цитохромоксидазы, вызывая гибель клетки от недостатка энергии. 2,4-динитрофенол, разобщитель окислительного фосфорилирования так же приводит к снижению энергии и клетка гибнет. Арсенат нарушает субстратное фосфорилирование, так же приводит к гибели

клетки. Антимидин-А прерывает цепь переноса электронов, приводя к гибели аэробной клетки. Фторацетат действует на функционирование цикла трикарбоновых кислот.

3 группа: аналог метаболитов, которые конкурируют за активный центр ферментов. Например, сульфаниламиды, которые блокируют синтез фолиевой кислоты.

Парааминобензойная кислота (предшественник фолиевой кислоты). Аналог, блокирующий синтез фолатов — сульфаниламид. Сульфаниламид проникает в клетку, связывается с активным центром фермента синтезирующим фолат и клетка гибнет от его недостатка. У людей нет собственного синтеза фолатов. Фолаты организм получает с пищей либо от микроорганизмов, которые находятся в кишечнике. Поэтому, сульфаниламиды на человека не действуют.

4 группа: вещества, которые нарушают нормальный синтез полимеров (белков, ДНК, РНК). К этим веществам относится большинство антибиотиков стрептомицин, тетрациклины, хлорамфениколы — действуют на синтез белка происходящий на 70S рибосомах, не затрагивающие синтез на 80S рибосом эукариот, поэтому, они действуют только на прокариотические микроорганизмы, не затрагивая синтез белка эукариотических организмов. На синтез нуклеиновых кислот действуют такие вещества как митомицин-с, рифампицин. Пенициллины препятствуют синтезу пептидогликана — компонента клеточной стенки грамотрицательных микроорганизмы (1 слой гликана), у грамположительных микроорганизмов слоев гликана больше.

5 группа: опосредованные бактериостатические действия, которые вызывают некоторые вещества, типа поваренной соли, высоких концентраций сахаров — вещества, которые употребляются при хранении/консервировании пищевых продуктов.

Вещества из 4 группы типа антибиотиков широко применяются в настоящее время для контроля роста микроорганизмов при всех заболеваниях, вызываемых бактериями, антибиотики крайне эффективны.

Метаболизм и "биохимическое единство жизни".

В 1925 году вышла книга последователя и приемника Бейеринка на посту заведующего кафедрой микробиологии в университете Делфта, который в своей книге доказал так называемое биохимическое единство жизни. В этой книге он привел такую крылатую фразу «Что справедливо для бактерий, для клостридий, то справедливо и для слона». Он подтвердил в своих исследованиях что во всем биологическом мире существует так называемое химическое единство ферментов, похожих, один и тот же переносчик энергии — АТФ, одни и те же системы синтеза белка, перенос информации — ДНК и РНК, белки, ферменты и это справедливо до сих пор, но впервые было обнаружено и постулировано микробиологом. Метаболизм включает в себя три 3 основных раздела, которые мы называем катаболизмом -это расщепление каких-то веществ для получения энергии, амфиболизм — это промежуточные реакции, перестройки, начало или подготовка предшественников и анаболизм — это собственно построение веществ клетки уже для конструктивных целей, для построения новой клетки. Во всех этих превращениях участвуют ферменты.

Способы получения и запасаения энергии.

Практически всегда в состав ферментов входят коферменты, которое мы определяем как витамины и существуют различные способы получения и запасаения энергии в виде АТФ, которое происходит тремя способами: субстратное

фосфорилирование при котором АТФ образуется на уровне взаимодействия молекул субстратов — ферментов и ещё два вида фосфорилирования, которые, в общем, называется мембранным фосфорилированием — это так называемое окислительное фосфорилирование и фотофосфорилирование. И окислительное и фотофосфорилирование связаны с функционированием мембраны, там довольно сложный процесс потому что при переносе электронов по цепи переноса электронов, которые связаны с мембранами, генерируется трансмембранный градиент протонов и этот градиент затем реализуются через синтез АТФ в результате окислительного фосфорилирования или фотосинтетического фосфорилирования. К наиболее древним способам получения энергии, является так называемая система брожения или получение энергии акцепторов электронов при брожении клетки получают энергию только лишь за счет фосфорилирования. Клетки бродильщиков получают сравнительно мало энергии потому что у них нет внешних центров, они не имеют систем окислительного фосфорилирования электронов. Градиенты очень короткие, небольшие и поэтому клетки растут скудно, зато бродильщики образуют большое количество продуктов и субстратов, чтобы заработать себе энергию, которая не получает этих самых брожений. Такие реакции субстратного фосфорилирования, которых немного, сводятся к получению энергии за счет фосфорилирования аденозиндифосфата на следующих макроэргических носителях. При брожении в синтезе АТФ участвуют только реакции субстратного фосфорилирования:

1. 1,3-диглицериновая кислота + АДФ = АТФ + 3-фосфоглицериновая кислота

2. Фосфоенолпируват + АДФ = пируват + АТФ

3. Ацетилфосфат + АДФ = АТФ + ацетат

Вместо ацетилфосфата может выступать бутирилфосфат:

Бутирилфосфат + АДФ = АТФ + бутират (масляная кислота)

Пути расщепления сахаров.

В реакция катаболизма существует реакция расщепления сахаров до пировиноградной кислоты. Основные пути:

1. Гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса);
2. Пентозофосфатный путь (путь Варбурга-Диккенса-Хореккера);
3. 2-кето-3-дезоксиглюконоатный путь (КДФГ-путь), встречается только у микроорганизмов (путь Энтнера-Дудорова)

В этом пути, глюкоза является расщепляемым сахаром, фосфорилируется за счет молекулы АДФ, превращаясь в глюкозо-6-фосфат, которая может идти на гликолиз или пентозофосфатный путь. С помощью КДФГ, глюкозо-6-фосфат превращается в 6-фосфо-глюкогалактон, далее, он претерпевает два превращения под действием воды, превращаясь в 6-фосфо-глюконат, после происходит отщепление молекулы воды и превращение в 2-кето-3-дезоксиглюконоат. Под действием альдолазы оно расщепляется на два соединения: пировиноградная кислота и трифосфоглицериновый альдегид (через несколько реакций превращается в пировиноградную кислоту). Из пировиноградной кислоты образуется две молекулы АТФ и NADH.

Таким образом, глюкоза расщепляется на 2 молекулы пировиноградной кислоты, которая подвергается последующим превращениям. Все брожения идут с образованием пировиноградной кислоты, из которой делаются продукты брожения.

Реакции окисления пирувата.

Реакций окисления пирувата на данный момент открыто 5.

Одну из них, у *E.coli*, достаточно изученного организма, открыли в 2001 году.

Реакции окисления пирувата проходят по следующей схеме:

1. Аэробы: Пировиноградная кислота + кофермент А⁺ пиридиннуклеотид (в окисленной форме), окисляются под действием пируватдегидрогеназы до ацетилкофермента А + NADH + H⁺ + CO₂

Ацетилкофермент А, далее идет в цикл трикарбоновых кислот. Данная реакция является основным поставщиком ацетилкофермента А для цикла трикарбоновых кислот.

2. Анаэробы: пировиноградная кислота + кофермент А + ферридоксин (небольшой анаэробный белок, выступающий в качестве акцептора электронов), в результате, образуется ацетилкофермент А, ферридоксин (восстановленный) и CO₂.

Из двух молекул восстановленного ферредоксина образуется водород. У анаэробов, это основной путь избавления от большого количества восстановителей.

3. Анаэробные энтеробактерии и некоторые фототрофы: пируват + кофермент А = ацетилкофермент А + формиат (муравьиная кислота)

Формиат быстро расщепляется до H⁺ + CO₂

4. Дрожжи: пируват расщепляется до ацетальдегида и CO₂

Это свойство дрожжей используется при выпечке (CO₂) и образованию ацетальдегида, который восстанавливается в этанол. Реакция катализируется ферментом пируваткарбоксилазой.

5. *E.coli*: пируват + флавинадениндинуклеотид = ацетилкофермент А + ФАД⁺ + CO₂

Реакция осуществляется под действием фермента пируватоксидоредуктазы.

Кратко о брожении.

Все брожения стартуют с сахаров, например, с глюкозы, которая превращается в пировиноградную кислоту. Продукты окисления пировиноградной кислоты превращаются в CO₂. В замкнутых системах, когда бродильщики находятся в замкнутых объемах, отсутствуют акцепторы электронов. Данную проблему бродильщики решают путем того, что на первых этапах брожения они синтезируют окислители, которые потом используют как акцепторы электронов. Поэтому, окислители выходят в окружающую среду, а восстановители идут на построение веществ клетки.

Лекция 6. Виды брожений

Общая схема брожений.

Брожение — первая, самая древняя форма запасания энергии в форме АТФ которая проходит при помощи фосфорилирования субстратного и две формы так называемого мембранного окислительного фосфорилирования и фотофосфорилирования.

В замкнутых пространствах, в анаэробной среде, где будут проходить бродильные процессы, создаются трудные условия отсутствия внешнего акцептора электронов. Клетки должны решать проблему окисления-восстановления, поскольку при брожениях, глюкоза, как самый распространенный субстрат, окисляется, за счет чего клетки получают энергию и конструктивные материалы для того чтобы выстраивать новые клетки, для роста, размножения. Соответственно, им требуется большая часть восстановителей, которые они так же получают из субстрата — глюкозы. Если есть восстановление, то должна быть и окислительная часть. В среде выделяется окисленный продукт, это CO_2 и органические кислоты. Сумма восстановительных эквивалентов и окислительных эквивалентов всегда сбалансирована и равна. Есть схема, которая описывает известные брожения:

Органическое вещество является донором электронов, оно претерпевает окислительные превращения, окисляется, образуя в результате промежуточные продукты. Электроны уходят на переносчики электронов (NAD^+).

Промежуточный продукт фосфорилируется и получается фосфорилированная форма промежуточного продукта с макроэргическим фосфатом.

Макроэргическая связь реализуется в субстратном фосфорилировании. При этом, из АДФ получается АТФ и окисленное органическое вещество (*)

Окисленное органическое вещество служит акцептором электронов.

Переносчики электронов, с доноров электронов переносят электроны на акцепторы электронов.

Органически окисленные вещества превращаются в восстановленные органические вещества — продукты брожения.

Окислительная часть (*): образуются окисленные продукты брожения (CO_2) — необходимо для баланса.

Субстраты для брожений.

В брожение, обычно вступают субстраты, которые не полностью восстановлены и не полностью окислены (сахара, аминокислоты, некоторые органические кислоты). Например, углеводороды не могут сбраживаться в анаэробных условиях, для их окисления необходим кислород.

Спиртовое брожение.

Спиртовое брожение известно человечеству более 6 тысяч лет. Спиртовое брожение было изучено еще Луи Пастером. Пастер доказал, что в анаэробных условиях проходит биологический процесс, который вызывается дрожжами и он показал, что дрожжи — это активные клетки, которые растут в аэробных условиях. Он выиграл спор с химиками того времени, немецкий химик Либих был тогда во главе химической группы, но выиграл спор Пастер. Он доказал, что спиртовое брожение идет с участием дрожжей. Химики же настаивали, что это химический процесс, а то что образуется,

например, осадок дрожжей после проведения спиртового брожения они объясняли образованием некоторого аморфного вещества, которое выпадает при этом в осадок при проведении химических процессов и это в общем случае никак не связано с жизнью и с жизнью живых организмов, поскольку без кислорода нет жизни. Пастер доказал, что без кислорода жизнь тоже существует, что есть анаэробные формы микроорганизмов. С тех пор стали известны анаэробные формы брожения, которое существует в достаточно широко представленном виде.

Затем, братья Бюхнер в начале 20 столетия показали, что спиртовое брожение можно провести и на экстрактах из дрожжей. Они растирали массу дрожжей с кварцевым песком, получая таким образом экстракт клеток и показали, что на выделенных экстрактах клеток (получается смесь ферментов), тоже получается этанол из глюкозы. Это положило начало основам энзимологии.

Брожение начинается с глюкозы, далее, через промежуточные реакции гликолиза превращается в 2 молекулы пировиноградной кислоты, которая расщепляется на 2 молекулы CO_2 и 2 молекулы ацетальдегида, которые восстанавливаются в 2 молекулы этанола.

Кратко: промежуточное окисленное соединение ацетальдегид, за счет переносчиков электронов восстанавливается в этанол. На уровне гликолиза образуется АТФ за счет субстратного фосфорилирования из промежуточных продуктов.

В начале первой мировой войны Германию отделили, снабжение прекратилось и нужно было как то решать вопрос с производством взрывчатых веществ, что требовало большого количества глицерина. Германский исследователь Нейберг решил эту проблему с помощью дрожжей, с помощью спиртового брожения. Он добавил к бродящим культурам от дрожжей бисульфит, который связывал ацетальдегид. Реакция вошла в учебники по биохимии, как метод ловушки промежуточного продукта или метод ловушки метаболита. Ацетальдегид связывался с бисульфитом, но не мог восстановиться до этанола — вторая форма брожения по Нейбергу. В результате реакции образовывался ацетальдегидбисульфит, который не является субстратом для образования этанола. Восстановители шли на восстановление пировиноградной кислоты до глицерола. Продуктами реакции были глицерол, CO_2 и связанный ацетальдегид.

Третья форма брожения по Нейбергу заключалась в том, что к бродящей массе дрожжей добавляли фосфат. В результате клетки вырабатывали этанол, глицерол CO_2 и сульфит.

Дрожжи не единственные представители, которые могут образовывать этанол. Этанол образуют ещё некоторые бактерии, например, такая бактерия как *Zymomonas mobilis*, которая была выделена в Мексике из сока агавы. Мексиканцы делали из сладкого сока агавы напиток, который назывался пульке, потом разработали способ перегонки спирта из этого мексиканского напитка пульке и получили известный напиток текила. То есть текила, это самогон из бродящего при 40°C сока агавы. *Zymomonas mobilis* интересен тем, что он может выдерживать брожения до 42°C , то есть температура при котором можно проводить а брожение *Zymomonas mobilis* может достигать 42°C , это очень выгодно для жарких стран для Бразилии например где ведут производство спирта из сахарного тростника именно с помощью *Zymomonas mobilis*, а не с помощью дрожжей поскольку дрожжи прекращают свой метаболизм и образование спирта при температуре чуть выше 30°C . При 31°C дрожжи уже плохо

себя, чувствуют, поэтому летом в жарких странах ферментеры на больших бродительных производствах приходится охлаждать. Охлаждать теплой водой, которая идет из водопроводного крана не очень эффективно, поэтому очень много энергии тратится именно на охлаждение больших ферментеров. Это проблема, поэтому повышение температуры брожения на 10 или даже 12°C дает очень большой экономический эффект при производстве спирта, в основном, топливного этанола.

При брожении, *Zygomonas mobilis* сбраживают глюкозу до виноградной кислоты с помощью КДФГ пути. Глюкоза сбраживается, получается 2 молекулы пировиноградной кислоты, а дальше все тоже самое как у дрожжей — ацетальдегид и этанол на конечных этапах от пирувата до этанола. Но на пути от глюкозы до пирувата, действует другой путь расщепления сахаров у *Zygomonas mobilis*.

Спиртовое брожение применяют практически во всех странах. Получают и пищевой спирт и топливный в качестве присадки к топливу, кроме того, дрожжи применяют в хлебопекарной промышленности при выпечке хлеба используются как раз свойства дрожжей образовывать CO₂, а при брожении CO₂ разрыхляет хлеб опара поднимается, поднимая тесто и хлеб получается более пышный и насыщенный CO₂. Производство дрожжей для пищевых и технических целей существует практически во всех странах мира, везде есть дрожжевые заводы и спиртовые производства. Кроме того, огромное количество дрожжей производится на дрожжевых заводах и используются в качестве дрожжей для домашнего хозяйства.

Молочнокислородное брожение.

Молочнокислородное брожение, это тоже древний способ сохранения молока и молочных продуктов. Известно человечеству около 6000 лет. В нем используют молочнокислые бактерии для сквашивания молока и для хранения молока на длительный период. Молоко — очень богатый субстрат для многих микроорганизмов и если его не сохранять, оно портится очень быстро. Но молочнокислые бактерии приспособились жить в молоке, они приспособились использовать молочный сахар (лактоза), который находится только в молоке, в растительном мире не встречаются, они нашли свою нишу в этом субстрате. Молочнокислые бактерии очень быстро сквашивают молоко образуют при этом, молочную кислоту в одном случае, в других случаях образуют молочную кислоту + ацетат + этанол и CO₂. Молочнокислые бактерии очень быстро снижают pH своего микроокружения, при котором очень немногие микроорганизмы могут выживать и расти. Таким образом, молочнокислые бактерии защищают свой субстрат и свое микроокружение. Кроме того, в последнее время выяснено что молочнокислые бактерии способны также создавать специальные вещества которые по сути являются антибиотиками, но антибиотиками их не называют, чтобы люди не боялись их употреблять. Они образуют так называемые бактерицины — это вещества пептидной природы, которые влияют на микроокружение и на другие чужеродные бактерии. Таким образом, они защищают свое микроокружение. Человечество научилось использовать эти бактерицины в своих целях для защиты пищевых продуктов от поражения микроорганизмами бактериями или даже грибами (слабое влияние). Отмечается успешное и эффективное воздействие на грамположительные бактерии, поэтому бактерицины, одним из самых известных которых является лизин, широко применяется в пищевой промышленности для защиты готовых продуктов, мясных, рыбных консервов, молочных продуктов сыров и так

далее. Молочнокислые бактерии, являются не спорообразующими, а анаэробными по своей сути, но они относятся к так называемым аэротолерантным анаэробам — кислород не влияет на их метаболизм, то есть, он не угнетает рост и развитие этих микроорганизмов, и они в присутствии кислорода не переключаются с брожений на дыхание клетки. Они не способны к дыханию у них нет генов, которые бы приводили к синтезу цитохромов, например, оксидаз. Они не способны синтезировать гем однако есть сведения что присутствие гемина (вещество-предшественник гемов) они способны синтезировать гем, но тем не менее, полноценного цитохромов и дыхания у них все равно не получается. В последнее время появились работы о том, что некоторые молочнокислые бактерии способны поглощать кислород, но природа этого явления пока еще до конца не изучена. Молочнокислые бактерии делятся на две большие группы они практически одинаковые по численности — так называемые гомо и гетеро ферментативные молочнокислые бактерии. Все они за исключением одного рода спор не образуют. Проводят молочнокислое брожение двумя способами:

Гомоферментативный способ молочнокислого брожения заключается в том, что гидролизуют лактозу, получается глюкоза и галактоза, из глюкозы затем образуется две молекулы молочной кислоты с помощью гликолиза расщепляет и превращается в 2 молекулы пировиноградной кислоты. Промежуточный продукт — пировиноградная кислота восстанавливается в молочную кислоту. В гомоферментативном молочнокислом брожение на 95% образуется. молочная кислота, остальные 5% иногда до 10% а это ацетат, CO_2 и этанол.

Гетероферментативное молочнокислое брожение проходит по другой схеме: глюкоза с помощью пентозофосфатного пути превращения глюкозы превращается сначала в фосфоглицериновой альдегид, затем в две молекулы пировиноградной кислоты. Одна молекула пировиноградной кислоты восстанавливается в лактат, а вторая молекула расщепляется на CO_2 и ацетилкофермент А. Ацетилкофермент А через несколько стадий превращается в этанол.

По другому пути образуется ацетилкофермент А, ацетилфосфат и затем ацетат.

В зависимости от условий, от pH, от температуры могут образовываться разные вещества в разных пропорциях.

Гетероферментативное молочнокислое брожение используется в заквасочных культурах для приготовления так называемых сочных кормов для хранения сочных кормов для сельского хозяйства для кормления животных в зимний период, а кроме того, гетероферментативное молочнокислое брожение проходит также при квашении капусты, засолке огурцов. Там выделяется CO_2 и небольшое количество этанола и образуется молочная кислота, которая собственно и консервирует этим продукты.

Молочнокислые бактерии в настоящее время испытывают бум интереса, поскольку их повсеместно признают, как безопасных для человека и к ним предъявляют гораздо меньше требований по безопасности, когда они вводятся в пищевые субстраты. То есть, не нужно получать многочисленные разрешения, потому что считается, что молочнокислые бактерии обладают так называемым статусом GRAS (generally recognized as safe), что переводится как повсеместно признано безопасными. Действительно, на протяжении больше чем в 6 веков использования нет никаких свидетельств о том, чтобы молочнокислые бактерии являлись возбудителем каких-то болезней, кроме того, они гипоаллергенны, не токсичны.

Молочнокислые бактерии применяют в качестве пробиотиков (приносящие/поддерживающие жизнь). Термин пробиотики возник сравнительно недавно, их добавляют в корма или в пищу. Считается, что человеку нужно регулярно принимать молочнокислые продукты для того чтобы поддерживать статус своего организма, содержать кишечник в нормальном режиме функционирования. О том, что нужно регулярно принимать такие препараты свидетельствуют результаты эксперимента, которые были проведены в Финляндии. Финские ученые очень много занимаются пробиотиками в общем молочнокислыми продуктами традиционно, давно и очень широко применяется в Финляндии и они сделали тест: они вывели пробиотик в котором установили точечную последовательность одного гена из 20-25 нуклеотидов. К такой нуклеотидной цепи привязали флуоресцентный краситель на препаратах, когда проводится такая гибридизация это называется метод FISH (fluorescent in situ hybridisation). На свету можно легко увидеть какие клетки будут флуоресцировать, значит туда попала эта метка, которая видоспецифично связывается с микроорганизмами. Они добавили этот пробиотик в йогурт и давали его пить двадцати студентам-медикам, которые в течение 2 недель принимали этот йогурт ежедневно и затем начался эксперимент они должны были каждый день приносить в лабораторию на анализ образцы своих каловых масс. В лаборатории ставили FISH эксперимент и определяли наличие вот флуоресцирующих микроорганизмов. Затем прекратился прием этого препарата с этим известным микроорганизмом, а эксперименты по их выявлению продолжились. Через две недели уже ни одной клетки не было ни у одного из испытуемых. Это говорит о том, что молочнокислые бактерии к сожалению, не могут раз и навсегда установиться в своей экологической нише в толстом кишечнике. Они как бы туда входят какое-то время пребывают и затем вымываются, то есть у них низкая способность к адгезии к клеткам, выстилающим толстый кишечник, поэтому регулярный прием молочнокислых продуктов рекомендован и этот эксперимент как раз подтверждает для чего это нужно делать.

Бифидобактерии. Их брожение.

Среди молочнокислых бактерий широко известны так называемые бифидобактерии. Считается, что именно бифидобактерии являются наиболее эффективными пробиотическими культурами, поскольку они с самого начала младенческого возраста занимают кишечник. На самом деле, они не первыми появляются в кишечнике. Первыми в кишечнике младенца при грудном вскармливании проявляется *E.coli*, они очень быстро поглощают кислород со стенок кишечника и в просвете кишечника и делают эту среду уже благоприятной для заселения анаэробными бифидобактериями. В кишечнике младенцев при грудном вскармливании до 20% от всей микробиоты составляют именно бифидобактерии.

Бифидобактерии проводят гетероферментативное молочнокислое брожение, но у них есть собственный путь сбраживания глюкозы, который не приводит к образованию CO_2 то есть из глюкозы получают такие продукты, как ацетат и лактат без образования CO_2 , что очень важно для младенцев.

Брожение осуществляется следующим образом:

Две молекулы глюкозы фосфорилируются за счет 2 молекул АТФ, образуется 2 молекулы глюкозо-6-фосфата, которые после изомеризуются в две молекулы фруктозо-6-фосфата. Одна молекула фруктозо-6-фосфата превращается в эритрозо-4-фосфат и

ацетилфосфат. Ацетилфосфат за счет субстратного фосфорилирования образует АТФ и превращается в ацетат.

Эритрозо-4-фосфат реагирует со второй молекулой фруктозо-6-фосфата и за счет осуществления транскеталазной реакции образуются два сахара: седогептулоза + фосфоглицериновый альдегид. Эти две молекулы вступают на путь превращений, образуя в конечном итоге 2 молекулы фосфоглицеринового альдегида и две молекулы ацетилфосфата. Из двух молекул ацетилфосфата образуется два ацетата и две молекулы АТФ. Из фосфоглицеринового альдегида образуется две молекулы пировиноградной кислоты, которые восстанавливаются за счет двух молекул пиридина в две молекулы молочной кислоты (лактат).

Поэтому, по классическому брожению бифидобактерий из двух молекул глюкозы образуется 3 ацетата + 2 лактата + 1 АТФ. Данный процесс характерен и для других бифидобактерий, они всегда находятся в дефиците по АТФ в силу метаболических возможностей по превращению глюкозы в свои продукты. АТФ образуется сравнительно мало если сравнивать с количеством образованных продуктов, поэтому, растут они довольно скудно, образуют не большую биомассу, из-за нехватки энергии. Зато они превращают большие количества субстрата, лактозы в продукты брожения — в молочную кислоту, уксусную кислоту этанол и др.

Свойства пробиотиков и пребиотиков.

Сейчас, многие лаборатории мира работают над созданием новых более эффективных бактерицидных антибиотиков, которые образуются молочнокислыми бактериями. Некоторые бактерицидные молочнокислые бактерии эффективны в отношении подавления роста грибов, такие бактерицидные пробиотики уже выделяются и применяются. Ведутся непрерывные поиски новых более эффективных пробиотических культур, которые должны отвечать таким пробиотическим требованиям, как аэротолерантность, потому что при производстве таких культур не будет слишком сложно, дорого и трудоемко выращивать, центрифугировать и получать сухие препараты, как в анаэробных условиях, поэтому такие пробиотические культуры должны быть аэротолерантными, прежде всего, чтоб они не погибали при контакте с кислородом. Они должны удерживать желудочные и кишечные стрессы. В нормальном желудке, как известно, pH достигает 1 или 2, поэтому при попадании в такую сильно кислую среду многие бактерии гибнут, для человека это хорошо потому что это является барьером против проникновения чужеродных микроорганизмов в нашу среду, соответственно пробиотические культуры должны быть защищены какой-то оболочкой, либо они должны быть достаточно устойчивы к кратковременным действиям такого стресса — 1-3 часа они должны выдерживать кишечный стресс. Дальше они попадают в двенадцатиперстную кишку, где происходит контакт с желчными кислотами поэтому, они должны быть устойчивы к действию и желчных кислот на протяжении примерно 5 часов. Они должны удерживать хранения культуры в наиболее эффективном и широко применяемом методе — в лиофильном состоянии, поскольку для промышленности очень важно, как сохранять такие лиофильные культуры, в том числе и пробиотики. После хранения они должны храниться 1-3 года без пересева, поскольку пересев, это очень трудоемкое, дорогостоящее мероприятие. Поэтому, чем дольше они хранятся, тем лучше в таком вот лиофилизированном виде. Еще одно свойство эффективных пробиотиков, это способность к адгезии. Ее тоже

изучают в мышинных экспериментах и экспериментах с культурами человеческих клеток. В эксперименте смотрят, как клетки адгезируют, то есть прикрепляются к клеткам, например, кишечника. Это очень важное свойство с тем чтобы они не быстро вымывались бы из кишечника. Априори культуры, которые в будущем будут применять в качестве пробиотических культур, должны быть непатогенные, не токсичные и не аллергенные. На рынке этих пробиотических культур сейчас уже очень много, но тем не менее постоянно ведутся поиски новых более эффективных, пробиотиков.

В понятие пробиотика входит еще понятие пребиотика. Пребиотики, это обычно химические вещества, какие-то субстраты, которые поддерживают рост пробиотических культур. Обычно в капсулу добавляют не только живые клетки пробиотических культур, но еще и субстраты, которые на первое время будут поддерживать рост этих пробиотиков в кишечнике. Препараты, которые совместно содержат пребиотики и пробиотики называют синбиотики.

Пропионовокислое брожение.

Брожение пропионовокислых бактерий. Пропионовые бактерии были выделены в начале 1930 годов, их экологической нишей считают производственную нишу, например, при выдерживании сыров типа швейцарских вносят закваску, содержащие пропионовокислые бактерии.

Пропионовокислые бактерии появились где-то на заре технологии приготовления сыров, когда сыры выдерживают и готовили в емкостях сделанных из желудков телят. Из желудка телят пропионовокислые бактерии попадали в сыры, они предавали специфический вкус, который понравился людям и уже после начали чистые культуры добавлять в сыры твердых сортов. На пропионовокислых бактериях, делали научные эксперименты, и один из этих экспериментов увенчался открытием так называемой гетеротрофной фиксации CO_2 — это реакции по которой неорганические источник углерода фиксируется/присоединяется к каким-нибудь органическим молекулам и таких реакции известно несколько, все они получили название «реакции гетеротрофной фиксации». Всего было открыто две самые известные реакции — это фиксация CO_2 на ацетате. Она была открыта в 1936 году американским исследователем Харландом Вудом. В 1936 году не было меченых изотопов — удобных веществ, которые бы показали наличие этих веществ. Он проводил эти эксперименты тщательным взвешиванием аналитическим путем вычислял сколько CO_2 выделилось, сколько глюкозы использовали пропионовые бактерии. Он делал доклад о том, что пропионовокислые бактерии фиксируют CO_2 за счет пропионовой реакции фиксации CO_2 , после, реакцию назвали «реакция Вуда-Вергмана» в честь Харланда Вуда и его научного руководителя.

Сейчас, реакция Вуда-Вергмана вошла во все учебники по биохимии и представляет собой гетеротрофную фиксацию CO_2 на ацетате, пирувате и др. Среди пропионовокислыми бактериями есть связанные с молочнокислым брожением и кожные, вызывающие угревую сыпь. С пропионовокислыми кожными бактериями успешно борются, находят какие-то препараты, которые подавляют их развитие а вот молочнокислые пропионовокислые бактерии изучают в другом аспекте и некоторые даже предлагают пропионовокислые бактерии также ввести в состав пробиотических культур, их так же еще называют классическими пропионовокислыми бактериями

Пропионовокислое брожение начинается с глюкозы: глюкоза посредством гликолиза превращается в пировиноградную кислоту (которая так же может поучиться из лактата, пируват).

Пировиноградная кислота может превратиться в ацетилкофермент А с выделением CO_2 и двух протонов, после она превращается в ацетат и АТФ.

Другая ветвь брожения включает фиксацию CO_2 на пировиноградной кислоте с образованием оксалоацетата, который восстанавливается до малата. Малат превращается в фумаровую кислоту, которая восстанавливается в сукцинат (янтарную кислоту) с образованием АТФ — фумаратное дыхание.

Фумарат превращается в сукцинат, который с присоединением кофермента А превращается в сукцинилкофермент А.

Сукцинилкофермент А с помощью фермента, содержащего P_1P_2 в качестве протетической группы превращается в метилмалонил-кофермент А. Метилмалонил-кофермент А передает CO_2 на пировиноградную кислоту и превращается в пропионилкофермент А.

Пропионилкофермент А отдает кофермент А сукцинату и превращается в пропионат.

Пропионовокислые бактерии применяются в пищевой промышленности в качестве закваски при приготовлении сыров. Они являются продуцентами витамина B_{12} , который идет в медицину. Витамин B_{12} синтезируется в больших концентрациях, превышающих их собственные потребности. Для синтеза витамина B_{12} нужен кобальт. В зависимости от концентрации кобальта, который добавляют в среду, будет происходить синтез витамина B_{12} до определённой концентрации. Оказалось, что Разрыв между минимальной и максимальной концентрацией кобальта при которой все функции клетки протекают нормально может составлять 1000 раз. То есть, клетки пропионовокислых бактерий по непонятным причинам могут синтезировать в 1000 раз больше витамина B_{12} , чем им нужно для собственных нужд. Данное свойство активно используется в биотехнологии — на средах с кобальтом выращиваются пропионовокислые бактерии, очищаются и используются в медицинской практике. Людям с анемией, с нарушенной кроветворной способностью ставят уколы с витамином B_{12} . На самом деле, чемпионами мира по производству витамина B_{12} в расчёте на клетку являются метанобразующие археи. Они образуют в 3-5 раз больше витамина B_{12} , чем самые продуктивные пропионовокислые бактерии, но способ добычи этого витамина B_{12} значительно сложнее, он происходит из ила очистных сооружений. После проведения анаэробного метанового брожения образуется биомасса, содержащих метанобразующие бактерии, которые экстрагируют, добывают витамин B_{12} , и очищают. Но его запрещено применять в медицинской промышленности, его применяют только как добавку в корм скоту в сельском хозяйстве.

Еще один витамин, который синтезируют пропионовокислые бактерии, это витамин Н или биотин, который тоже достаточно в большом количестве синтезируется, но не являются сверхпродуцентами. Промышленное производство биотина основано на культивировании других микроорганизмов.

Маслянокислое и ацетобутиловое брожение.

Маслянокислое и ацетонобутиловое брожение стали использовать для производства ацетона и бутанола в период первой мировой войны в начале в Великобритании, затем в Германии. Ацетон шел на производство кордита — взрывчатого вещества, а бутанол впоследствии уже после 1930 годов стали применять для изготовления искусственного каучука (искусственной резины). Это брожение свойственно представителям рода клостридий — это анаэробные спорообразующие бактерии, которые в большинстве своем не переносят контакта с кислородом и быстро погибают при контакте с кислородом, поэтому с ними приходится работать в анаэробных условиях и поддерживать культуру. Они эффективно разлагают полисахариды такие как крахмал, некоторые даже разлагают целлюлозу и образуют при этом масляную кислоту, молочную кислоту, уксусную кислоту, а затем включается один ген в работу, который начинает вырабатывать фермент, который начинает переводить углерод, поступающий от глюкозы на другие продукты. Во второй фазе поражения, которая наступает через какой-то промежуток они начинают сбрасывать электроны которые продолжают поступать от глюкозы на преобразованные органические кислоты, такие как масляная кислот, уксусная кислота и превращает их в бутанолмасляную кислоту и в этанолуксусную кислоту. Кроме того образуется и ацетон. Это свойство было обнаружено и использовано для целей производства. С России производство ацетона и бутанола была запущено в 1935 году в г. Грозный. У истоков разработки стоял заведующий кафедры микробиологии Владимир Николаевич Шапошников. За внедрение научных разработок в практику он был удостоен правительственных наград, за учебник по микробиологии был удостоен сталинской премии.

Ацетонобутиловое брожение характеризуется наличием двух фаз. Рост клеток идет по стандартной S-образной кривой. В первую фазу клетки образуют кислоты, которые нарастают и затем снижаются. При этом, наблюдается снижение pH которое по мере уменьшения количества кислот увеличивается. Образование нейтральных продуктов так же имеет вид S-образной кривой (ацетон, этанол, бутанол). Первая и вторая фаза брожения находятся соответственно до и после достижения максимума образования кислот.

В первую фазу клетки активно растут, соответственно, восстановители идут на рост клеток. Их потребление занимает биомасса, поэтому клетки выбрасывают в среду окисленные формы брожения, а окисленные они тратят на свой собственный рост. Когда pH снижается до определенного момента — pH 5, начинается синтез фермента, который преобразует углеродный обмен клетки и начинается сброс электронов на кислоты. Кислоты начинают уменьшаться, зато вместо этого начинается синтез нейтральных продуктов. Клетки находят новых доноров электронов и сбрасывают туда восстановители и восстанавливают кислоты до нейтральных продуктов брожения, что и требуется для производства.

Клостридии делятся на так называемые пуринолитические и на сахаролитические. Микроорганизмы, которые вызывают образование ацетона, бутила, относятся к сахаролитическим, то есть они расщепляются сахара, растут на полисахаридах, таких как крахмале (производство в Грозном было основано на картофельном крахмале). Пуринолитические клостридии в природе расщепляют ДНК, РНК и сбраживают пурины, применяют серу превращаются в какие-то продукты, а вот протолитические клостридии очень опасны для человека. Они расщепляют белки и

один класс из их вызывает токсичных нейротоксинов в продуктах домашнего приготовления, например там есть белок который не выдерживает значение pH меньше 5, он угнетает их рост и такие клостридии могут развиваться в продуктах домашнего изготовления, если они приготовлены без добавления например уксусной кислоты, то там может клостридии, образующие нейротоксин ботулизма, который является самым мощным нейротоксином на земле. Человек умирает очень быстро от паралича мышц. Есть ещё столбнячный токсин, который образует токсин при попадании в кровоток, при этом возникает столбнячный синдром, который приводит к смерти от столбняка. К счастью есть вакцина противостолбнячная, которую раз в 5 лет нужно всем принимать: уколаться и на 5 лет забыть о столбняке.

Кровоток останавливают пережатием сосудов, конечность остается без кислорода, в результате, если в рану попала грязь, то происходит быстрое развитие микроорганизмов, развивается гангрена и самым эффективным средством является ампутация конечности. Поэтому, до появления антибиотиков, много людей лишались конечностей на поле боя.

Лекция 7. Схемы и виды брожений

Ацетонобутиловое брожение. Схема и применение продуктов.

Ацетонобутиловое брожение вызывают анаэробы, спорообразующие клостридии, их постоянное местообитание — почва, они образуют споры по клостридиальному типу залегания. Так же, различают бациллярный и плектродиадный вид залегания спор.

Спорообразующие клостридии проводят маслянокислое ацетонобутиловое брожение. Вначале, клетки образуют кислоты, а во вторую фазу брожения, они преобразуют кислоты в нейтральные продукты (ацетон, этанол, бутанол) — ацетон-бутанол-этанольное (АБЭ) брожение, поскольку нейтральные и конечные продукты брожения — спирты. Это свойство используется людьми для получения ацетона и этанола в промышленных процессах. Ещё одним важным продуктом этого брожения является водород, на этапе образования пировиноградной кислоты при действии ферредоксинзависимой дегидрогеназы образуется пировиноградная кислота и ацетилкофермент А. Поэтому, это брожение сопровождается образованием смеси водорода и углекислого газа. Из смеси выделяют водород, который идет в химическую промышленность в качестве восстановителя.

Схема ацетонобутилового брожения начинается с глюкозы. В промышленности процессы ведутся не на чистой глюкозе, а на крахмалах. Это может быть гидролизованный крахмал (раствор глюкозы), либо крахмал, который добавляется в ферментеры, который расщепляется клостридиями до глюкозы, которая используется в качестве субстрата процесса брожения.

Из глюкозы под действием гликолиза образуется две молекулы пировиноградной кислоты. Под действием ферредоксинзависимой пируватдегидрогеназы, образуется восстановленный ферредоксин, из которого образуется 2 молекулы водорода.

Из 2 пировиноградных молекул образуется 2 молекулы ацетилкофермента А и CO_2 . 2 молекулы ацетилкофермента А идет на образование ацетоацетилкофермента А, который превращается в бутирилкофермент А. Бутирилкофермент А присоединяет неорганический фосфор, превращается в бутирилфосфат (макроэргическое соединение).

Из акта субстратного фосфорилирования образуется АТФ и бутират (масляная кислота).

С другой стороны, ацетоацетил А может идти на образование ацетилфосфата с отщеплением кофермента А. Ацетилфосфат превращается в ацетат. Под действием субстратного фосфорилирования (АДФ в АТФ) образуется в ацетат.

Так же, возможно образование небольшого количества лактата при помощи лактатдегидрогеназы из пирувата.

Данные превращения происходят в первой фазе, когда клетка выделяет окисленные продукты. Происходит снижения pH до значения 5. При pH=5, в клетке начинает работать ген, который выделяет ацетатдекарбоксилазу — фермент, который работает на второй стадии процесса при котором образуются нейтральные продукты. На втором этапе, ацетат обменивается с ацетоацетилкоферментом и превращается в ацетоацетилкофермент А.

Ацетоацетилкофермент А обменивается с коферментом А и получается ацетоацетат. Из ацетоацетата образуется ацетон + CO_2 (нейтральный продукт). Под действием восстановленного пиридиннуклеотида, ацетон может превратиться в изопропанат (нейтральный продукт).

Бутират обменивается с ацетоацетилкоферментом А и превращается в бутирилкофермент А, который превращается в бутират (бутилальдегид). Который восстанавливается в бутанол под действием бутирилнуклеотида.

Ацетилкофермент А восстанавливается до ацетальдегида, который восстанавливается в этанол (нейтральный продукт) под действием восстановленного пиридиннуклеотида.

Кислые продукты уходят и восстановление и рН вновь повышается. Существует обмен: фермент ацетоацетатдекарбоксилаза активируется при рН меньше или равным 5. С его помощью начинается процесс перехода из ацетона в ацетоацетат, путем декарбоксилирования. Далее, образуется ацетоацетаткофермент А, который может идти на образование бутанола или этанола. Суть процесса — ацетат уходит из среды на образование нейтральных продуктов. Аналогично, бутират обменивается с ацетоацетилкоферментом А, получается бутирилкофермент А, который уходит на образование бутанола. Таким образом, образуется саморегулирующая система, образующая такие продукты как ацетон (идет на производство кардита), бутанол (производство искусственной резины — синтетический каучук).

За рубежом, заводы по производству ацетона и бутанола строятся с первой мировой войны — с 1913-1914 годов, в нашей стране — с 1935 года. К концу 20 века все заводы закрыли, потому как стали получать ацетон и этанол из продуктов нефти, что было дешевле, выгоднее и с большим выходом продукта. Сейчас, ситуация изменилась и заводы снова стали открывать для производства топливного бутанола. Топливный этанол и бутанол рассматривают как перспективный, возобновляемый вид топлива для двигателей внутреннего сгорания. Данным процессом занимается множество лабораторий по миру, занимающихся разработкой топлива для автомобилей. Так же, рассматривается идея использования в качестве субстрата пищевых продуктов для получения топлива, энергии, поддержания жизни людей. Поэтому, во избежание конфликтов рассматриваются источники возобновляемого сырья — целлюлоза. Целлюлозу гидролизуют до глюкозы и уже после используют раствор глюкозы для производства различных веществ.

Аминокислотное брожение.

Клостридии могут осуществлять не только ацетонобутиловое брожение. Есть ряд клостридий, которые могут осуществлять другие брожения.

В 1934 году, английский ученый Стинглер, показал, что некоторые клостридии могут быстро и легко сбраживать растворы или пары аминокислот, но не могут сбраживать аминокислоты по отдельности. Он объяснил данный феномен тем, что существуют так называемые аминокислоты-доноры и аминокислоты-акцепторы. В природе, когда происходит сбраживание аминокислот всегда присутствует несколько аминокислот, поэтому у микроорганизмов не возникает проблем с поиском различных аминокислот, которые не сбраживаются. В лаборатории, такие проблемы возникают — есть аминокислоты, которые не сбраживаются, если они являются единственным источником энергии. Однако, при добавлении других аминокислот, начинается процесс

сбраживания. Оказалось, что есть аминокислоты-доноры электронов — аланин, лейцин, изолейцин, валин, серин, метионин. Акцепторы электронов — глицин, пролин, аргинин, триптофан.

При брожении происходит следующее: аргинин + 2 молекулы глицина + 2 H₂O = 3 ацетат + 3NH₃ + CO₂.

При этом брожении, аланин претерпевает окислительное дезаминирование, а глицин претерпевает восстановительное дезаминирование и карбоксилирование. В этом процессе, продуктами реакции являются жирные кислоты — ацетат.

Патогенные клостридии.

Среди клостридий, осуществляющих такие превращения аминокислот — так называемые, протолитические клостридии, которые в природе расщепляют белок в анаэробных условиях до аминокислот. Среди таких клостридий есть патогенные формы — микроорганизмы, которые в силу питательных потребностей расщепляют белки, образуя при этом, мощные нейротоксины, приводящие к смерти животных или человека при попадании в кровь. В кровь клостридии попадают из почвы в кровь теплокровных животных. Температура развития клостридий — 37°C, вызывая гидролиз белков и образуя нейротоксины.

Такие микроорганизмы вызывают газовую (госпитальную) гангрену, когда в рану на полях сражений попадает почва. Кровоток останавливают пережатием сосудов, конечность остается без кислорода, в результате, если в рану попала грязь, то происходит быстрое развитие микроорганизмов, развивается гангрена и самым эффективным средством является ампутация конечности. Поэтому, до появления антибиотиков, много людей лишались конечностей на поле боя.

Другой вид клостридий образует мощный нейротоксин, вызывающий столбняк. Столбняк вызывает паралич мышц и человек умирает от удушья. Возбудитель обитает в почве. Поэтому если есть возможность повреждения, необходимо предохраняться вакцинированием раз в 5 лет.

Клостридии так же выделяют самый мощный на земле нейротоксин — ботулин (токсин ботулизма). Почвенный микроорганизм, который при попадании в консервированные продукты может развиваться. При его попадании в желудочно-кишечный тракт, человек может умереть от удушья. Микроорганизм развивается при pH близких к нейтральному и в анаэробных условиях. Поэтому, консервы раздуваются от внутреннего давления из-за образования CO₂. На производствах случайным образом происходит проверка на стерилизацию. Для этого, банки ставят на две недели, при 37°C и смотрят, вздулись банки или нет. Если они стали «бомбажными» (вздулись от внутреннего давления), то партию бракуют и не допускают до дальнейшей реализации. Поэтому, консервы надо хранить при определенной температуре. Предохраняются от образования клостридий и их спор путем снижения pH до 3-5. Соответственно, вероятность отравления токсином ботулизма снижается.

Если вы попадаете в ситуацию, когда у вас есть только одна банка консервов и она бомбажная, избежать отравления ботулизмом можно кипячением. В течении 15 минут кипячения токсин ботулизма инактивируется.

Клостридии, фиксирующие азот.

Среди клостридий есть организмы, фиксирующие азот — *C.pasterianum*, которые выделил профессор Виноградский. Он растет на средах без азота, фиксируя азот из окружающей газовой фазы. Обычно, в газовой фазе, заменяют воздух на азот. Виноградский выдели анаэробный азотфиксирующий организм. Аэробный азотфиксирующий организм был выделен в виде азотобактера Бейеринга.

Сукцинат-этанольное брожение.

Двусубстратное брожение открыто не только для аминокислот. Другой пример двусубстратного брожения, которое характеризуется тем, что два субстрата по отдельности не сбраживаются, а сбраживается только их смесь до продуктов. Один субстрат выступает в качестве донора электронов, второй — в качестве акцепторов.

C.kluuyveri — клостридия названная в честь Клувери, который был приемником Бейеринга. Субстратом является сукцинат (акцептор) и этанол (донор). При этом брожении этанол преобразуется в ацетальдегид с выделением 2 протонов. Сукцинат при действии ацетилкофермента А образует сукцинилкофермент А + ацетат. Сукцинилкофермент А восстанавливается в полуальдегид сукцинилкофермента А за счет восстановителя — протонов от этанола.

Отщепляется кофермент А и восстанавливается полуальдегид до 4-гидроксibuтирата. Получает 2 протона из реакции окисления ацетальдегида до ацетилкофермента А.

4-гидроксibuтират превращается в винулацетат. При этом отщепляется молекула воды.

Винулацетат превращается в винулацетаткофермент А + ацетат. Ацетилкофермент А приходит с более низких стадий.

Винулацетаткофермент А превращается в кротонилкофермент А, затем в гидроксibuтирилкофермент А с отщеплением двух протонов образует ацетилкофермент А. Ацетилкофермент А дает две молекулы ацетоацетилакофермента А.

Ацетилкофермент А (из реакций этанола) расщепляется до ацетилфосфата (макроэргическое соединение), из него образуется ацетат по действием субстратного фосфорилирования.

Поэтому при одновременном сбраживании сукцината и этанола образуется три молекулы ацетата.

Mixacidfermentation — брожение смешанного типа при котором происходит выделение аминокислот.

Глюкоза переходит в пируват. Пируват может превратиться в ацетилкофермент А + ацетальдегид + этанол. Далее, происходит образование формиата, который расщепляется до $\text{CO}_2 + \text{H}_2$.

Второй путь: из пирувата образуется ацетилкофермент А + CO_2 + восстановленный ферридоксин. Ацетилкофермент А превращается в ацетилфосфат и уже после в ацетат и АТФ.

Бактерии, осуществляющие смешанное брожение.

В разных условиях образуются в разных пропорциях такие продукты как формиат, ацетат, этанол, водород, CO_2 . Это брожение вызывают энтеробактерии. Энтеробактерии входят в класс 3 гамма-протеобактерий, сгруппированы в порядок *Enterobacteriales*, первое семейство *Enterobacteriacia*. И множество родов, например,

род *Escherichia* — нормальный обитатель кишечника животных, но этот организм оказался очень удобным в качестве санитарнопоказательного организма. Разработаны удобные среды для выращивания *E.coli*. Их колонии красные с металлическим блеском, их можно быстро подсчитать, что можно использовать в качестве показателя очистки питьевой воды — показать, заражена вода фекальными сточными водами или нет. Что является важным показателем очистки питьевой воды. По этому показателю существует два норматива, как Coli-индекс — для истой питьевой воды больше 500. Определяет наличие 1 клетки *E.coli* в количестве миллилитров воды, т.е. 1 клетка на 0.5 литра воды. Coli-титр — обратный показатель, определяющий сколько клеток *E.coli* может находиться в очищенной питьевой воды. Равен 1-2, т.е. в 1 литре воды может находиться 1-2 клетки. В Европе принят другой стандарт: Coli-индекс больше 300, Coli-титр — 3.

Этот организм так же является модельным организмом для генной инженерии. Его геном хорошо изучен, и на его основе сделано множество продуцентов белков. Но среди вида *E.Coli* есть патогенные штаммы — O157 вызывает тяжелые инфекции со смертельным исходом.

Род *Citrobacter* содержит организмы, которые с очень высокой скоростью образуют водород. Они обладают мощной формиаггидрогеназной системой, которая расщепляет формиагг на H и CO₂. Представители этого рода играют большую роль в биотехнологических системах, когда из органического вещества необходимо произвести много водорода.

Род *Enterobacter* — нормальный обитатель кишечника, без патогенных форм.

Род *Erwinia* — представители рода вызывают мягкие гнили у корнеплодов. Обладают мощными пектат-лиазами — расщепляют пектин. Соответственно, в разрушенные ткани проникают другие патогенные микроорганизмы и вызывают гибель урожая. Пектиназы выделяют, очищают и используют в опытах по созданию гибридных растений — расщепляют межклетники для выделения чистого генетического материала.

Род *Serratia* — «чудесная палочка», образует яркоокрашенные красные колонии в средах с крахмалом. Появляется на средах с крахмалом во влажных условиях. Этим пользовались в средние века церковники. Когда прихожане приносили хлеб, на нем появлялись колонии *S.marcescens*, что церковники объясняли гневом Бога — мол, прихожане мало приносят хлеба, нужно ещё, ведь на нем проступили капли крови. Продолжалось это до тех пор, пока в конце 17 века один из итальянских исследователей не показал, что это не кровь, а клетки микроорганизмов.

Род *Salmonella* — вызывает инфекционные заболевания — сальмонеллез, брюшной тиф. Серьезные возбудители инфекций, если не соблюдать методы гигиены, не обрабатывать пищевые продукты. Возможен летальный исход.

Род *Shigella* — вызывает инфекционные заболевания — вызывает шигелла-дизентерию.

Род *Klebsiella* — вызывает инфекционные заболевания — вызывает кишечные инфекции и пневмонию клебсиелла. Поселяется в легких больного, выделяет токсины и покрывается внутри ткани легкого твердой полисахаридной пленкой, через которую плохо проникают антибиотики. Поэтому, лечение затруднено. Сейчас возникают устойчивые к антибиотикам формы *Klebsiella*.

Род *Yersinia* — *Y.pestis* — возбудитель чумы. Заболевание, которое относится к особо опасным инфекциям. За чумными областями происходит постоянный контроль санитарных служб. Есть природный источник чумы — блохи животных, крыс. После блошиного укуса бактерии проникают в кровь и вызывают бубонную чуму. Бывает легочная чума, которая заканчивается смертельным исходом, если не принять соответствующие меры.

Род *Vibrio* — *V. cholera* — «холерный эмбрион» — вызывает холеру, которая быстро переносится от человека к человеку и вызывает тяжелое протекание болезни. Если не принимать мер, то человек может умереть в течении нескольких часов. Этот организм выделяет специальный белок, который прикрепляется к стенкам кишечного эпителия и вызывает выход в просвет кишечника ионов Na угольной кислоты и Cl . Клетки не могут удерживать эти ионы и человек погибает от обезвоживания, потому что организм не может одновременно удерживать ионы и воду. Самым эффективным способом лечения активных форм холеры является питье воды с солями ионов натрия и хлора.

Все эти организмы проводят брожения смешанного типа, образуя разные кислоты. Проживают в почве и воде.

Род *Salmonella* и *Vibrio* на которых проводили исследования образуют так называемые неживые формы. Микроорганизмы живые, они находятся в водоемах, но когда делают высев на специальные диагностические среды они не проявляют себя, поэтому принимается ошибочное решение, что всё безопасно, а на самом деле эти живые некультивируемые формы могут попадать в кишечник и вызвать заболевания. Что опасно с точки зрения эпидемиологического состояния внешней среды. Ученые многих стран работают над проблемой культивирования неживых форм. Есть методы и красители, которые окрашивают только живые клетки (связано с работой метаболизма, ферменты превращают краситель во флуоресцирующие и они светятся), но при высеве на среду, они не светятся, это и есть живые не культивируемые формы бактерий. Они характерны для многих родов и это является большой проблемой — как из живой некультивируемой формы сделать культивируемую. Это одна из важнейших проблем современной микробиологии.

Общая схема всех брожений.

Схема, которая поможет осознать весь пройденный материал по брожению:

Глюкоза является стартовым субстратом. При гликолизе получается пиридиннуклеотид — образуется пируват.

Молочнокислые бактерии: с помощью лактатдегидрогеназы, пируват восстанавливается до лактата.

Дрожжи: реакция образования этанола через ацетальдегид, который восстанавливается до этанола.

Пропионовокислые бактерии: из пирувата образуют оксалоацетат. Оксалоацетат присоединяет к пирувату CO_2 , превращаясь в сукцинат. От сукцината отщепляется молекула CO_2 с образованием пропионата.

Энтеробактерии: из пирувата образуется формиат, который расщепляется на CO_2 и H_2 — продукты брожения смешанного типа. Так же, образуется ацетилкофермент А, который может превратиться в ацетат или этанол.

Клостридии — из пирувата образуют CO_2 и водород. Ацетилкофермент А из которого может образоваться ацетат. С помощью субстратного фосфорилирования АТФ появляется ацетоацетилкофермент А, превращается в бутират с образованием АТФ. Затем, бутират может превратиться в бутанол на второй фазе брожения либо в ацетон. Ацетон может восстановиться в изопропанол.

Брожения характеризуются тем, что клетки получают энергию за счет субстратного фосфорилирования, что, как считают, было первым опытом жизни на земле и первым способом получения энергии микроорганизмами, возникших в анаэробной среде, когда всё живое получало энергию только за счет субстратного фосфорилирования и брожения.

Лекция 8. Анаэробное дыхание

Путь получения энергии микроорганизмами при брожениях — субстратное фосфорилирование. Считают, что на древней, анаэробной Земле возникли организмы, получающие энергию методом субстратного фосфорилирования — бродильщики, после, появились организмы, которые перешли на более эффективный метод получения энергии и выработали способность использовать окислительное фосфорилирование для формирования АТФ. Окислительное фосфорилирование связано с механизмом электрон-транспортной цепи, которая локализована в мембранах (цитоплазматическая, внутренние мембранные везикулы), что было большим шагом к установлению аэробного дыхания. Данный процесс осуществлялся несколько миллиардов лет, поскольку анаэробное дыхание не могло осуществляться без достаточного количества накопленного кислорода. Сначала появились фотоавтотрофные организмы, которые осуществляли аноксигенный фотосинтез, после появились аэробные фототрофы, которые осуществляли оксигенный фотосинтез. Первыми появились цианобактерии. Анаэробы, которые ранее использовали анаэробное дыхание, перешли на передачу электронов на более окисленный элемент — кислород, в результате чего клетки получили большую возможность для формирования АТФ, поскольку разница потенциала значительно увеличилась, поскольку увеличилась энергия, связанная с окислительным фосфорилированием при переносе электрона на кислород.

Анаэробное дыхание.

Анаэробное дыхание скорее всего возникло у организмов, которые напоминают современных ацетогенов. Эти организмы были впервые выделены в чистые культуры в 1936 году. В 1940-х годах было установлено, что такие организмы, которые являлись строгими анаэробами способны сбраживать глюкозу с образованием трех молей ацетата.

В то же время было предположено, что 2 моля ацетата возникают из пируватов (гликолиз), каждый пируват расщепляется на ацетилкофермент А + CO_2 с последующим образованием ацетата с образованием АТФ в результате субстратного фосфорилирования.

Два ацетата появляются по логичному пути брожения из глюкозы. Соответственно, третий ацетат должен образоваться из двух молекул CO_2 + H^+ . Поскольку, по результатам измерений, было понятно, что клетки из молекул глюкозы в отсутствие внешних акцепторов электронов образуют три молекулы ацетата из одной молекулы сброженной глюкозы. Образование третьего ацетата оставалось загадкой до

1991 года. Почти 50 лет вели исследования. В 1945 году в лаборатории профессора Баргера (США), когда появились изотопы, меченные по углероду, было показано, что оба атома углерода в третьем ацетате возникают из CO_2 . То есть, каким-то образом происходит синтез молекулы ацетата. На расшифровку этого механизма ушло последние 30 лет. С 1970-х годов появились анаэробные камеры для изучения и выделения анаэробных ферментов, которые в присутствии кислорода инактивируются простетические группы. Поэтому, все исследования необходимо было проводить в анаэробных условиях.

Путь Вуда-Льюнгдала.

Иногда ферменты бывают температурочувствительными, поэтому боксы необходимо было помещать в холодные комнаты. В итоге, был расшифрован механизм образования ацетата из двух молей CO_2 — представляет собой не циклический, а линейный механизм — путь Вуда-Льюнгдала:

Пируват-1 и пируват-2:

Глюкоза с помощью реакций гликолиза превращается в две молекулы пирувата с образованием АТФ и восстановленных пиридиннуклеотида. Пируват восстанавливается с помощью ферридоксинзависимого фермента, образуется ферридоксин восстановленный + ацетилкофермент А + CO_2 . (*)

Из ацетилкофермента А образуется ацетилфосфат.

Ацетилфосфат превращается в ацетат с образованием АТФ (присоединяется фосфат и выделяется кофермент А, который идет на стадию (*).

CO_2 -1:

Молекула CO_2 претерпевает восстановление с помощью неизвестного донора (возможно, формиатдегидрогеназа, но не доказано), превращается в формиат.

Формиат садится на тетрагидрофосфат с использованием энергии АТФ. Образуется 10-формилтетрагидрофолат.

Стадия гидролиза: 10-формилтетрагидрофолат превращается в 5,10 – метинилгидрофолат.

Восстановление метильных групп с образованием 5,10 –метилтетрагидрофолат с последующим использованием восстановленного ферридоксина до 5-метилтетрагидрофолат (**).

Co_2 -2:

CO_2 превращается в СО (предположительно при помощи СО-гидрогеназы, что до конца не доказано) с выделением воды.

СО идет на реакцию с метилтетрагидрофолатом (**)

Метилтетрагидрофолат переносится на молекулу *enzymetetraB12* (простетическая группа — B12), получается *methylbetaenzyme*, с последующим образованием ацетилкофермента А.

Из ацетилкофермента А образуется ацетилфосфат с последующим образованием ацетата под действием субстратного фосфорилирования.

Механизм работы СО-дегидрогеназы-ацетил-СоА-синтазы.

В 1991 году было доказано, что фермент проводит трехсубстратную реакцию, в которой принимает участие метилпереносящий фермент с коферментом B12 и СО. Фермент был назван СО-дегидрогеназа-ацетилКоА синтаза. Фермент был выделен,

очищен, его ген был секвенирован, было показано количество простетических групп, кофакторы, субъединичный состав.

Было предположено, что у этого фермента тройная простетическая группа XYZ, которая участвует в превращениях. На первом этапе происходит присоединение молекулы CO к Y, CO возникает из реакции, осуществляемой при помощи восстановителей. На втором этапе происходит присоединение -CH₃ группы на X с помощью фермента, имеющего простетическую группы в виде витамина B₁₂. На третьем этапе происходит простетическая перегруппировка. Кофермент A садится на Z-группу. Четвертый этап — высвобождение фермента, который идет на простетическую группу, происходит образование ацетилкофермента A с образованием АТФ и ацетата.

При изучении этого фермента самым сложным было его установить, поскольку все остальные ферменты были известны и можно было исследовать все восстановительные реакции, оставалось их сравнить и показать, что в этой трехсубстратной реакции присутствует новый фермент.

Бактерии, имеющие путь Вуда-Льюнгдала.

Показано, что путь Вуда-Льюнгдала имеет большое число микроорганизмов. Он функционирует у всех ацетогенов, способных расти на средах CO₂+H₂ — автотрофные микроорганизмы, не использующие других источников углерода для синтеза — фиксация CO₂ для построения органических веществ.

Так же, он был обнаружен у архей, метаногенов — строго анаэробные организмы, осуществляющие превращения ацетата, CO, CO₂, H₂ в метан. Могут низкие концентрации водорода превращать в метан, в отличие от ацетогенов, который не могут синтезировать ацетат при низких концентрациях водорода, поэтому они проигрывают метаногенам в анаэробных условиях. Ацетогены осуществляют синтрофный метаболизм в анаэробных экологических нишах.

Микроорганизмы, которые могут расти на чисто литотрофных средах (в газовой фазе только CO₂ и H₂) могут образовывать ацетат — хемолитоавтотрофы. Имеют единственных конкурентов за водород — метаногенов.

Механизм достройки углеродного скелета ацетил-CoA.

Из образовавшегося ацетилкофермента A, который идет на биосинтез осуществляется достройка C₂-скелета (скелет из двух субъединиц углерода) до общепринятых C₅-C₆ соединений из которых идет глюконеогенез и синтез аминокислот.

Ацетилкофермент A [2] достраивается до пировиноградной кислоты [C₃] с фиксацией CO₂.

Пируват с помощью АТФ превращается в фосфоенолпируват, который может присоединять CO₂ с образованием оксалоацетата с которого идет путь на биосинтез аспарагиновой кислоты [C₄].

Оксалоацетат восстанавливается до малата с помощью восстановленной пиримидиновой кислоты. Малат превращается в фумаровую кислоту, при этом отщепляется молекула воды. Фумарат с помощью восстановительных реакций от флавопротеидов (ФМН) превращается в сукцинат. Сукцинат превращается в кофермент

А с затратой энергии АТФ (цикл трикарбоновых кислот), образуется сукцинилкофермент А

Сукцинилкофермент А может фиксировать CO_2 с образованием альфа-кетоглутаровой кислоты (2-оксоглутарат) [C5]. Возможен биосинтез глутаминовой кислоты.

Фиксация ещё одного CO_2 приводит к образованию изоцитрата [C6]. Далее, возможен биосинтез лимонной кислоты.

Путем последовательных достроек молекулы Ацетилкофермента А с последовательным присоединением молекул CO_2 образуется изоцитрат. Из промежуточных стадий уходят на биосинтезы различных аминокислот, что идет в общий анаболизм клетки — построение клеточного метаболизма.

Ацетогены в природных нишах.

Ацетогены широко распространены в окружающей среде — в анаэробных природных экологических нишах, поскольку это организмы способные расщеплять большое количество субстратов, обладают большими возможностями по гидролизу различных соединений в среде. Могут гидролизовать целлюлозу — самый распространённый на Земле полисахарид, образующийся в громадных количествах. После сезона листопада, целлюлоза попадает в анаэробные условия, где происходит её конверсия. В аэробных условиях целлюлоза разлагается грибами — самый быстрый и эффективный способ расщепления внеклеточными целлюлазами, гидролизуя до глюкозы, которая впоследствии используется грибами в качестве энергии.

В анаэробных условиях все процессы идут не так быстро, как в аэробных условиях. Один из таких процессов — использование целлюлозы ацетогенами, когда клетки, принадлежащие роду клостридий начинают гидролизовать целлюлозу с образованием молекул глюкозы. Гидролиз идет быстрее, чем потребление, поэтому эти мономеры становятся доступными для других организмов, у которых нет целлюлоз. Таким образом, процесс брожения идет медленнее чем в аэробных условиях, но всё так же заканчивается образованием углекислого газа, воды, водорода и метана.

Бактерии с ацетил-СоА путем.

Микроорганизмы, в которых установлен ацетилКоА путь имеют представителей в нескольких анаэробных родах *Clostridium thermoaceticum* (выделил Фонтейн в 1942г), первый организм, который рос автотрофно на средах CO_2 и H_2 . *C. Formicoaceticum*, организм, который растет на средах с формиатом. *C. thermoautotrophicum* — растет при температуре 65С, на средах с метанолом, образует ацетат и водород (нельзя хранить в плотно закупоренной бутылки — взрывается от давления). *C. magnum*, *C. pfennigii*, *C. aceticum* (выделен первым из ацетогенов Бейерингом в 1936 г.). *C. aceticum* образует из глюкозы три молекулы ацетата.

Ацетогены стоят на промежуточном пути, поскольку две молекулы продукта их метаболизма образуется по прямому пути брожения (их метаболизма), а третий продукт образуется с помощью ацетилКоА пути — анаэробное дыхание, когда протоны и водород являются донорами электронов, а CO_2 — акцептором. Это один из двух путей (механизмов) так называемого анаэробного карбонатного дыхания. Термин «анаэробное карбонатное дыхание» был придуман для процессов, которые осуществляют ацетогены при анаэробном карбонатном дыхании они окисляют водород

и восстанавливают CO_2 в анаэробных условиях. Второй процесс автотрофного метаболизма — метаногенез — процесс, приводящий к образованию метана. Метаногены при проживании в анаэробной среде так же используют ацетат. Так, данный процесс осуществляют метаногены и археи, вторые — бактерии и ацетогены.

С 1977 года началось интенсивное исследование ацетатообразующих микроорганизмов. К ацетогенам относятся не все микроорганизмы, которые образуют ацетат, так как ацетат производят микроорганизмы, имеющие смешанное брожение, микроорганизмы, которые окисляют этанол до уксусной кислоты. Если организмы не проводят реакцию восстановления CO_2 за счет протонов и электронов, они не могут считаться ацетогенами. К представителям истинных ацетогенов, относят представителей рода *Sporomusa* — *S. acidovorans*, *S. termitiga*, *S. Sphaeroidas*, *S. ovata*. Среди анаэробных родов есть род ацетогенов *Acetobacterium woodii* (назван в честь Харланда Вуда открыл образование пропионовой кислоты при гетеротрофной фиксации CO_2). *A. carbinolium*, *A. wieringae*. *Acetogenium kivui*, *Acetoanaerobicum*, *Eubacterium*. *Pectostreptococcus productus* (единственный представитель рода, выделенный в чистую культуру), интересен тем, что для своего метаболизма не использует протонный цикл. При протонном цикле с помощью первичного транспорта наводят протонный градиент через плазматическую мембрану, который потом используется для энергетического транспорта веществ в клетку или из клетки. *P. Productus* не имеет протонного транспорта, в отличие от всех остальных организмов на Земле, для транспорта ионов использует ионы натрия. Na-зависимая АТФаза, использует только градиент Na для биохимического метаболизма, вся его энергетика основана на натрии.

Ацетогены были выделены до 1980-х годов с ними мало работали, только с 1977 года начали работать интенсивно. *S. aceticum* изучал в США, после он был потерян, в 1980 годы его оживил профессор Гольдшар из спор, найденных в коллекции лаборатории Камена.

Субстраты для ацетогенов.

Ацетогены используют целый ряд субстратов:

1. Из глюкозы образуется три молекулы ацетата
2. Фруктоза
3. Целлюлоза — является значимым субстратом в глобальном метаболизме углерода
4. C5-сахара (ксилоза, ксилан) с образованием 5 молекул ацетата — в древесине растений содержатся как целлюлоза в виде скрепляющего вещества, так и гемицеллюлоза, которая содержит C5-сахара, который образуются при гидролизе и их могут утилизировать немногие организмы
5. 4 Пируват + $2\text{H}_2\text{O}$ — образование 5 ацетатов + 2CO_2 . Пирувата в свободном виде почти нет.
6. $4\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 = \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$ — реакции анаэробного карбонатного дыхания
7. $\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} = \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2$ — приводит к потреблению угарного газа, что важно для ликвидации различных загрязнений. CO — ядовитый газ для аэробных организмов, так как блокирует перенос электронов с цитохромоксидазы на кислород. Цепь переноса электронов прерывается, и организм умирает. Конкурентом

для CO является кислород, он конкурентно вытесняет CO из цитохромоксидазы, поэтому, если человек отравился угарным газом, ему надо сделать искусственное дыхание и вынести на чистый воздух. Организмы, являющиеся аэробами, образуют ацетат из CO .

Есть организм, который потребляет только CO образуя ацетат — полезный организм для биотехнологического приложения.

8. Реакция окисления метанола $4\text{CH}_3\text{OH} + 2\text{CO}_2 = 3\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$

Метанол так же является субстратом ацетогенов, что важно в экологическом плане, так как метанол может появиться в аэробных и анаэробных условиях при разложении лигнина и пектина (полисахарид, который образуют растения в своих плодах), при попадании в почву, пектин разлагается с образованием из боковых групп метанола. Метанол всегда присутствует в среде в малых количествах, поэтому микроорганизмы, который используют метанол широко распространены в природе. В анаэробных условиях так же может появиться метанол, который может быть субстратом ацетогенов и метаногенов

9. $4\text{HCOOH} = \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. Реакция превращения формиа в ацетат редко встречается в природе, поскольку формиа в природе не накапливается, но он образуется в результате брожения смешанного типа. Формиа образуют энтеробактерии, они же его способны разлагать на CO_2 и H_2 , но, если он появляется в природе, ацетогены могут его превратить в ацетат.

Другие субстраты: галактоза, рибоза, маннитол, глицерол, органические кислоты, аминокислоты, могут быть превращены в ацетат. Ацетогены могут использовать боковые ответвления сложных молекул, такие как ванилиновая кислота, бензойнокоричная кислота — там есть CH_3 -группы, который и превращают в ацетат. У ацетогенов очень широкий природный субстратный диапазон, поэтому они могут много субстратов в анаэробных условиях до ацетата, что важно в процессе разложения биологических соединений.

Синтрофия ацетогенов и метаногенов.

В анаэробных условиях ацетогены сосуществуют с метаногенами в анаэробных условиях — синтрофный метаболизм, поскольку ацетогены образуют ацетат, а ацетат, один из субстратов метаногенеза. Метаногены, помогают утилизировать ацетат, который иначе закисляет среду обитания и превращает его в биогаз — метан и CO_2 . Поэтому ацетогены разлагают большое количество субстратов до ацетата, а метаногены разлагают эти продукты до биогаза. Биогаз поднимается из анаэробных мест обитания к поверхности и попадает в атмосферу, где на границе раздела фаз: кислород-содержащая фаза и анаэробная фаза, где могут поселиться метанооксиляющие микроорганизмы, которые улавливают часть метана, образуя из него CO_2 и воду.

Механизм образования ацетата в природе.

Если рассматривать глобальные процессы, то в природе ежегодно образуется и метаболизируется 10^{10} тонн ацетата/год, поскольку ацетат не накапливается в природе. В большинстве, ацетат образуется в результате брожений в котором принимает участие ацетогены, но 10% ацетата образуется за счет реакций $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ — анаэробного карбонатного дыхания ($6 \cdot 10^5$ тонн/год). Ацетат образуется и в толще кишечника человека в количестве $1,3 \cdot 10^4$ тонн/год во всей человеческой популяции. Так же, он

образуется в кишечнике тараканов, крыс, термитов и крупного рогатого скота. Например, термиты маленькие, но их много, поэтому количество образуемого ацетата значительно. В сутки они образуют $2.3 \cdot 10^6$ тонн/сутки — экологически значимое количество ацетата, который идет на питание термитов.

Везде, где существуют анаэробные места обитания образуется ацетат ацетогенами и метан метаногенами. В рубце коровы образуется метан, который выделяется из рубца при отрыгивании части переваренной биомассы и выдыхается в атмосферу. В день, 1 корова может произвести до 900 литров метана, который поступает непосредственно в атмосферу и никак не улавливается микроорганизмами микробного газового цикла. Поэтому, метан, образуемый жвачными животными, накапливается и поступает в верхние слои атмосферы, где его жизнь оценивается в несколько лет за счет фотоокисления метана. Метан — второй по значимости парниковый газ, отражательная способность которого для световых лучей в 25 раз больше чем у CO_2 .

Профессор Брежнек (Breznek) из Мичиганского университета написал в одном обзоре, «как бы было замечательно, если бы ацетогены заменили метаногены в желудке животных. Тогда бы ацетогены образовывали ацетат, который бы впитывался в кровь животного и углерод из съеденной биомассы не выделялся бы в виде метана и CO_2 в атмосферу и весь бы усваивался. Тогда бы коровы стали более выгодными животными для производительности». Некоторые лаборатории пытались работать над заменой метаногенов на ацетогены, но безуспешно.

В последнее время появился интерес к производству топливного этанола, который подразделяют по поколениям:

1 поколение: из сахаров (свекольный сахар, крахмал, глюкоза). Путь приводит к конфликту интересов, поскольку многие люди из зеленых партий протестуют, когда пищевые продукты переводят на энергетику, а люди голодают.

2 поколение: из целлюлозы (гидролиз полиглюкозы)

3 поколение: из сингаза ($\text{CO} + \text{H}_2$), можно получить при подземном сжигании угля, который находится в непрезентабельных местах — его мало для построения шахты. Бурят скважину, поджигают уголь и получают сингаз для использования в промышленности. Так же, получают промышленным способом из метана. Ацетогены из сингаза могут образовывать ацетат, а далее, могут восстановить ацетат в этанол. Из металлургических процессов сингаз образуется как побочный продукт, поэтому его можно переводить в топливный этанол.

Лекция 9. Метаногены (в названии презентации ошибка — метагены)

Анаэробное карбонатное дыхание.

Ацетогены — строго анаэробные микроорганизмы, которые осуществляют анаэробное дыхание, восстанавливая CO_2 — анаэробное карбонатное дыхание. Известно два вида анаэробного карбонатного дыхания — ацетогенез и метаногенез. Строго говоря, анаэробное карбонатное дыхание, это восстановление CO_2 от водорода — водород является донором, CO_2 — акцептором электронов, в результате образуется водород и метан и это классическое карбонатное дыхание. Однако, ацетогены стоят на промежуточном пути между бродильщиками а микроорганизмами, осуществляющими анаэробное дыхание, так как, когда анаэробные микроорганизмы образуют ацетат, две молекулы ацетата образуются по бродильному механизму, а третья молекула ацетата формируется за счет анаэробного карбонатного дыхания, когда водород является донором, CO_2 — акцептором электронов. Здесь, можно проследить, как клетки запасают АТФ.

Метаногены.

Второй вид анаэробного карбонатного дыхания — образование метана. Метаногены, это представители архей, это наиболее древние организмы, пик их развития на анаэробной Земле пришелся на период, когда в атмосфере не было кислорода, а присутствовал только водород, метан и CO_2 . Этот метаболизм у них остался до настоящего времени, они занимают строго анаэробные ниши (строгие анаэробы), которые не выдерживают контакта с кислородом, однако есть исключения. Существуют некоторые метаногены, которые переносят контакт с кислородом.

Метаногены занимают определенную позицию в превращении углерода на Земле. Они выполняют очень важную роль для круговорота углерода на Земле, который начинается с фиксации CO_2 водорослями или растениями в процессе окислительного фотосинтеза, хемолитотрофами, которые фиксируют CO_2 имея в качестве источника энергии неорганические вещества. Таким образом запасается первичная энергия, которая затем, после отмирания живых организмов попадает в разные экологические ниши. В аэробной ниши происходит быстрое разложение за счет анаэробного дыхания, гидролиз полимеров до мономеров и быстрое превращение за счет брожения в CO_2 и воду. В анаэробных системах, процесс идет медленнее, но все равно кончается образованием CO_2 и метана, если нет дополнительных акцепторов электронов.

Схема выглядит следующим образом: при попадании в анаэробные условия обитания, полимеры гидролизуются до мономеров, вступают в действие бродильщики, которые сбрасывают мономеры с образованием органических кислот, водорода и CO_2 , далее вступают в действие синтрофные микроорганизмы, которые превращают органические кислоты в ацетат. В этот момент наступает время метаногенов потому, что в анаэробных местах обитания, если нет других акцепторов электронов (сульфаты, нитраты, трехвалентное железо), единственными организмами, которые могут перерабатывать ацетат в таких условиях — метаногены, которые разлагают ацетат на метан и CO_2 .

Субстраты для метаногенов.

У метаногенов узкий спектр субстратов, которые они могут преобразовать до метана и CO_2 . Смесь метана и CO_2 называют биогазом. Эти субстраты условно разделяют на три группы:

1. субстраты водороднесущие (водород+ CO_2 , формиат, CO);
2. ацетат (ацетокластический метаногенез);
3. одноуглеродные субстраты — субстраты, которые несут в себе CH_3 -группы (метанол, метилированные амины, метилированные сульфиды).

Метан, как газ был открыт в 1776 году в экспериментах итальянского исследователя Александра Вольта (в его честь названы вольты в электрических сетях), по совету своего друга, монаха, начал изучать «горючий воздух» — газ, который выделялся из заболоченных мест обитания. Он выплывал на лодке до заболоченного места, ставил банку с воронкой наверху, чтобы собирать газ и взмучивал осадок. Из осадка поднимался газ (биогаз) и Александр Вольта стал экспериментировать с этим газом. В то время не было серьезных приборов, поэтому он конструировал «пистолет Вольта» — трубка с двумя электродами, которая заканчивалась расширением с пробкой, куда закачивался газ. Вся конструкция заливалась с противоположного конца резиновой пробкой. Электроды были подвижными, чтобы их можно было сводить. Электроды присоединялись к батарее. Сосуд наполнялся исследуемым газом в разных соотношениях с воздухом, дальше электроды подсоединялись к батарее, проходил разряд и газ загорался со взрывом/хлопком, пробка вылетала и по силе звука Вольта определял теплотворные способности изучаемому газу. Водород уже был открыт, поэтому он связывал теплотворную способность с чистым водородом. Он определил, что теплотворная способность у исследуемого газа в 6 раз выше, чем у водорода.

Группы метаногенов.

Дальнейшее развитие метаногенеза происходило в 1920-х годах. Хангейт внес большой вклад в развитие метаногенеза, он создал технику для выделения чистых культур в анаэробных условиях. Сейчас, метаногены представляют собой разнообразную в систематическом отношении группу микроорганизмов. Среди метаногенов, которые относятся к одному филуму на филогенетическом дереве. В этом филуме открыто 7 различных классов, и метаногены присутствуют в 3 из них. В остальных присутствуют гелиобактерии, термоплазмы и другие археи. В трех классах, куда входят метаногены: 1 (2 семейства, 5 родов) и 7 класс (1 семейство, 1 род, исследовано не до конца, потому как метаногены сложно выделить в чистом виде) состоят из одного порядка. 2 класс — метанококки исследован больше, потому как проще выделить и они расписаны в 3 порядка, 7 семейств и около 26 родов метаногенов исследовано.

Метаногены как источник парниковых газов.

Метаногены выделяют с каждым годом все больше и больше, изучение метаногенеза ведется во многих лабораториях мира на серьезных уровнях, поскольку метаногены занимают важную нишу, ведь без них не будет перерабатываться органическое вещество до конечных продуктов. Их конечное положение на этапе анаэробного превращения органических веществ делает их очень важными. С другой стороны, эти микроорганизмы важны при выработке парниковых газов (метан в 25 раз

больше отражает тепловые лучи). Соответственно, на образование метана обращают внимание, стараются, чтобы метан по возможности не попадал в атмосферу. Поэтому, метан, который выделяется в виде биогаза на очистных сооружениях, сооружениях, которые анаэробно преобразуется в биогаз, метан улавливают, очищают и используют в качестве источника энергии для получения тепловой и электрической энергии. Однако, есть такие места обитания, на которые повлиять почти невозможно — рубец жвачных животных. Одна корова может выделять до 900 литров/сутки метана. Многие дикие животные так же способны образовывать метан при переработке целлюлозы. Второй большой источник метана — рисовые поля. Два раза в год, рисовые поля заболачиваются, там мгновенно возникают условия для метаногенеза. Так устроено, что метан, по внутренним сосудам растения риса, поднимается на поверхность за пределы водной толщи и выделяется в атмосферу. 90% метана в таких условиях выделяется из сосудов растений, так, метан минует среду метанотрофов. Рисовые поля на Земле занимают огромные площади и соответственно, выделяется со всех этих площадей метан.

Еще один мощный источник — азротенки. Искусственно созданные места для преобразования органических отходов в метан, но они находятся под контролем выделяющегося газа, который собирают, очищают и используют.

Реакции, проводящиеся метаногенами.

Таблица 8.1. Реакции проводимые метаногенами

Реакция	$\Delta G^{(0)}$, кДж/моль выделяющегося метана
$4H_2 + CO_2 = CH_4 + 2H_2O$	-135,6
Окисление 3 формиата = $CH_4 + 3CO_2 + 3H_2O$	-130,1
Преобразование этанола: $2 \text{ этанол} + CO_2 = CH_4 + 2\text{ацетат}$	-116,3
Преобразования метанола: $\text{Метанол} + H_2 = CH_4 + H_2O$	-112,5
Превращение метанола: $4CH_3OH = 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	-104,9
$\text{Метиламин} + 2H_2O = 2 CH_4 + 2CO_2 + 4NH_4$	-75,0
$4 \text{ 3-метиламин} + 6 H_2O = 9 CH_4 + 3 CO_2 + 4 NH_4$	-74,3
$2 \text{ Триметилсульфид} + 2 H_2O = 3 CH_4 + CO_2 + 2 H_2S$	-73,8
$2 \text{ Диметиламин} + 2 H_2O = 3 CH_4 + CO_2 + 2NH_4$	-73,2
$2 \text{ Изопропанол} + CO_2 = CH_4 + 4\text{ацетат} + 2 H_2O$	-36,5
$\text{Ацетат} = CH_4 + CO_2$	-31,1

Формиат, как более окисленное вещество (заклучено более малое количество энергии), необходимо окислить 3 молекулы, чтобы получить окисленное соединение.

Метанолу достаточно окислить только одну молекулу, чтобы получить энергию, достаточную для восстановления трех молекул.

При реакции расщепления ацетата, образуется энергия, достаточная для формирования 1 моля АТФ в результате проведения реакции метаногенами. Ацетокластические метаногены, ограничены по доступу энергии и растут очень медленно из-за нехватки энергии. Они преобразуют большие количества ацетата в метан, но при этом их мало. Это преимущество анаэробной очистки сточных вод, содержащих органические вещества по сравнению с аэробной обработкой, поскольку при анаэробной обработке образуется сравнительно небольшая биомасса, а при аэробных процессах, образуется значительно количество биомассы, с которой надо что-то делать, что является большой проблемой для очистных сооружений.

Кофакторы метаногенеза. Культивирование метаногенов.

Метаногены изучали с 1950-х годов. Основная информация по кофакторам метаногенеза была получена ближе к 1990 годам, когда уже были разработаны способы, позволяющие получить анаэробные условия. Всего, новых кофакторов, неизвестных для биохимиков, было открыто у архей. Эти кофакторы принимают участие на различных этапах превращения субстрата в метан. Одни устроены просто, другие имеют довольно сложную химическую структуру. Кофакторы очень чувствительны к кислороду — особая чувствительность метаногенеза определяется чувствительностью кофакторов к кислороду. При контакте с кислородом, кофактор, необратимым образом инактивируется, клетка теряет способность получать энергию и погибает. Поэтому, пересевать и вести чистую культуру метаногенов надо вести с осторожностью, не допуская контактов с кислородом (даже кратковременных). Пересевы делаются с помощью шприцов. Для этого помогают специальные химические индикаторы, одним из которых является резазурин. Это вещество добавляют в очень небольших (1 мг/л) концентрациях, оно реагирует в определенном диапазоне pH на кислород. Если среды содержат кислород, то резазурин голубой, при низких концентрациях, близких к анаэробным — розовый. В анаэробных средах — бесцветен. Резазурин является очень важным индикатором для людей, работающих с анаэробными культурами, с помощью которого, так же проверяют среду на содержание кислорода, поскольку перед посевом надо убедиться в полной анаэробности среды, иначе посевы не выживут.

Образование метана из различных субстратов.

Из субстрата CO₂-водород, образуется метан в рубце животных. Поскольку, оборот метана в желудочно-кишечном тракте жвачных достаточно высокий, то в нем не удерживаются метаногены с низкими скоростями роста, например, ацетокластические, которые разлагают ацетат на метан и CO₂. Зато, там прекрасно себя чувствуют быстрорастущие, поскольку они имеют богатое снабжение энергией из реакций метаногенеза — водородотрофные метаногены. Водородотрофные метаногены наблюдаются в местах переработки глюкозы, а глюкоза у жвачных животных перерабатывается в рубце с помощью первичных бродильщиков, которые в анаэробных условиях расщепляют целлюлозу до мономеров, с дальнейшим гидролизом до органических кислот с последующим брожением до метана и водорода.

Анаэробное карбонатное дыхание представлено в чистом виде (CO_2 -акцептор электронов, водород — донор электронов. Путь образования метана из водорода и CO_2 :

CO_2 присоединяется к метанофурану (один из кофакторов метаногенеза) с присоединением 2 электронов (процесс восстановления) в результате образуется вода и формилметанофуран.

Метанофуран отщепляется для перехода в следующую реакцию. К формилу происходит присоединение следующего кофактора метаногенеза — тетрагидро H_4 -метанотерин, получается тетрагидрометанотерин.

С отщеплением молекулы воды, метил превращается в C_3H_4 -метанотерин. Это вещество начинает восстанавливаться за счет восстановленного кофактора метаногенеза — $\text{F420}_{\text{восст}}$ (420 — максимум поглощения на спектрофотометре, представляет собой аналог НАД, действующего в анаэробных условиях)

$\text{H}_2\text{C-H}_4$ -метаноферин (метилентетрагидрометанотерин), с образованием аналогичной реакции с окислением $\text{F420}_{\text{восст}}$

На следующем этапе, происходит переброс метильной группы CH_3 -тетрагидрометанотерин на фермент B12-enzyme , а тетрагидрометанотерин идет на следующий круг.

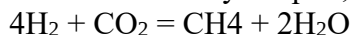
Образуется метинкобальт B12-enzyme (на кобальтовую группу садится метильный фермент).

На метильную группу садится кофермент М (кофермент метана-SH), получается $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$.

Кофермент М вступает в реакцию в комплексе метилредуктазы. Вступает кофактор F430 , содержащий никель в активном центре. На этом этапе действует кофактор — кофермент B-SH . Метильный радикал восстанавливается до метана, а кофермент М соединяется с коферментом В с образованием гетеродисульфидного кофермента.

Фермент, расщепляющий гетеродисульфид на два кофермента — фермент гетеродисульфидредуктаза. Для осуществления этой реакции требуется 2 протона и 2 электрона (салятся между -S-S- мостиками и расщепляют два кофермента).

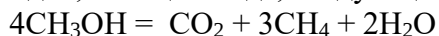
Это, основная реакция, которая протекает в анаэробных местах брожения, где из водорода и CO_2 образуется метан. Эта же реакция идет с высокой скоростью в анаэробных метантенках. Является основной реакцией выделения метана в рубце жвачных животных. Суммарно, реакция записывается, как:



F420 , F43 , Кофермент М, кофермент В — кофакторы метаногенеза.

Метанофуран, H_4 -метаноферин, метилредуктаза, гетеродисульфидредуктаза — ферменты для метаногенеза. Это не все ферменты — на каждой реакции по отщеплению воды участвуют соответствующие ферменты.

Следующим важным субстратом метаногенеза являются одноуглеродные субстраты, метильный радикал которых является предшественником метана. Одна часть окисляется до CO_2 , вторая, до метана. Превращения метанола в метан, происходит, в общем виде, следующим образом:



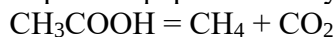
Более, подробно, для каждой из молекул метанола этот процесс выглядит как (таблица 8.2):

Таблица 8.2. Процесс окисления и восстановления метанола

CH ₃ OH (окисление)	3 CH ₃ OH (восстановление)
1. Метильный радикал переносится на B12-фермент с образованием CH ₃ -кобальт-B12-фермент с отщеплением воды 2. CH ₃ -группа переносится на тетрагидрометаноптерин, получается метилтетрагидрометаноптерин. 3. На следующем этапе выделяются 2 электрона с образованием CH ₂ -тетрагидрометаноптерин 4. Отщепляется 2 электрона с образованием метинил-CH≡тетрагидрометаноптерин. 5. На третьем этапе присоединяется вода с образованием формилтетрагидрометаноптерин 6. Заканчивается полным окислением до CO ₂ с переносом форминовой группы на метаноптерин. Формилметанофуран окисляется до CO ₂ и образуется 2 электрона. Метанофуран отщепляется. 7. В итоге, образуется 6 электронов.	1. Метильный радикал переносится на B12-фермент с образованием CH ₃ -кобальт-B12-фермент с отщеплением 3 молекул воды 2. Перенос на кофермент M — 3CH ₃ -S-CoM, который поступает на комплекс ферментов гетеродисульфидредуктаза+метилредуктаза, куда присоединяются 6 электронов (образовавшиеся при окислении 1 молекулы метанола). 3. В итоге, образуется 3 CH ₄

Такие процессы происходят в природе, поскольку, хоть метанол не накапливается, но постоянно присутствует как в анаэробной, так и в аэробной зоне за счет присутствия пектина и лигнина (в древесине). При попадании в аэробную или анаэробную зону, начинают гидролизироваться находящимися в зоне микроорганизмами и от них отщепляется CH₃-группы с образованием метанола. Соответственно, метаногены могут преобразовывать метанол в метан.

Реакция образования метана из ацетата — ацетокластическая схема преобразования метана. В 1956 году Баркер (один из исследователей метаногенеза, профессор Калифорнийского университета, Девис) предложил следующую схему:



Оба соединения полностью восстановлены и полностью окисленные.

Из ацетата, меченые по C14-углероду, появляется в CH₄ из метильной группы, а в CO₂ из COOH.

Детально, этот процесс был расписан в 1990-х годах:

Ацетат с молекулой Ацетилкофермента А поступает на комплекс², который имеет три активных центра: Ni, FeS, ничего нет. CH₃-группа садится на Ni, CO-группа садится на FeS, кофермент А садится на третий участок активного центра. После, CO начинает окисляться и садится на структуру комплекса¹ со структурой Ni-FeS с

образованием 2 протонов при участии воды. В итоге, выделяется CO_2 , 2 электрона и 2 протона идут на восстановления ферридоксина.

CH_3 -группа переходит на комплекс 3 с образованием $\text{Co-CH}_3\text{-FeS}$ группировки. Тетрагидрометанооптерин присоединяет к себе CH_3 -радикал с образованием тетрагидрометанооптерина. Это соединение идет на комплекс гетеросульфидредуктазы в результате чего образуется метан с отщеплением тетрагидрометанооптерина. Сюда присоединяется ферридоксин (восст.).

Метилгидрометанооптерин садится на кофермент M-SH с образованием $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$.

Метилредуктаза присоединяет кофермент B-SH, из реакции выходит Кофермент M-S-S-кофермент M. Под действием гетеродисульфидредуктазы, для которой кофактором служит ферридоксин восстановленный.

До сих пор ведутся споры о том, три сайта — это три разных белка или один белок.

Метаногенез из ацетата проходит в местах обитания, где оборот органических веществ не очень быстрый. Например, болота, заболоченные луг после весеннего паводка, рисовые поля, любые анаэробные места обитания в почве. С помощью микроэлектродной техники проверяли наличия кислорода в хорошо аэрированной почве — хорошо вспаханной. Разбить почву на размер меньше 12 мм в диаметр — сложно, но даже в таких размерах обнаружена абсолютно анаэробная зона, в которой могут существовать метаногены.

Там, где быстро накапливаются CO_2 и водород, процветают водородиспользующие микроорганизмы.

Ацетокластические метаногены так же выдерживают низкие значения pH (4-5). Метаногены водородиспользующие прекращают свое существование, а ацетокластические продолжают существовать.

Свойства *Methanosarcina barkeri*.

Есть метаногены, которые способны расти на всех трех видах субстрата — ацетат, метанол, биогаз.

Организм *Methanosarcina barkeri* — хорошо выделяется, образует большое количество метана. Этот организм имеет специальные системы защиты от кислорода — каталаза и супероксиддисмутаза были выделены и просеквенированы. Было показано, что организмы устойчивы к действию кислорода, так, их экспозиция в кислороде в течении 5-6 часов приводила к 5% гибели. Так же, его выделяли из остатков овечьего помета. Третий фактор, позволивший начать работать с организмом — выживаемость при осушении рисовых полей без лаг-фазы. Он не будет расти в аэробных условиях, но длительная экспозиция в кислородсодержащей среде не приводит к массовой гибели благодаря наличию каталазы и супероксиддисмутаза. Уже после, было показано, что при добавлении перекиси водорода, происходит увеличенная экспрессия генов для выработки новых ферментов каталазы и супероксиддисмутаза, защищающих организмы от вредного действия кислорода (активных форм кислорода).

Метаногены в морских осадках.

Метаногены конкурируют с сульфатредукторами в морских осадках. В морские осадки проникают сульфаты, соответственно там присутствуют сульфатредукторы,

которым проигрывают в энергии метаногены и не могут участвовать в конкурентной борьбе за субстрат. Зато, в таких местах обитания, метаногенез протекает из метилированных аминов — образуются из метанопротекторов, которые не используются в качестве субстрата сульфатредукторами.

Лекция 10. Сульфатредукторы

Общая схема анаэробных дыханий.

Анаэробное карбонатное дыхание — когда акцептором электронов выступает CO_2 , который в одном случае восстанавливается до метана или, во втором случае, до ацетата (уксусной кислоты) — так называемый, метаногенез и ацетогенез. Этим, не ограничивается анаэробное дыхание. Общая схема анаэробных дыханий выглядит следующим образом:

Начинается с органического субстрата, которые окисляются и начинается путь переноса электронов (разный для каждого процесса), который заканчивается на акцепторе.

Электроны попадают на такие акцепторы, как:

Нитратредукция: нитрат — превращается в нитрит;

Денитрификация: нитрат превращается в нитрит и затем в азот;

Анаэробное железное дыхание: трехвалентное железо в качестве акцептора электронов превращается в двухвалентное железо (Fe^{2+});

Анаэробное серное дыхание (осуществляется сульфидогенами): сера в качестве акцептора электронов превращается в сероводород (H_2S);

Анаэробное сульфатное дыхание (осуществляется сульфидогенами): сульфат восстанавливается до сероводорода (сульфида);

Аэробное карбонатное дыхание (метаногенез): CO_2 в образование метана CH_4

Аэробное карбонатное дыхание (ацетогенез): CO_2 в образование ацетата (CH_3COOH);

Анаэробное фумаратное дыхание (происходит редко): органическое соединение в качестве акцептора электронов (например, фумарат).

В каждой реакции наблюдается $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, что ведет к образованию АТФ в результате окислительных фосфорилирований, связанных с мембраной. Сначала образуется трансмембранный градиент протонов. Клетка использует дальше накопленную энергию в преобразование в АТФ. Органическое вещество может полностью окисляться в CO_2 и затем, CO_2 может идти на фиксацию и биосинтез. Иногда, органический субстрат или его метаболиты идет сразу на биосинтез (характерно для гетеротрофов, которые не фиксируют CO_2 , а используют органические вещества из своей среды выращивания).

Сульфатредукторы.

Сульфатредуцирующие бактерии обитают в анаэробных местах обитания. Считается, что это строгие анаэробы, хотя в последнее время показано, что среди них есть организмы, которые выдерживают контакт с кислородом. Обычно, строгие анаэробы погибают при контакте с кислородом. Оказалось, что некоторые строгие анаэробы способны переносить контакты с кислородом, а некоторые из сульфатредукторов приспособились расти в микроаэробных условиях — когда кислород присутствует в небольших концентрациях.

Сульфатредуцирующие микроорганизмы активно изучаются с целью выяснения, каким образом эти организмы переносят контакт с кислородом, какие у них есть защитные механизмы для встречи с кислородом, так как при встрече с кислородом образуются активные формы кислорода, которые влияют на ДНК, РНК, кофакторы (как в случае с метаногенами) и клетки погибают. У некоторых строгих анаэробов развилась

способность переносить такие условия, и они имеют специальные ферменты для условий защиты.

Если обратиться к истории сульфатредукторов, то впервые сульфатредуцирующие бактерии были выделены в 1895 Бейерингом. С тех пор, сульфатредуцирующие бактерии изучали довольно долго, выделяли различных представителей из морских местообитаний — именно в морских осадках присутствует SO_4 (сульфат), который является акцептором электронов для сульфатредуцирующих бактерий, поэтому, там их надо искать. Для сульфатредукторов есть и другие экологические ниши — соленые озера, в которых так же могут присутствовать сульфаты, карбонаты.

Классификация сульфатредукторов.

До 1960 года, сульфатредукторов выращивали на одних и тех же средах — лактат донор электронов и сульфат — акцептор электронов (витамины, минеральные вещества варьировались). Поэтому, число видов, которые выделялись в чистые культуры, было не столь значительно. А в 1960-1980 годах стали применять другие среды и искать сульфатредукторы повсюду (термальные местообитания, желудок овцы), что привело к увеличению количества сульфатредукторов. По современной классификации, сульфатредуцирующие бактерии входят в четыре филума бактерий. В домене архей — 1 филум.

С серовосстанавливающими микроорганизмами, противоположная картина — гораздо больше архей, которые способны к такому процессу. До 2000 года все сульфатредукторы, которые образовывали споры, относили к роду *Desulfoanakulum*. С приходом техники секвенирования 16S-рибосомальной РНК, стали различать по разным видам, порядкам, семействам, что привело к их большому разнообразию в филумах.

Природные соединения серы.

Природные соединения, которые содержат серу:

Na_2S (сульфид натрия)

Na_2S_2 (дисульфид натрия)

Na_2S_3 (трисульфид натрия)

Na_2S_4 (тетрасульфид натрия)

Na_2S_5 (пентасульфид натрия)

Na_2SO_3 (сульфит натрия)

Na_2SO_4 (сульфат натрия, наиболее распространенный на Земле)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (тиосульфат натрия)

Na_2SO_4 (гидросульфит натрия, дитионид)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (пиросульфит натрия, метабисульфит)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_6$ (дитионат натрия)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_7$ (пиросульфат натрия)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (перосульфат натрия)

$\text{Na}_2\text{S}_3\text{O}_6$ (трितिонат натрия)

$\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ (тетратионат натрия)

У сульфатредукторов большие возможности находить себе акцепторы электронов и расти в анаэробных условиях.

Автотрофные сульфатредукторы.

В 1970х годах стали изучать автотрофные сульфатредуцирующие бактерии. Они оказались широко распространены на земле. Могут расти за счет таких доноров электронов, как водород, бисульфит, тиосульфат, CO . В основном эти сульфатредукторы используют водород, когда он появляется в их экологической нише, поскольку первыми кто атакует макромолекулярные соединения (белки, получающиеся из них пептиды, ДНК, РНК, полисахариды — макромолекулы клетки, которые попадают в анаэробные зоны после отмирания), становятся добычей броодильщиков, которые имеют внеклеточные ферменты и начинают расщеплять макромолекулярные соединения на компоненты. Образующиеся мономеры становятся субстратами для сульфатредукторов или броодильщиков, которые преобразуют их в кислоты, что сопровождается выработкой водорода и CO_2 . Эти два газа всегда присутствуют в среде, но за них ведется борьба, поскольку это самые выгодные доноры электронов, наиболее восстановленное неорганическое вещества. Многие организмы способны преобразовывать водород до получения энергии. Сульфатредукторы не исключение, они так же могут преобразовывать водород и восстанавливать сульфат в сероводород. Они опережают в борьбе за водород метаногенов и ацетогенов. В таких местах обитания, где есть достаточно сульфата, метаногенез подавлен и осуществляется в слабых количествах, например, из метилированных аминов.

Сероводород как корродирующий газ.

Интерес к бактериям остается высоким, поскольку эти организмы образуют сероводород. Сероводород является жестким агентом, разрушающий металлы — наблюдается коррозия металлов, от которой нет защиты в настоящее время. Особо страдают продуктопроводы (нефте- и газопроводы), в которые попадает сероводород. Внутри продуктопроводов анаэробная среда, что при попадании серы приводит к образованию биопленок, которые содержат сульфатредукторы и происходит образование сероводорода. Сероводород атакует металлы изнутри (сверху труба защищена полимерным покрытием, за которое можно наблюдать, однако, невозможно наблюдать повреждения изнутри). Поэтому, существуют нормы эксплуатации продуктопроводов с толщиной стенок около 30 мм, всё равно, время от времени, они должны заменяться. Срок службы таких трубопроводов 25-30 лет, что является дорогостоящей работой. Поэтому, с сульфатредукторами во всех странах мира ведутся работы, по поиску веществ, подавляющих сульфиды. Пока что особых успехов нет.

В 1988 году был выделен сульфатредуктор, который относился к роду *Archeoglobus* и принадлежал археям. Самый изученный организм среди архей, которые восстанавливают сульфат (всего, среди архей, таких микроорганизмов выделено немного). Восстанавливает сульфат до сероводорода. Является термофилом — растет в местах с температурой до 90°C .

Доноры электронов для сульфатредукторов.

Питательные потребности сульфатредукторов: доноров электронов, которые сульфатредукторы способны использовать очень много, поскольку сульфатредукторы обладают широким спектром субстратов, которые могут окислять в анаэробных условиях. Сульфатредукторы вне зависимости от филогенетического положения делятся на две большие биохимические группы:

1. Полностью окисляет органические группы до CO_2 (имеет замкнутый цикл Кребса).

2. Полностью органические вещества не окисляются и превращаются в ацетат (цикл Кребса разомкнутый (не циклический процесс)), который не потребляется. В природе такой процесс не наблюдается, он характерен только для выделенных в лаборатории чистых штаммов, поскольку, если кто-то что-то не доел в природе, найдутся партнеры, которые легко утилизируют ацетат.

Ацетат в анаэробных условиях не накапливается. В сульфатредуцирующих условиях потребляется сульфатредукторами. В среде без сульфатредукторов, процветает метаногенез.

Водород — самый основной неорганический донор, бисульфит, тиосульфат, CO , все спирты $\text{C}_1\text{-C}_4$, глицерол, 1,2-пропандиолы, практически все аминокислоты, холин, глюкоза, фруктоза, бензоат и его производные, индол, гидрохинон, катехол, сукцинат, фумарат, ацетат, пропионат, бутират и др.

У сульфатредукторов очень богатый спектр субстратов, которые они могут использовать и восстанавливать сульфат. Оказывается, сульфатредукторы могут не только восстанавливать субстрат, что было показано на чистых выделенных и очищенных культурах. Акцепторами электронов так же могут быть сульфит, метабисульфит, дитионит, тетратионат, тетрасульфат, нитрат, нитрит и кислород. Нитрат, нитрит и кислород — очень редкий случай, характерно для 2-3 штаммов. Эти вещества не являются участниками энергетического метаболизма. В случае с кислородом, наблюдается уникальный случай (Г. Цепионке) — кислород используется в качестве акцептора электронов, только когда подвижные сульфатредукторы избавляются от кислорода за счет переброса электрона с водорода на кислород при помощи цитохрома c . Скорость около 1.5 мм/г белка.

Все сульфатредукторы способны использовать сульфат для сброса электронов на сульфат в анаэробных условиях. Выстраивается цепь переноса электронов, которая позволяет запастись энергией клетке, за счет выстраивания градиента протонов, который после реализуется для синтеза АТФ через протон-зависимую-АТФазу.

Схема образования сероводорода бактериями.

Общая схема, которая позволяет понять, каким образом переносятся электроны на сульфат и какие появляются промежуточные восстановленные соединения серы. В итоге, всё заканчивается образованием сероводорода:

На первом этапе восстановление сульфата происходит за счет использования молекулы АТФ (+46,4 кДж/моль) с помощью фермента (1).

Сульфатная группа активируется и превращается в аденозинфосфосульфат с образованием неорганического пирофосфата, который расщепляется (гидролизуется на 2 неорганических фосфора с помощью фермента (2)) (-21,7 кДж/моль).

Аденозинфосфосульфат восстанавливается под действием фермента (3) (с выделением энергии -68,5 кДж/моль) до сульфита и аденозинмоносульфата.

У некоторых сульфатредукторов с помощью фермента (4) этот процесс сразу идет до сероводорода + $3\text{H}_2\text{O}$ (-171,4 кДж/моль).

У других сульфатредукторов из аденозинмоносульфата под действием фермента (5) образуется дитионат + $3\text{H}_2\text{O}$ (-46,4 кДж/моль). Реакции требуется 2 протона и 2 сульфида, которые приходят из (*).

Дитионат начинает постепенно восстанавливаться (-122,9 кДж/моль).

Образуется тиосульфат (S_2O_3), высвобождается сульфит (SO_3) и 1 протон. (*)

Тиосульфат восстанавливается до сульфида с затратой водорода при действии фермента (7) с выделением сульфита (-2.1 кДж/моль) (*).

Ферменты: (1) АФС-сульфорилаза, (2) пирогосфатаза, (3) АФС-редуктаза, (4) бисульфитредуктаза, (5) тритионат-образующий фермент, (6) тритионатредуктаза, (7) тиосульфатредуктаза.

* Символом (*) обозначены места, откуда приходят субстраты реакции в указанную реакцию.

При помощи 7 ферментов осуществляется перенос электронов на сульфат. Сульфат на первом этапе активируется с восстановлением двумя протонами с образованием АФС (аденозинфосфосульфат). Затем, происходит отщепление АМФ, который должен зарядиться фосфатом, чтобы образовать АТФ. Пирогосфат может дать небольшую энергию. У некоторых сульфатредукторов сульфид сразу восстанавливается до сероводорода. Возможны промежуточные стадии, но используется только один фермент — бисульфитредуктаза.

У других сульфатредукторов реакция протекает в несколько стадий с использованием ферментов (5)-(7) с затратой энергии и использовании протонов и водорода. Эти восстановительные эквиваленты получаются при окислении органических веществ, которые окисляют кислоты (дегидрогеназы) или за счет гидрогеназы, которая работает с водородом. Эти восстановительные эквиваленты затрачиваются на восстановление сульфата. Данные процессы происходят в клетке, когда происходит восстановление сульфата до сероводорода.

Пространственная ориентация электрон-транспортной цепи.

Пространственная ориентация цепи переноса электронов в клетке и каким образом, переносчики электронов ориентированы вокруг цитоплазматической мембраны.

Таблица 10.1. Пространственная ориентация электрон-транспортной цепи для *Desulfofacter postgatei*

Вне клетки	Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ)	Внутри клетки (цитозоль)
	Трансмембранно залегает переносчик электронов менахинон	Ферменты: сукцинатдегидрогеназа (сукцинат до фумарата), уровень окислительно-восстановительного потенциала +32мВ
	Электроны с менахинона попадают на SO_4	Сукцинатдегидрогеназа посылает электроны на менахинон
		SO_4 восстанавливается до сероводорода.
	Малатдегидрогеназа располагается в ЦПМ.	Малатдегидрогеназа окисляет малат до

	Электроны попадают на менахинон	оксалоацетата -170мВ
	NADH-дегидрогеназа Электроны поступают на менахинон	Окисление NADH/NADPH с образованием NAD/NAD(H ⁺)
Перенос протонов из ЦПМ во внеклеточное пространство с помощью менахинона	Менахинон служит транспортером для протонов в цитозоль через ЦПМ, что приводит к генерации трансмембранного потенциал, который потом реализуется через протон-зависимую АТФазу. Клетка способна запасать энергию в виде АТФ через механизм окислительного фосфорилирования	

Desulfobacter postgatei назван в честь ученого Постгейта, который внес большой вклад в исследования по сульфатредуцирующим бактериям, выделял много видов из морских мест обитания.

Углеродный метаболизм сульфатредукторов.

Автотрофный рост сульфатредукторов, обычно связан с функционированием ацетилКоА-пути фиксации CO₂ (путь Вуда-Льюнга, когда CO₂ восстанавливается до ацетилКоА с ключевым ферментом ацетилКоА-синтазой и ацетилдегидрогеназой). Этот путь находят у всё большего количества сульфатредукторов, хотя в начале исследований автотрофии сульфатредукторов, находили функционирование восстановительного цикла трикарбоновых кислот (цикл Арнона), который, возможно, может так же существовать у сульфатредукторов. Но исследований в плане углеродного метаболизма сульфатредукторов немного, возможно, данные исследования считаются не приоритетными. Есть несколько публикаций (20 лет), количество которых снижается в последнее время.

Сульфатредукторы как бродильщики.

Некоторые сульфатредукторы при попадании в неблагоприятные условия, когда сульфат отсутствует, а органические вещества присутствуют в среде обитания, они могут проводить реакции дисмутации и диспропорционирования субстратов — вести себя как бродильщики

I вариант:

1 Фумаровая кислота = 2 сукцинат + пировиноградная кислота

2 Пировиноградная кислота окисляется до ацетата и CO₂ с образованием 2 протонов, которые идут на стадию (1)

II вариант:

- 1 Малат = фумаровая кислота = 2 сукцинат
- 2 Лактат = пировиноградная кислота
- 3 Пировиноградная кислота разлагается до ацетата и CO_2 с образованием 2 протонов, которые идут на (1).

Подобные бродильные процессы могут осуществлять сульфатредукторы, когда сульфат исчезает из среды (например, весь восстановился). Кроме того, некоторые виды могут проводить реакции расщепления пировиноградной кислоты:

Пируват + КоА = ацетилКоА + CO_2 + 2H^+ + 2 электрона

АцетилКоА превращается в ацетил-фосфат (присоединение неорганического фосфора). Происходит восстановление водорода из протонов и электронов. За счет субстратного фосфорилирования с образованием АТФ из АДФ образуется ацетат.

Реакции сбраживания тиосульфата.

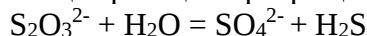
В 1987 году немецкие ученые Бак и Цепионка нашли, что некоторые бактерии из родов *Desulfovibrio* и *Desulfobacter* способны проводить реакции диспропорционирования сульфата (сбраживание тиосульфата):

Тиосульфат превращается в сульфид + сера

Сульфид с присоединением воды окисляется в сульфат с образованием 2 протонов и 2 электронов

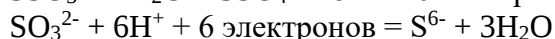
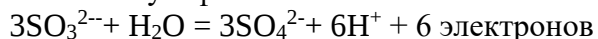
Сера + 2 протона и 2 электрона, восстанавливается до сероводорода.

Общая реакция превращений имеет вид:

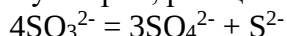


Половина серы, которая входит в состав тиосульфата окисляется с образованием энергии в виде протонов и электронов, которая тратится на восстановление другой части серы до сероводорода. Получается так, что молекула тиосульфата распадается на полностью окисленное и полностью восстановленное серное соединение.

В 1987 году Бак и Фенниг опубликовали статью в которой показали «сбраживание» сульфита:



Суммарно, реакция имеет вид:



В данном сбраживании, 1 молекула сульфита восстанавливается за счет окисления других 3 молекул сульфита до сульфата. В этом процессе сульфатредукторы зарабатывают мембранный потенциал, поэтому способны расти.

Симбиоз сульфатредукторов и фототрофов.

В природе, очень часто, сульфатредукторы живут в симбиозе с фототрофными организмами. Фототрофные организмы из анаэробных фототрофов, из фототрофных анаэробных бактерий, которые не образуют кислород при бактериальном фотосинтезе. В анаэробных местах обитания, где присутствует сульфат, свет и источник углерода, происходит следующее взаимодействие между фототрофными и хемотрофными организмами:

На фототроф (анаэробный) падает свет. Электрон переходит на P700 .

Сульфатредуцирующий организм осуществляет в результате восстановления сульфата наработку сероводорода. Сероводород поступает в качестве донора электронов в аноксигенный фототроф.

Аноксигенный фототроф окисляет сероводород до сульфата, который служит субстратом для сульфатредукторов.

Фототрофный организм образует органическое вещество в результате аноксигенного фотосинтеза, потребляя CO_2 .

Сульфатредуцирующая бактерия потребляет органическое вещество, образуя CO_2 и воду.

Подобный симбиоз устойчиво существует в неглубоких голландских каналах.

Схема коррозии металла сульфатредукторами.

Сульфатредукторы являются мощными корродирующими объектами, что можно проследить по схеме коррозии металла (*Desulfobibrio vulgaris hildenborong*):

Пусть, имеется кусок металла (железо) с присоединенным катодом и анодом.

Железо у анода теряет электрон, который переходит к катоду.

Близко к катоду располагается микроорганизм, который имеет высокомолекулярный цитохром, который занимает трансмембранное положение на внешней мембране микроорганизма. Этот электрод попадает на высокомолекулярный цитохром, который переносит электрон на залегающий в периплазматическом пространстве гидрогеназу.

В цитоплазматической мембране залегает железонесущая гидрогеназа, которая из двух протонов образует водород. Электроны поступают из высокомолекулярного цитохрома С.

Другая гидрогеназа, которая содержит в активном центре Ni и Fe окисляет водород и образует 2 протона. Электроны, который образуются при окислении водорода попадают в электрон-транспортную цепь и заканчивают свой путь на сульфате, который преобразуется в сероводород.

Сероводород диффундирует к внешней мембране, где встречается с ионом железа, где превращается в сульфид железа (нерастворимое вещество). Поверхность металла начинает корродировать.

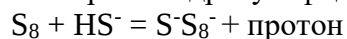
Ржавчине подвергаются не только металлы, но и бетон.

Лекция 11. Сероредукторы «Железосерное дыхание»

Сероредукторы. Источники серы.

Рассмотрим ещё одно анаэробное дыхание, которое заключается в переносе электронов с доноров на акцептор — серу. Сероредукторы — микроорганизмы, которые восстанавливают серу. С сульфатредукторами они имеют общее название — сульфидогены, поскольку при восстановлении серы и сульфата получается сероводород. Сероредукторы довольно распространенная группа микроорганизмов, включающая бактерии (мезофильные, термофильные, экстремальные термофилы) и археи (термофильные). Сера появляется на Земле в тех местах, где из под земной коры выделяется сероводород. Сероводород может окисляться кислородом воздуха, при этом образуется простая сера. Сероводород способен окисляться микроорганизмами — анаэробные микроорганизмы, которые часто являются хемолитоавтотрофами, способны окислять серу при аэробном дыхании. Впервые такой процесс был зарегистрирован Виноградским, он открыл такой процесс, как хемолитоавтотрофный образ жизни, когда организмы могут окислять неорганические вещества и за счет этого получать энергию, которую они используют в дальнейшем метаболизме.

Сера — нерастворимое соединение, присутствует в полисульфидах (соединения, состоящие из 4 — 5 атомов S, записываются как S_4^{2-} и S_5^{2-}). Полисульфиды главным образом, образуются из молекулярной серы и гидросульфида:



Количество серы, растворяющееся при $pH=8$, в растворе сульфида приблизительно эквивалентно количеству этого сульфида. Однако, при снижении pH , количество полисульфидов резко снижается. При pH менее 5, сульфиды становятся практически не растворимыми и мало вероятно, являются субстратами для сероредукторов.

Примеры серовосстанавливающих бактерий.

Сероредукторы стали изучать интенсивно в последние 20 лет, поскольку, это было связано с открытием архейного метаболизма. До середины 1990-х годов, серовосстанавливающих микроорганизмов, выделенных в чистые культуры было немного. Среди них, были в основном выделены бактерии, а с середины 1990-х годов, начали интенсивно изучать такие места обитания, где сера присутствует в больших количествах в результате выбросов из разломов земной коры. Например, Йеллоустоунский национальный парк, где поднимается в атмосферу большое количество сероводорода и выпадает в виде серы на близлежащие гейзеры. На местах горячих источников образуются лагуны, где могут поселяться серовосстанавливающие микроорганизмы, которые в анаэробных условиях могут окислять как органические, так и не органические субстраты восстанавливая серу. Обитают они в горячих местах. Так, было открыто много сероредукторов (таблица 11.1, знаком «?» обозначены неизвестные структуры).

Таблица 11.1. Серовосстанавливающие бактерии

Мезофилы	Донор электронов	Роль серы в метаболизме	Экологическая ниша
р. <i>Desulphuromonas</i>	Ацетат,	Акцептор	Пресноводные

(облигатный сероредуктор)	этанол	электронов	осадки
р. <i>Campilobacter</i> (факультативный сероредуктор)	Водород, формиат	Акцептор электронов	Стоковые осадки
р. <i>Spirillum</i> (факультативный сероредуктор)	Водород, формиат	Акцептор электронов	Любые анаэробные зоны
р. <i>Walinella</i> (факультативный сероредуктор)	Водород, формиат	Донор и акцептор электронов	Рубец жвачных животных
р. <i>Desulfovibriogigas</i> (сульфатредуцирующие)	Лактат	Акцептор электронов	Озерный ил
р. <i>Pseudomonas mendonika</i> (сульфатредуцирующие)	Водород, глутамат, малат, сукцинат	Акцептор электронов	Озерный ил
Термофилы			
<i>Desulfurella acetovirans</i>	Ацетат	Акцептор электронов	Горячие источники, цианобактериальные маты
<i>Thermoanaerobacter sulfurophilus</i>	?	?	?
<i>Hipaea maritima</i>	?	?	?
Экстремальные термофилы			
р. <i>Thermotoga</i>	Органические вещества, водород	Детоксикация водорода	Морские осадки
<i>Deferribacter abyssi</i>	Водород, ацетат	Акцептор электронов (+ в качестве акцептора может использовать Fe^{3+} и нитрат)	Глубоководные гидротермы

Архей изучено гораздо больше, чем бактерий, их классифицируют в 4 порядка (таблица 11.2.).

Серное дыхание — окисление органического вещества с переносом электронов на элементарную серу (гетеротрофный рост).

Таблица 11.2. Серовосстанавливающие археи

Археи	Свойства	
	Серное дыхание	Автотрофный рост (H_2+S)
Порядок I		

Thermoprotrales		
Сем.I. Thermoproteaceae		
p.I Thermoproteas	+	+
p.II Thermophilum	+	+
p.III Thermobaculum	+	+
Семейство II Thermodiscacia p. Thermodiscus	+	+
Семейство III Desulfurococcaceae p. Desulfurococcus	-	+
Семейство IV Pirodictiaceae p.Pirodictium	-	+(облигатный), 113°C
Семейство V Staphylothermaceae p. Staphylothermas	+	-
Порядок II Sulpholobales		
Семейство I Sulfolobaceae		
p. Acidiaes	-	+(факультативные аэробы)
p. Desulfurolobus	-	+
p. Sulfolobus		Факультативные автотрофы, растут при pH 1,5-2. Способны окислять и восстанавливать серу
p. Sulfofoccus		
Порядок III Thermococcales		
Семейство Thermococcaceae		
p. Thermococcus	+	-
p. Pyrococcus (могут сбраживать пептиды, сера восстанавливается в процессе роста)	-	+
Порядок IV Thermoplasmatales Семейство Thermoplasmaceae p. Thermoplasma	+	-
	Восстанавливают серу в анаэробном дыхании	

Схема электрон-транспортной цепи.

Схема переноса электронов, которая помогает понять, как переносятся электроны для электрон-транспортной цепи для организмов, которые переносят серу. Сера — нерастворимое вещество, которое плохо метаболизируется, поэтому клетки,

которые восстанавливают серу, должны быть в плотном контакте с глобулами серы (серный цвет / аморфная сера). Это вид серы накапливается в природе в результате окисления сероводорода. Пока, до этой серы не добрались сероокисляющие организмы, это может быть метаболизировано в результате восстановления серы до сероводорода в анаэробных условиях, что и происходит в результате действия анаэробных автотрофных и гетеротрофных сероредукторов (мезофильные, термофильные, экстремофильные условия).

Схема переноса электронов, которая начинается с органических веществ и заканчивается простой серой, была разработана для микроорганизма *Desulfuromonas acetooxidans* поскольку сера является нерастворимым веществом, довольно сложно в лабораторных условиях установить схему переноса электронов.

Таблица 11.3. Схема электронтранспортной цепи для микроорганизма *Desulfuromonas acetooxidans*

Внеклеточное пространство	Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ)	цитоплазма
	Сукцинатдегидрогеназа окисляет сукцинат	Сукцинат окисляется до фумарата, при окислительно-восстановительном потенциале +33 мВ
	Электроны с восстанавливает элементарную серу с образованием сероводорода сукцинатдегидрогеназы попадают на менахион и перебрасываются на мембраносвязанный цитохром C. С цитохрома C (-185 мВ) электроны перебрасываются на сероредуктазу, которая восстанавливает элементарную серу с образованием сероводорода	Восстановление элементарной серы до сероводорода, при электрохимическом потенциале -270 мВ
	NADH-дегидрогеназа окисляет восстановленный NADH до NAD ⁺ (320 мВ). Электроны переносятся на цитохром C	
	Ферридоксиндегидрогеназа. Электроны попадают на собственный низкопотенциальный цитохром C (-326 мВ) и с него на сероредуктазу	Окисление восстановленного ферридоксина, при -400 мВ
Перенос протонов через ЦПМ	Весь перенос электронов сопровождается цитоплазматическим переносом протонов через мембрану, за счет чего происходит запасание энергии для образования АТФ в процессе окислительного	

фосфорилирования

Серные бактерии в сельском хозяйстве.

Микроорганизмы, которые восстанавливают серу в анаэробных условиях используются в сельском хозяйстве для улучшения свойств почвы — распыления серного цвета, за счет чего начинается «спонтанный» процесс окисления серы при помощи микроорганизмов (аэробный процесс). Почва закисляется за счет появления иона серной кислоты, таким образом снижается pH высокощелочных почв.

Внесение серного цвета на поля без дополнительного внесения сероокисляющих организмов не нужно — они существуют везде — в любом комочке почвы может образоваться сероводород, который является субстратом для сероокисляющих микроорганизмов. В анаэробных условиях, процесс ограничен сероредуцирующими бактериями.

"Железное" дыхание.

Микроорганизмы, которые восстанавливают железо — анаэробное «железное» дыхание. В природе, железо встречается в аэробных средах обитания. Редко встречается в двухвалентном состоянии, поскольку двухвалентное железо быстро спонтанно окисляется кислородом воздуха до трехвалентного железа (слой ржавчины — $\text{Fe}(\text{OH})_2$, другое название — охра, константа растворимости 10^{-12} моль). Однако, есть микроорганизмы, которые способны в анаэробных условиях восстанавливать охру, используя трехвалентное железо в качестве акцептора электронов. Возможно, «железное» дыхание возникло давно, ещё на бескислородной земле, как считают многие ученые. Восстановление трехвалентного до двухвалентного железа привело к образованию новых микроорганизмов. Процесс выгоден, поскольку потенциал трехвалентного железа высок и приближается к потенциалу кислорода (около 750 мВ), поэтому, микроорганизмы, которые окисляют водород и восстанавливают трехвалентное железо анаэробных условиях имеют огромный потенциал для синтеза АТФ и получают огромную энергию при дыхательных процессах с восстановлением трехвалентного железа. По количеству энергии, данный процесс энергетически не отличается от аэробного процесса. В анаэробных зонах трехвалентное железо подвергается восстановлению с помощью представителей многих семейств. Этот процесс приводит к появлению в анаэробной зоне двухвалентного железа.

Если обратимся к древней бескислородной Земле, то геологические исследования показали, что был возможен симбиоз автотрофов (аноксигенный фотосинтез, без выделения кислорода) с железоредукторами. Фототрофы способны использовать двухвалентное железо в качестве доноров электронов при фотосинтезе. В 1980 года было показано, что анаэробные аноксигенные микроорганизмы способны использовать двухвалентное железо в качестве доноров электронов при фотосинтезе.

Схема ЭТЦ у железоокисляющих бактерий.

В последнее время, организмы, которые относятся к геобактерам, получили большую популярность в исследовательской работе, поскольку способны передавать электроны на нерастворимое железо ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), что послужило поводом к открытию специальных исследований по получению электрической энергии с помощью микроорганизмов.

Схема электрон-транспортного переноса у р. *Geobacter*: *G. Metallireducans* и *G. Sulforeducans*:

Перенос электронов начинается с пар: 2-оксоглутарат+сукцинат (-450мВ) (цитозоль).

Электроны переносятся на окисленный ферридоксин.

Перенос электронов на NADH, электрон на пару NAD(P) + NAD(P)H поступают из пары изоцитрат+2оксоглутарат, оксалоацетат + малат (-150 мВ) (цитозоль).

Менахинон (окисл) + менахинон (восст.) (100 мВ).

Сукцинат + фумарат дает электроны на менахинон. С менахинона электроны переносятся на цитохром C7 (окисл/восст) (ЦПМ).

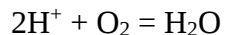
Далее, электроны переносятся на терминальную оксидазу (100мВ) с образованием протонного градиента.

Электроны опускаются на уровень Fe^{3+} до образования Fe^{2+} (770мВ) (внешняя мембрана).

Топливные элементы на основе "железных" бактерий.

Способности микроорганизмов из родов *Geobacter* привели к тому, что исследователи стали задумываться, можно ли превратить поток электронов на субстрат в поток электронов к электроду, за счет чего можно было бы получать метаболическую энергию. Такие конструкции были созданы.

Анаэробная банка (танк), в котором существуют два компартмента — аэробный и анаэробный. В аэробный компартмент помещен 1 платиновый электрод, погруженный в воду. В анаэробном компартменте помещен второй электрод, на котором происходит окисление поступающего вещества. Поток электронов переносится от микроорганизмов, при этом образуется поток протонов, который диффундирует через мембрану, где протоны встречаются с кислородом. Получается реакция с возникновением электрического тока:



Микробный топливный элемент позволяет получать электрическую энергию при помощи микроорганизмов, которые окисляют органическое вещество и передают электроны на электрод. Применяют не кусочек металла, а очень разветвлённые углеродные электропроводящие ерши или углеродную ткань (углерод является проводником). Микроорганизмы садятся в ячейки ткани и происходит перенос электронов. Организмы постоянно растут и в конце концов облепляют всю поверхность ткани, образуя биопленку на поверхности электрода. Соответственно, снижается производительность ячейки. Способы решения — замена на чистый электрод, либо разрабатывают создание биопроводов. Оказалось, что клетки могут образовывать электронпроводящие длинные тяжи (свойства до конца не изучены), чтобы через слой клеток электроны достигали электронпроводящей поверхности. Такие системы делают проточными с применением специальной мембраны — Нафион — пропускает протоны, но не пропускает кислород и воду.

В MIT есть лаборатория профессора Derek Lovley, который занимается микробными топливными элементами. В одном из своих обзоров подсчитал, что если город Нью-Йорк будет пропускать все свои органические отходы через топливные элементы, то он сможет не только потреблять, но и продавать энергию. Однако, сейчас о таких процессах говорить рано. Если использовать данные методы при переработке

сточных вод, можно помимо очистки получать дополнительную энергию, которую можно продавать.

Лекция 12. Нитритное и фумаратное дыхание

Соединения азота в природе. Нитратное дыхание.

Анаэробное нитратное дыхание заканчивается переносом электронов на нитрат. Нитраты в природе могут появляться в результате деятельности аэробных организмов, которые окисляют аммиак. Аммиак появляется в результате разложения белков. Аммонийная часть при разложении превращается в аммиак, а карбонильную, микроорганизмы, которые разлагают органические вещества используют в качестве источника углерода. Поэтому, аммиак может появляться во всех местах обитания и так же, повсеместно существуют нитратфиксирующие бактерии, окисляющие нитрат до аммиака. Если аммиак попадает в анаэробную среду, то при действии таких веществ как водород, может наступить анаэробное нитратное дыхание, при котором нитраты могут восстановиться до:

1. Нитритов (нитратредукция, $\text{NO}_3^- = \text{NO}_2^-$). К такому процессу склонны бифидобактерии и некоторые энтеробактерии, присутствующие в кишечнике животных. Данный процесс опасен тем, что при попадании с пищей в кишечник большого количества нитратов, которые превращаются в нитриты. Нитриты диффундируют в кровь и связываются с гемоглобином. Гемоглобин в связанном с нитритом состоянии не способен переносить кислород, поэтому человек или животное погибает от удушья. В связи с этим, Роспотребнадзор контролирует овощи, фрукты, продукты на количество нитратов, поскольку овощи и фрукты по разному накапливают в себе нитраты, а производители вносят в почву большое количество нитратных удобрений с целью скорейшей продажи товара. Этот процесс очень опасен, поэтому постоянно осуществляется контроль за содержанием нитратов в овощах. Существуют бытовые приборы (нитрат-тестеры), которые показывают содержание нитратов в продукте. В некоторых овощах и фруктах допускается высокая концентрация нитратов, для некоторых, удерживается на низком уровне, это связано с суточной нормой потребления нитратов. Нитраты так же добавляют в колбасы, если нитраты не добавлять, то мясо будет иметь серый цвет, которую потребитель не хочет покупать. Добавление нитратов к колбасе приводит к более привычному для потребителя розового или красного оттенка продукта. Допускается добавление к колбасе нитратов 5г/кг продукта, что является достаточно высокой дозой. В Европе, данное содержание может быть выше, что связано с культурой питания (30-40 гр. колбасы в западной культуре против российских 100-300 гр.);

2. Денитрификация ($\text{NO}_3^- = \text{NH}_3$ ассимиляционное или аммонификация нитрата, $\text{NO}_3^- = \text{N}_2$) — полное восстановление нитратов до аммиака. Проходит в анаэробных условиях органические вещества или водород способны восстанавливать нитрат. Процесс идет с запасанием энергии. Цепь переноса электронов заканчивается нитратредуктазой. Процесс вреден для агрономов, поэтому нельзя одновременно вносить в почву нитратные удобрения и органические (навоз), поскольку при этих условиях мгновенно наступает анаэробное нитратное дыхание — в каждой частичке почвы присутствует анаэробная зона, поэтому, азот улетучивается из почвы в виде аммиака или азота.

За словом аммонификация закрепился процесс, который приводит к образования аммиака при разложении белков/аминокислот. Проходит в анаэробных и аэробных условиях, поэтому, название «аммонификация» некорректно. Ассимиляционная нитрификация протекает у многих организмов (растения, грибы) для получения

источника азота из среды, включая аммиак в метаболизм для синтеза аминокислот. Данный процесс идет без запасания энергии, идет трата энергии восстановителей.

Процесс образования азота идет с запасанием энергии в клетке, при анаэробном восстановлении нитрата при окислении органических или неорганических доноров электронов. Азот поступает в атмосферу в виде газа. Единственный процесс, который приводит к высвобождению связанного азота.

В мире существует два процесса, которые осуществляются только микроорганизмами: фиксация азота из атмосферы и высвобождение газообразного азота (обратный процесс). Если бы не было нитратредукции, весь азот был бы связан и азота не было бы в атмосфере.

Нитрат не должен попадать в организм человека. Особенно это опасно для детей. Дети, которые питаются молоком матери, находятся в особой зоне риска поскольку у них находится большое количество бифидобактерий, которые осуществляют процесс преобразования нитрата до нитрита. Поэтому, быстро наступает нитритное отравление организма, происходит образование метгемоглобина (гемоглобин, связанный с азотом), который приводит к удушью, препятствуя связыванию гемоглобина с кислородом. Есть случаи острого отравления нитратами. В Подмоскowie, в начале 1990-х годов мужчина нашел на свалке неподписанную банку с нитратом калия (по вкусу похожа на поваренную соль), в результате чего семья отравилась от передозировки нитрата. Второй случай произошел на корабле, когда кок перепутал банки с поваренной солью и нитратом калия и команда отравилась (без летальных исходов). Нитрат калия на кораблях находится потому, что при дальних плаваниях, можно готовить колбасу собственного производства. Нитрат калия добавляют в колбасу, чтобы цвет продукции был приемлемый для потребителя.

Автотрофы, восстанавливающие нитраты.

Не только гетеротрофные организмы могут восстанавливать нитраты в анаэробных условиях. Автотроф *Paracoccus denitrificans* может расти в денитрифицирующих условиях, когда нитрат является акцептором электронов, в отсутствие кислорода. При росте на среде с водородом и нитратом происходит реакция восстановления азота нитрата до атмосферного азота с фиксацией CO₂ в цикл Кальвина. Организм берет энергию из соединений азота, а существовать он может благодаря фиксации CO₂ и увеличению биомассы. Этот организм может расти гетеротрофно, анаэробно, автотрофно и метилотрофно (на средах с метанолом)

АнАммОкс процесс.



Процесс превращения нитрита в атмосферный азот был открыт измерением количества веществ — метаболитов в 1995 году, а к 2000 году были выделены представители микроорганизмов, который осуществляют процесс АнАммОкс (AnAmmOx) — анаэробное окисление аммония. Данный процесс был зафиксирован голландскими учеными при очистке сточных вод. Было обнаружено, что из вод удаляется нитрат. Организмы были выделены и представляли собой отдельную филогенетическую цепь бактерий *Plantomys*. Более подробно об этих микроорганизмах будет в теме, посвященной аэробному дыханию микроорганизмов.

Ранее, считалось, что аммиак может окисляться только аэробными организмами.

Фумарат в природе. Фумаратное дыхание.

Фумарат в природе редко появляется в больших концентрациях. Не накапливается, поскольку является центральным метаболитом и участвует в цикле Кребса. Фумаратный тип дыхания встречается редко. Фумарат в природе может образовываться микроорганизмами из сахаров, малата (яблочной кислоты), цитрата и из аспарагина и аспартата (при расщеплении двух аминокислот в анаэробных условиях).

Если фумарат появляется в анаэробной зоне, то он может служить акцептором электронов через менахинон с окислительно-восстановительным потенциалом -100 мВ. Менахинон может восстанавливать фумарат в анаэробных условиях. Донором электронов могут служить любые дегидрогеназы. У некоторых бактерий, например, у пропионовокислых, реакция восстановления фумарата в сукцинат (янтарную кислоту) происходит постоянно, поскольку, входит в цикл образования пропионовой кислоты — основной метаболизм пропионовокислых бактерий. При переносе электронов с NAD(P)H на фумарат клетки могут запастись 1 молекулу АТФ. Это дыхание относится к анаэробному фумаратному дыханию. Пример, когда электроны могут переноситься на органические акцепторы электронов.

Peptostreptococcus productus интересен тем, что у него вместо протонного цикла существует натриевый цикл, вместо протонного градиента — натриевый. Вся энергетика организма происходит через натрий-зависимые АТФазы. Основным источником энергии — фумаратное дыхание.

Раздел по анаэробному дыханию закончен.

Аэробное дыхание на Земле. Светящиеся бактерии.

Аэробное дыхание на Земле осуществляет огромное количество микроорганизмов, которые научились потреблять кислород с его первым появлением на Земле. Срок появления кислорода оценивается 1.5-1.2 млрд. лет назад. Аэробные организмы получили более энергетический источник питания, и эволюция пошла наверх.

Одним из примеров организмов, осуществляющих анаэробное дыхание, и переносящие электроны на кислород являются светящиеся бактерии. Светящиеся бактерии — морские обитатели, являются психоактивными организмами, которые не выносят высоких температур при их культивировании (не более 25-26°C). Оптимальная температура роста 23-25°C. Эти организмы являются симбионтами морских животных, растут на их поверхности или внутри. Светящиеся бактерии быстро растут, что удобно использовать на лабораторных практикумах — время удвоения/репликации составляет 8 минут.

Светящиеся бактерии, это аэробные микроорганизмы, у которых процесс свечения зависит от кислорода. Точные причины свечения не выяснены. Есть предположения, что клетки таким образом избавляются от восстановителей, что не является логически обоснованным процессом.

В университете Франкфурта, Германия, светящиеся бактерии выделяют из внутренних органов замороженной сельди.

Морские светящиеся бактерии относятся к трем родам: *Vibrio*, *Benetkea*, *Photobacterium* (растут при 23-25°C). Были обнаружены так же и почвенные светящиеся

бактерии, которые являются симбионтами почвенных нематод: *Hotorabdes*, *Xenorabds* (растут при 37°C).

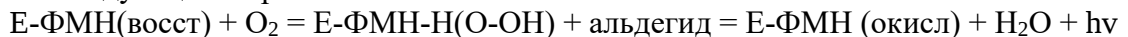
Свет, который испускают микроорганизмы разного цвета — желтый, синий, зеленый, который зависит от бактериальной люциферазы. Светлячки так же испускают свет, но принципиальной разницей между бактериальной и светлячковой реакцией в том, что светлячковой реакции строго нужен АТФ:

АТФ + люцифераза (O₂-зависимый процесс) + люциферин = АМФ + пирофосфат + окисленный люциферин + $h\nu$ (квант света)

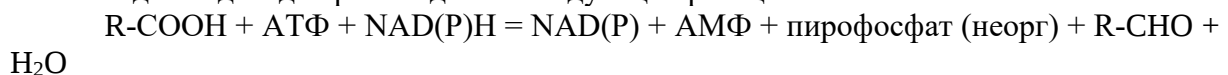
Процесс свечения светлячковой люциферазы оказался удобен при определении концентрации АТФ 10мМ-10мкМ дают линейные зависимости испускания света от концентрации АТФ. Быстрый, надежный способ определения АТФ, который применяется для определения концентрации клеток, поскольку в каждой клетке концентрация АТФ примерно одинакова (10⁻³М). Поэтому, измеряя количество АТФ в суспензии клеток, можно сказать сколько было живых клеток. Данный процесс важен в молочном производстве, когда надо быстро определить сортность молока (1 сорт — 15р/л, 2 сорт — 5р/литр, 3 сорт с максимальным количеством микроорганизмов в пробе — на утилизацию).

Бактериальная люминесценция.

Бактериальная люминесценция отличается от светлячковой работой бактериальной люциферазы — фермент, не аналогичный светлячковой люциферазе. Бактериальная люминесцентная реакция зависит от восстановленного пиридиннуклеотида, и длинноцепочечного альдегида в присутствии кислорода, катализируется реакция люциферазой в результате чего образуется окисленный пиридиннуклеотид, вода, соответствующая кислота (из альдегида) и кванта света. Люцифераза — это ФМН-зависимый фермент. Реакция восстановленного флавина протекает следующим образом:



Максимальное свечение бактериальной люциферазы происходит с альдегидами, которые имеют 14 углеродных атомов в молекуле — тетрадеканол (C₁₄), хотя реакция идет с альдегидами C₁₃-C₁₆. Существуют циклические реакции восстановления кислоты, поскольку её необходимо постоянно регенерировать. Процесс восстановления кислоты до альдегида происходит со следующей реакцией:



На основе бактериальной люциферазы сделали тест на токсичность. Впервые такой тест был разработан фирмой Beckman и назывался Microtox. На токсичность можно проверять питьевую воду, пищевые продукты, предметы бытового обихода и многое другое. Единственное условие для токсиканта — растворимость в воде. Тест происходит довольно просто — светящиеся бактерии выращивают, после их лиофилизируют, в определенных дозах добавляют в ампулах, где светящиеся клетки могут храниться 1-2 года, потом к клеткам добавляют воду и через несколько минут они готовы к работе. Контроль выполняется на основе дистиллированной воды, после вносится токсикант и по изменению активности свечения судят о токсичности образца. Можно определить степень токсичности, но не природу самого токсиканта. Весь комплекс lux-генов содержится в компактном опероне и его можно пересадить в другие

микроорганизмы, что стало удобным, поскольку светящиеся бактерии психрофилы, поскольку они комфортно себя чувствуют при температуре 23-25°C, а согласно общепринятым нормам, тесты необходимо выполнять при температуре 37°C, стали разрабатывать тесты на почвенных организмах. Еще проще система была создана, когда lux-гены встроили в E.coli, что оказалось очень удобно, поскольку свечение падает в зависимости от токсиканта. Приборы для определения токсичности очень компактны, поэтому с ними можно легко пойти в любое место и измерить токсичность в полевых условиях. Такие приборы оказались востребованы и в армейских практиках. Один пример был в советском союзе — определяли количество феромонов хлопчатника в воздухе. Оказалось, что можно определить концентрацию феромонов, при которой хлопчатники вылетят и именно в это время необходимо обработать посевы противохлопчатниковыми препаратами и спасти урожай.

Тест на токсичность был так же применен в космосе на станции МИР — система регенерации воды, которая состояла из системы фильтрующих установок, которые по регламенту надо было заменять каждые три месяца. По мониторингу токсичности воды доказали, что срок службы этих фильтров может быть продлен вдвое, поскольку токсичность не увеличилась за 6 месяцев, что было большим облегчением для полетов космической станции. Единственной трудностью было суспендировать высушенную массу путем добавления капли воздуха в невесомости. Токсичность новых материалов (нанотрубки, наночастицы серебра и д.) так же можно определять с помощью бактериальной люциферазы.

Ранее, токсичность определяли на основе роста дафнии в среде с исследуемым веществом. Тест занимает три дня, он дорогой, требует много ручного труда и хорошо подготовленных операторов, которые должны следить за развитием простейших, которые должны следить за тем, сколько простейших погибло. В данном случае, велика роль человеческого фактора при оценке жизнеспособности дафний. В люциферазном тесте используются цифровые значения, благодаря чему он получает большое развитие, разрабатываются ГОСТы.

Эти исследования так же хороши компактностью прибора, можно его сделать работающим от батареек, выводить данные на ПК. Однако, необходимо сопоставить данные по тесту с дафниями и люциферазой, поскольку, на дафниях уже проверено множество веществ на токсичность, разработаны ГОСТы и ПДК.

Лекция 13. Метилотрофы и метанотрофы

Метилотрофы. Их классификация.

Метилотрофные микроорганизмы осуществляют аэробное дыхание, питаются метильными соединениями — метильным CH_3 -радикалом. Интерес к этой группе возник в конце 1960-х годов, поскольку к середине 1960-х годов, всемирная организация при ООН к пищевым ресурсам подсчитала, что население планеты увеличивается быстрее, чем происходит накопление питательных ресурсов. Поэтому, через некоторое время должен наступить голод на Земле, соответственно, возникнут катаклизмы и миграции. Ученым были даны задания найти приемлемые источники питательных ресурсов из неорганических соединений. Поэтому, внимание было обращено на такие непищевые источники для производства белка, как метан, метанол (получается в одну стадию из метана) и на углеводороды нефти. По этим трем направлениям начались исследования, и многие западные компании и лаборатории стали заниматься изучением микроорганизмов, которые растут на метане и метаноле. В то же время был введен термин метилотрофные микроорганизмы, метилотрофный метаболизм. В середине 1960-х годов началось серьезное исследование метаболизма этих микроорганизмов, которые продолжают до настоящего времени. Во многих лабораториях мира эти организмы изучаются как компоненты биоразнообразия на Земле, разнообразия биологических путей усваивания неорганических субстратов и биотехнологических путей, поскольку за последнее время стали разрабатывать системы для гидролитического способа получения белков за счет метилотрофных бактерий. Метан — довольно дешевый субстрат, на котором можно получать чужеродные дрожжам белки, которые полезны для человека и животных и применяются в медицине и ветеринарии.

Метилотрофные микроорганизмы (метилотрофы) делят на облигатные и факультативные метилотрофы. Среди облигатных есть:

1. Метанотрофы растут только за счет использования метана;
2. Облигатные метилотрофы используют только метанол и/или метиламин.

Факультативные метилотрофы делятся на:

1. Ограниченно-факультативные метилотрофы используют только одноуглеродный субстрат (метанол/метиламин) и один углеродный субстрат (фруктоза/глюкоза);
2. Неограниченно-факультативные метилотрофы используют как одноуглеродные соединения, так и многоуглеродные соединения.

Одноуглеродные соединения — содержат в своей молекуле 1 атом углерода — метан, метанол, альдегид, CO , CO_2 . CO_2 используют многие автотрофы, поэтому это не субстрат для роста (нельзя дальше окислить), но субстрат для метаболизма. Некоторые метилотрофные организмы так же используют CO_2 как источника углерода. В основном, это одноуглеродные соединения, восстановленные. К одноуглеродным соединениям так же относятся такие соединения, в которых находится более 1 атома углерода, однако, такие соединения не соединяются между собой C-C углеродной связью. Например, различные метиламины, которые замещают азот на, например, метильные группы (метиламин, диметиламин, триметиламины). При окислении таких соединений, на каждом этапе отщепляется одна метильная группа, которая идет на питание микроорганизма.

В природе, одноуглеродные соединения встречаются:

Метан — самый восстановленный, природный метаболит, природный продукт анаэробного превращения углеродных соединений в анаэробных условиях отмершего организма, в конечном итоге, превращающегося в метан и CO_2 . Поэтому, запасы метана на Земле огромны, это долгосрочный источник энергии на Земле. Метан постоянно вырабатывается в анаэробных зонах. Метан может как скапливаться в анаэробных зонах, так и диффундировать к поверхности в аэробную зону, где встречается с метаноокисляющими микроорганизмами, которые распространены повсеместно. Это аэробные микроорганизмы, поскольку для окисления метана требуется кислород, который вводится специальными оксигеназами в организм.

Метанол — является одноуглеродным соединением, в природе не накапливается в больших количествах, появляется в результате расщепления гидролизом природных соединений пектина и лигнина в аэробных и анаэробных зонах. Поэтому, имеются аэробные и анаэробные микроорганизмы, которые метаболизируют метанол. Метанол так же является субстратом метаногенеза, из которого в аэробных условиях может образовываться метан. Облигатные и факультативные метилотрофные организмы могут легко метаболизировать природный метанол.

Формальдегид — соединение, которое в природе практически не накапливается, поскольку является чрезвычайно реакционноспособным веществом и мгновенно связывается с нуклеиновыми кислотами и белками, денатурируя их. Антропогенная активность привносит формальдегид в природные очаги, что связано с функционированием лакокрасочной и другой промышленности.

Формиат — присутствует в виде промышленных сбросов в природе в результате антропогенного воздействия. Так же, формиат образуется в природных процессах при смешанном брожении глюкозы (энтеробактерии). Энтеробактерии, образуя формиат, практически сразу же разлагают его на водород и CO_2 .

Формамид (HCONH_2) — вещество промышленных сбросов, отходы лакокрасочной промышленности.

Цианид — соли цианистоводородной кислоты присутствуют в промышленных сбросов от гальванопластики. Могут выделяться цианогенными бактериями, грибами, растениями.

CO — моноокись углерода иногда накапливается в природе, поскольку это продукт неполного сгорания (лесные пожары, выбросы вулканов), большое количество CO выделяется в результате недосгорания автомобильного топлива.

Моно/ди/три метиламины — присутствуют в виде промышленных сбросов с предприятий пищевой промышленности. Так же возникают, при разложении рыбы. Возникает из N-окиси триметиламина ($(\text{CH}_3)_3\text{NO}$), которая присутствует в качестве осмопротектора в тканях рыб и беспозвоночных, которые обитают в морях и океанах с целью удерживания воды внутри клеток. N-окись триметиламина является универсальным акцептором электронов, например, когда выловили рыбу и она перестает дышать, при отмирании беспозвоночных и некоторых водорослей, клетка перестает дышать и оксидаза не работает, тогда при помощи N-окиси триметиламина, дегидрогеназа работает, перенося электроны на N-окиси триметиламина, которая восстанавливается до триметиламина. Триметиламин имеет неприятный запах гниющей рыбы.

Диметилсульфид $((\text{CH}_3)_2\text{S})$, диметилсульфоксид $((\text{CH}_3)_2\text{SO})$, диметилсульфон $((\text{CH}_3)_2\text{SO}_2)$ — присутствуют в промышленных сбросах. Некоторые растения способны их синтезировать.

Микроорганизмы, которые окисляют одноуглеродные соединения распространены повсеместно в связи с большим распространением одноуглеродных соединений. Метанотрофы были первыми выделенными в чистые культуры, в 1905 году Казерер (Kaserer) в лаборатории Бейеринга выделил микроорганизм, который был назван *Bacillus methanicus*, в настоящее время, этому организму присвоено название *Methylobomonas methanica*. Организм был вскоре утерян, к изучению метаноокисляющих организмов вернулись в середине 1960-х годов. Выделение чистых культур шло непросто в связи с тем, что они по неизвестной причине выделяют метанол. Они окисляют больше метана, чем им нужно для собственного метаболизма. Поэтому, вокруг них собираются микроорганизмы, которые используют в качестве субстрата метанол и растут быстрее колонии метаноокисляющих микроорганизмов, окружая их крупными колониями (соотношения 1:20 метаноолокисляющих:метаноокисляющих микроорганизмов). В 1970 году прошел прорыв в лаборатории профессора Виттенбаре, было выделено 100 чистых культур метаноокисляющих микроорганизмов.

Все метаноокисляющие микроорганизмы следуют общим правилам:

1. Имеют высокое сродство к метану $K_m = 0.1 - 2 \text{ мкМ}$ (10^{-7} М метана способны метаболизировать, что необычно для микроорганизмов, обычно требуется миллимолярная концентрация);
2. Удельные скорости не высоки $0.02-0.07 \text{ ч}^{-1}$;
3. Максимальная скорость окисления метана 30 мМ/г клеток в час;
4. Высокое сродство к кислороду — до 0.1 мкМ ;
5. Микроорганизмы хорошо растут на средах с пониженным содержанием кислорода — $0.45 - 20\%$, но концентрации кислорода более 60% ингибируют рост микроорганизмов.

По отношению к метанолу микроорганизмы делятся на три большие группы:

1. Некоторые не растут на метаноле и не выдерживают концентрацию метанола более 0.1% ;
2. Растут на концентрациях метанола 0.5% ;
3. Растут на средах с 3% содержанием метанола.

Некоторые представители родов способны к азотфиксации, что дает им экологическое преимущество. В природных условиях в термальных источниках было зарегистрирована фиксация метана при 70°C . Таких организмов не было выделено и максимальный термофильный метаноокисляющий организм растет при температуре 64°C . Все метанотрофы нейтрофилы, однако, есть примеры выделения метанотрофов из кислых мест обитания $\text{pH} 4-7$, при оптимуме 5.5 . Так же, зарегистрировано выделение метанотрофов при значении $\text{pH}=10$.

Систематика метанотрофов.

По классификации, метанотрофы относятся к домену бактерии. Бактериальный филум — 12 (протеобактерии). Классы III — гамма-протеобактерия. Порядок 6 — *methylococcales*. Семейство I *Methylococcaceae*:

Род I — *Methylococcus* (тип X);

Род III — *Methylocaldum* (тип X);

Род II — *Methylobacter* (тип I);
 Род IV — *Methylomicrobium* (тип I);
 Род V — *Methylomonas* (тип I);
 Род VI — *Methylosphaera* (тип I);
 Род VII — *Methylosurcia* (тип I);
 Род VIII — *Methylothermus* (тип I);
 Род IX — *Methylosoma* (тип I);
 Род X — *Methylohalobius* (тип I);
 Род XI — *Methylovulum* (тип I).

Параллельно с этим есть семейство в классе AlphaProteobacteria, порядок 6-Methylocystales, семейство 5 — Methylocystaceae, род *Methylicystis* (II);

Семейство 6 –Methylosinaceae, род *Methylisinus* (тип II).

Классы метанотрофов.

В 1970 году вышло 2 статьи с выделение 100 чистых культур метанотрофов. До этого, было выделено 2-3 чистых культуры метанотрофов. Британские ученые применили несколько новых способов выделения с помощью ламинаров. Микроманипуляционная техника помогала под бинокулярными лупами открывать чашки со стерильными сферами, с помощью чего можно было перекалывать культуры метанотрофов на различные среды. Так же, они выяснили, что метанотрофы очень чувствительны к содержанию органических веществ в среде, поэтому, даже самый чистый агар содержал немного органики и препятствовал росту микроорганизмов. В связи с этим, были разработаны способы создания твердых сред с помощью силикагелей (силикагель можно отмыть до состояния чистой дистиллированной воды). Они предложили классификацию все метанотрофов на тип I, тип II и тип X по способу упаковки внутриплазматических мембран (что делало их похожими на автотрофов):

Тип I: у некоторых метанотрофов мембраны упакованы и залегают внутри клетки и пересекают её центральную часть. Если разрезать клетку и посмотреть на нее, это будет похоже на стопки упакованных мембран.

Тип II: клетки имеют мембрану, которая идет без пересечения цитоплазматической мембраной, не заходя в центр клетки.

Тип X — микроорганизмы, которые не относятся к I и II типу, поскольку их упаковка мембраны и тип цитоплазматических свойств отличны.

Свойства метанотрофов типа I и типа X.

Таблица 12.1. Свойства метанотрофов с мембраной типа I и типа X

Тип / Признак	<i>Methylomonas</i>	<i>Methylobacter</i>	<i>Methylococcus</i>	<i>Methylomicrobium</i>	<i>Methylosphaera</i>	<i>Methylocaldum</i>
Форма	палочки	Кокки, палочки	Кокки, овальные	палочки	кокки	Палочки, кокки
Покоящиеся формы	Незрелые цисты	Цисты типа метилобактер	Незрелые цисты	-	-	-

Фермент РубисКО	-	-	+	-	-	-
РМФ	+	+	+	+	+	+
Сериновы й путь	-	-	+	-	-	-
рМНО	+/-	-	+/-	+/-	+	-
Основной хинон	Менахин он 8, Q8	Менахин он 8, Q8	Менахино н 8	?	?	?
Фиксация атмосфер ного N ₂	+	-	+	-	+	-
Основные ЖК в ЦПМ	16:1	16:1	16:0	?	?	?
Присутст вие каротино идов в клетке	+	-	-	-	-	-
Г+Ц (молярны е %)	51-54	49-54	59-66	49-60	43-46	57-59
Т °С	25-35	20-42	37-62	20-35	0-21	30-62
Выделено в чистом виде	5	5	4	3	1	3

В таблице представлены самые изученные представители (обозначение «?» — не известно на данный момент). Далее, пояснения к таблице 12.1:

РубисКО — Рибулзобисфосфаткарбоксилаза, фермент цикла Кальвина, который осуществляет фиксацию CO₂;

РМФ — рибулзозомонофосфатный путь фиксации С формальдегида. Присутствует у всех представителей типа I;

рМНО — растворимая метанмонооксигеназа;

Широкий разброс Г+Ц (гуанин + цитозин) говорит о том, что скорее всего, этот род не гомогенен и дальнейшее изучение рода может привести в дальнейшем к разделению рода на несколько родов.

Организмов типа II выделено меньше (Таблица 12.2)

Таблица 12.2. Свойства метанотрофов с мембраной типа II

Тип / Признак	<i>Methyloisinus</i>	<i>Methylicystis</i>	<i>Methylocella</i>	<i>Methylocapsa</i>
Форма	вибриоид	Кокки, овальные,	Прямы и изогнутые	Коккосарцины

		изогнутые палочки	палочки	
Подвижность (синтез жгутиков)	+	-	-	-
Покоящаяся форма	экзоспора	Липидные цисты	экзоспора	цисты
Тип ВЦПМ	Параллельно ЦПМ	Параллельно ЦПМ	Мембранные везикулы, связанные с ЦПМ	Мембранные везикулы, связанные с ЦПМ
Растворимая метанмонооксигеназа	+/-	+/-	+	-
Мембрансвязанная метанмонооксигеназа	+	+	-	+
Путь фиксации углерода	сериновый	сериновый	сериновый	сериновый
Основной хинон	Q8	Q8	Q8	?
pH диапазон	5.5 — 8	5.5 — 8	4.3 — 7.5	4.2 — 7.2
Г+Ц (молярные %)	60-66	59-64	60-63	63
Выделено в чистом виде	2	4	2	2
			16S РНК	16S РНК

Пояснение к таблице 12.2:

ВЦПВ — внутрицитоплазматическая мембрана

pH — диапазон указывает на присутствие в кислых сфагномах болота, откуда они и были впервые выделены

Различие биохимических путей у метанотрофов.

Исследователи из Великобритании установили так же, что есть различие по биохимическим путям: тип II имеет сериновый тип фиксации формальдегида, имеет 32С единиц в основных молекулах жирных кислот, а тип I имеет рибулозомонофосфатный путь фиксации формальдегида, имеет 16С единиц в основных молекулах жирных кислот. Что позволяло четко разделить организмы на два типа.

Methylococcus отнесли к типу X, поскольку он так же содержал рибулозобифосфаткарбоксилазу.

Систематика метиловых бактерий.

Метилотрофы используют метанол и относятся к классам β-протеобактерий. Метилотрофы разделены по филогенетическому дереву на альфа, бета, гамма-протеобактерии, поэтому они не составляют тесной филогенетической группы. Свойство метилотрофии возникло довольно давно в эволюции и дошли до настоящего времени.

Окисление метана.

Метан окисляется метаноокисляющими микроорганизмами в следующем порядке:

Метан (1) — метанол — формальдегид — формиат — CO_2

На протяжении окисления, метан окисляется специальной системой, названной метанмонооксигеназой.

(1) Требуется кислород и NAD(P)H , происходит с образованием H_2O и окисленного пиридиннуклеотида.

Изучением метанмонооксигеназы занимались две группы: США (Джон Липскомб), работали на *Methylosinus trichosporium* (тип II) и группа Говарда Далтона в Великобритании, которая работала на *Methylococcus capsulatus* (тип X). Обе группы формировали протоколы и не могли договориться, почему в одних случаях метанмонооксигеназа связана с мембраной, а в других случаях растворима.

Пришли к выводу, что это два разных фермента. Метанмонооксигеназа, которая связана с мембранами, присутствуют практически всегда и у всех клеток метаноокисляющих организмов. Растворимая метанмонооксигеназа синтезируется только в определенных условиях — когда клетка истощена по одному микроэлементу, который находится в среде — ион меди. Было установлено, что концентрация меди в среде должна опуститься меньше чем 0.25 мкМ, только тогда начиналась экспрессия генов, ответственная за синтез компонентов растворимой метанмонооксигеназы. Благодаря обмену аспирантами, постдоками и знаниями, было установлено существование редкого микроорганизма, который не у всех микроорганизмов экспрессируется.

Другой фермент, связанной с мембранами, экспрессируются почти у всех микроорганизмов, но её изучение затруднено, потому как она связана с мембранами и её изучение связано с необходимостью экстрагирования различными детергентами. При применении детергентов неминуемо разрушается четвертичная структура фермента и её активность значительно падает. Сейчас, наибольшая достигнутая эффективность при выделении составляет 1% от активности в клетке, что затрудняет установление свойств фермента. Поэтому, работа с мембрансвязанной монооксигеназой происходит только в одной лаборатории — в США.

Свойства растворимой метанмонооксигеназы.

Для растворимой метанмонооксигеназы придумали схему:

Компонент С (редуктаза) и А (гидроксилаза), В — регуляторный фермент. На компонент С приходит восстановитель, электрон передается на компонент А. На компоненте А, где присутствует двух железный кластер, происходят основные события: метан превращается в метанол и кислород превращается в воду.

Один атом кислорода, метанмонооксигеназа встраивает в молекулу окисляемого субстрата. Второй атом кислорода участвует в формировании воды. Два протона и два электрона поступают из восстановителя (рисунок 13.1).

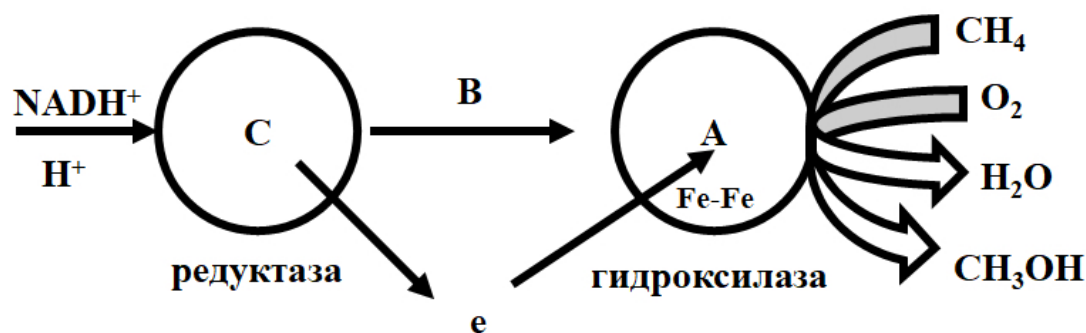


Рисунок 13.1. Схема для растворимой метанмонооксигеназы

При окислении и выделении из метаноокисляющих микроорганизмов растворимых метанмонооксигеназ из типа I и X, были обнаружены примерно одинаковые свойства:

Компонент A имел вес около 200-245 кДа и состоял из трех субъединиц: 50-54, 40-42, 17 кДа. Структура субъединиц — $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. Во всех растворимых был обнаружен металл — железо.

Компонент B — 15-17 кДа.

Компонент C — 38-44 кДа.

Простетическая группа так же была обнаружена у всех — ФАД + Fe_2S_2 .

О мембрансвязанной метанмонооксигеназе сведений меньше:

Содержит 3 субъединицы α -45, β -26, γ -23 кДа. Для активности необходим ион железа, донорами электронов служит аспартат и метан, но не NAD(P)H .

Лекция 14. Биология метилотрофов и метанотрофов

Биология метанотрофов. Путь окисления метана.

Метанотрофные организмы — аэробные микроорганизмы, повсеместно распространены на Земле, поскольку метан распределен повсеместно, является природным продуктом метаболизма метанобразующих архей. Окисление метана может приводить к появлению других одноуглеродных соединений. Процесс окисления метана выглядит следующим образом:

Метан — метанол — формальдегид — формиат — CO_2

На прошлой лекции был разобран путь окисления метана до метанола с помощью метанмонооксигеназы двух типов — мембрансвязанной и растворимой.

Далее, идет окисление метанола, формальдегида, формиата до CO_2 и связано с дегидрогеназной активностью (протекает при помощи гидрогеназ). Следующей стадией является окисление метанола, который может быть окислен в аэробных и анаэробных условиях, в то время как метан окисляется преимущественно в аэробных условиях. Есть доказательства того, что метан может окисляться и в анаэробных условиях, однако это очень медленный процесс, который можно проследить с помощью изотопных меток. Культур, окисляющих метан в аэробной среде в чистом виде не выделено. Метанол окисляется с помощью гидрогеназ, первую открытую гидрогеназу — метанолдегидрогеназу изучали в 1970-х годах, когда была выделена из цитохрома С. Сразу стало понятно, что она не NAD-зависимая, в то время, как алкогольдегидрогеназа, которая обычно окисляет этанол, NAD-зависимая и находится у всех живых организмов. Хотя окислительно-восстановительные потенциалы пары метанол-формальдегид и этанол-ацетальдегид близки, но так получилось, что у метанолдегидрогеназы акцептором электронов является не NAD, а цитохром С.

Была длинная история по изучению фермента. В качестве простетической группы этого фермента был обнаружен пирролохинолинофенол (PQQ, ПХХ). Фермент является растворимым, находится в периплазме. Формальдегид так же находится в периплазме и оттуда транспортируется в цитохром С. Прежде всего цитохром С является акцептором электронов, что не позволяет клеткам получать достаточной энергии при получении метанола. Во-вторых, он имеет рН-оптимум 9, что нехарактерно для дегидрогеназ. Было трудно доказать, что именно цитохром С является акцептором электронов, поскольку при рН = 9, выделенный и очищенный цитохром С начинал восстанавливаться. Проблема была решена, когда метанолдегидрогеназу выделили из «кислых» метанотрофов, которые растут при рН = 5, поэтому оптимум метанолдегидрогеназы был сдвинут в более нейтральный оптимум, что позволило при рН = 7 доказать, что цитохром С является акцептором.

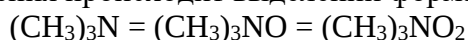
Формальдегид является промежуточным соединением, который находится на развилке, поскольку включение углерода из одноуглеродных соединений в метаболизм этих микроорганизмов начинается с формальдегида. Далее, формальдегид может быть окислен для получения энергии или восстановлен для построения биомассы и участия в дальнейшем метаболизме. Клетка каким-то образом регулирует распределение формальдегида, но окисление формальдегида, проходит с помощью дегидрогеназ — NAD-зависимые или цитохром-зависимые. Формиатдегидрогеназа, обычно NAD-зависимая и клетка на этом этапе может получить пиридиннуклеотиды.

Классическая метанолдегидрогеназа с ПХХ в качестве простетической группы и акцептором электронов в виде цитохрома С была широко распространена у

метилотрофных микроорганизмов и хорошо изучена. В 1988 году была обнаружена NAD-зависимая метанолдегидрогеназа у грамположительных микроорганизмов, относящихся к роду *Bacillus*. Эти микроорганизмы являются умеренными термофилами, растут при 50 °C. NAD-зависимая метанолдегидрогеназа была необычна по своей конструкции — 10-субъединичная дегидрогеназа с большой массой в 0.5 млн Да. При окислении метанола таким способом, клетки могли получать восстановленный пиридиннуклеотид, включать его в метаболизм и получать энергию через три пункта окислительного фосфорилирования.

Углеродный метаболизм метилотрофов.

В углеродном метаболизме метанотрофов на первое место выходит формальдегид, который является предшественником всех путей фиксации CO₂. При окислении триметиламина до диметиламина и метиламина, то на каждом этапе окисления происходит выделения формальдегида.



Формальдегид так же выделяется при окислении метана и метанола. Если он дальше не окисляется, то он вступает в:

1. Рибулозомонофосфатный цикл с дальнейшим образованием C₃-соединений, которые идут на построение материала клеток.
2. Диоксиацетоновый цикл с дальнейшим образованием C₃-соединений
3. Сериновый цикл (основной), наряду с формальдегидом (2 молекулы), фиксируется CO₂ (1 молекула)
4. Рибулозобифосфатный цикл, в котором участвует CO₂ с образованием C₃-соединений

У облигатных метилотрофов в основном функционирует рибулозомонофосфатный цикл с фиксацией формальдегида. У метилотрофных дрожжей функционирует диоксиацетоновый цикл фиксации формальдегида. У метилотрофных организмов в основном, представлен в качестве цикла фиксации сериновый цикл, в которой фиксируется 2 молекулы формальдегиды и 1 CO₂. Существуют так же организмы, которые окисляют метанол или метилированные амины до CO₂ и затем включают его в цикле Кальвина в рибулозомонофосфатном цикле.

В 1960 годы стали изучать углеродный метаболизм метилотрофных микроорганизмов. Молодой исследователь Квейл (R. Quayle) пришел в лабораторию к профессору, члену Британской академии наук Гансу Кребсу (Оксфордский университет) и ему поручили изучать углеродный метаболизм у метанокисляющих микроорганизмов. В то время считалось, что метанокисляющие микроорганизмы окисляют полностью метан до CO₂ и фиксируют CO₂ в цикле Кальвина (ещё не был известен). Квейл стал ставить эксперименты и показал, что происходит фиксация из метана, но не CO₂. Таким образом, было показано существование какого-то другого цикла, а не рибулозобифосфатный цикл. В конце своей научной работы, Квейл писал, что «...хорошо, что начали работу с организмов, фиксирующих формальдегид. Если бы вовремя получили штамм *Coccuscapsulatus*, который должны были поставить из Техаса, то тогда бы мы поставили эксперимент по фиксации CO₂, убедились в его фиксации и открытие рибулозомонофосфатного цикла отложилось бы на неопределенное время». Дело в том, что *Coccuscapsulatus* фиксирует CO₂, у него присутствуют ферменты рибулозомонофосфатного цикла и цикла Кальвина. Но они

работали на организме, который фиксировал CO_2 через рибулозомонофосфатный цикл фиксации формальдегида.

Фиксация формальдегида.

Формальдегид является чрезвычайно реакционноспособным веществом. В клетке, формальдегид в свободном виде не появляется, а обычно связан с ферментами. Таким образом он переносится с одних веществ на другие, поэтому, при записи, обычно ставят кавычки: [НСООН].

Рибулозомонофосфатный цикл фиксации формальдегида начинается на фиксации трех молекул формальдегида на рибулозо-5-фосфате. В результате получается 3 молекулы гексулозо-6-фосфат.

Гексулозо-6-фосфат мгновенно изомеризуется во фруктозо-6-фосфат.

1 молекула фруктозо-6-фосфата дополнительно фосфорилируется, образуется фруктозо-1,6-дифосфат, который расщепляется на оксидиоксиацетон и фосфоглицериновый альдегид.

Молекулы фруктозо-6-фосфата реагируют с фосфоглицериновым альдегидом с образованием ксилозо-5-фосфата и эритрозо-4-фосфата.

Ксилозо-5-фосфат изомеризуется в рибулозо-5-фосфат.

Эритрозо-4-фосфат вступает в реакцию с трансальдозой с образованием седогептулозы и фосфоглицериновым альдегидом которые реагируют между собой с образованием двух сахаров — рибозо-5-фосфат и ксилоза-5-фосфат.

Рибозо-5-фосфат и ксилоза-5-фосфат изомеризуется в рибозо-5-фосфат.

Рибулозомонофосфатный цикл фиксации углерода формальдегида обнаружен у облигатных метилотрофов, окисляющих метанорганомов, которые относятся к I типу метаноокисляющих бактерий. У организмов II типа обнаружен сериновый цикл. В последовательности реакций прослеживается фаза фиксации, расщепления и перестроек. Фаза фиксации едина для всех вариантов, а фаза расщепления и перестроек имеют свои варианты — седогептулозный, альдозазный и кетодезоксиглутаматный вариант. Эти четыре варианта цикла присутствуют в разном сочетании у разных микроорганизмов, чем определяется различная энергетическая выгода при фиксации формальдегида. Самым успешным метилотрофом, которые растут с наибольшей скоростью и преобразуют с наилучшим потенциалом углерод метанола в углерод клетки реализуют самый энергетически выгодный вариант.

Сериновый цикл фиксации формальдегида.

После открытия рибулозомонофосфатного цикла произошло открытие серинового цикла фиксации углерода формальдегида.

Сериновый цикл фиксации заключается в том, что формальдегид фиксируется на 1 аминокислоте — глицине с образованием другой молекулы аминокислоты — серина.

Сериновый цикл имеет следующую схему:

2 молекулы аминокислоты глицина фиксируют 2 молекулы формальдегида с появлением двух молекул серина

От серина отщепляется 2NH_3 , и серин превращается в оксипируват

Оксипируват восстанавливается до 2 глицератов

Глицерат фосфорилируется до 2 фосфоенолпирувата при помощи окислительного фосфорилирования 2АТФ до 2АМФ

Фосфоенолпируват может идти на биосинтез, выходя из цикла. Либо, может обращаться в оксалоацетат (щавелевоуксусную кислоту) с фиксацией CO_2 с отщеплением неорганического фосфора.

С помощью восстановленного пиридиннуклеотида, оксалоацетат восстанавливается до малата.

Малат превращается в мализкофермент А (при помощи кофермента А и АТФ).

Расщепление мализ-КоА на глиоксилат и ацетил-КОА при помощи малатдегидрогеназы.

1 молекула глиоксилата с затратой 1 аммиака превращается в глицин.

Щавелевоуксусная кислота присоединяется к ацетату (*) с образованием цитрата, который превращается в изоцитрат.

Изоцитрат с помощью изоцитратлиазы расщепляется на глиоксилат (который превращается в глицин) и сукцинат.

С сукцинатом идут реакции цикла трикарбоновых кислот — окисление сукцината до фумарата, который с присоединением воды превращается в малат.

При помощи малатдегидрогеназы, малат превращается в цитрат, что приводит к замыканию цикла.

Изоцитратлиаза+ метилотрофные организмы были обнаружены в значительном количестве, так же были обнаружены изоцитрат- метилотрофные организмы, которые не имели этого фермента/гена. Путь превращения ацетилКоА в организмах, не имеющих изоцитратксилазу до сих пор не установлен.

Метод радиоактивного мечения в изучении биохимических путей.

При фиксации углерода, обычно, эксперименты проводятся с применением меченых изотопов. Дают субстрат, меченый по C^{14} и смотрят, в каких продуктах фиксации появилась C^{14} метка. Это довольно трудоемкий способ, который необходимо тщательно планировать. Для этого, берут суспензию отмытых клеток, дают им субстрат, после добавляют меченый субстрат и ингибируют в короткие времена (10 секунд) с отбором пробы до минуты. Затем, минутные и 3-х минутные интервалы, поскольку проводить эксперимент дольше не имеет смысла — клетка будет полностью мечена. После, проводят экстракцию, для этого фиксируют биомассу, которая была подвергнута эксперименту в кипящем этаноле, высушивают и разгоняют на двумерной бумажной хроматограмме с добавляемыми метчиками. Если при фиксации CO_2 изучают и ищут путь фиксации у метилотрофов, то если первые метки появились в пуле C_6 сахаров, то есть предположение, что у этих организмов функционирует рибулозомонофосфатный цикл, поскольку пулы C_5 -сахаров метятся в начале (в первые секунды эксперимента). Если метка появляется в пуле аминокислот глицин-серин, то значит происходит фиксация по сериновому циклу фиксации формальдегида.

Определение путей фиксации формальдегида.

После установления пути фиксации, смотрят специфические ферменты для каждого пути и изучают активности этих ферментов в разных условиях культивирования. Например, факультативные метилотрофы выращивают на одноуглеродных средах или на многоуглеродных соединений (глюкозе/фруктозе),

соответственно, будет разное соотношение ферментов, что будет указывать на то, какой именно путь фиксации формальдегида функционирует, поскольку при условиях гетеротрофного роста (не метилотрофного), эти пути будут репрессированы и активности этих ферментов будут обнаруживаться на низком уровне. Если это облигатные метилотрофы, то они растут только на одноуглеродных соединениях, вопрос сложнее и требует другого способа доказательства.

Чтобы избежать длительных и тяжелых экспериментов, занимающих много времени и ручного труда, был придуман простой способ определения у метилотрофов наличия пути фиксации CO_2 по разнице скорости фиксации углерода из метанола или метиламина, меченного по C^{14} и CO_2 , несущего C^{14} метку.

Если по оси ординат откладывать количество импульсов, то если клетки фиксирует путь метанола сериновым циклом, то он будет выглядеть как (I), CO_2 будет фиксироваться ровно на половину, поскольку на две молекулы формальдегида будет фиксироваться одна молекула углерода из CO_2 .

При осуществлении рибулозомонофосфатного цикла, то фиксация из меченого метанола будет идти по зависимости (II), а фиксация углерода из CO_2 будет на небольшом уровне, что отражает гетеротрофную фиксацию CO_2 , которая всегда присутствует (так же, осуществляется диоксиацетоновый цикл у дрожжей)

В рибулозобифосфатном цикле, время фиксации углерода из метанола (III) и фиксация углерода из CO_2 будет идти примерно с одной интенсивностью, поскольку весь углерод метанола сначала будет превращаться в CO_2 , который после будет фиксироваться.

Таким образом, можно показать, какой цикл в организме присутствует занимает около двух суток с учетом счета активности.

Метилотрофные дрожжи.

Метилотрофные дрожжи являются эукариотическими организмами. Метилотрофные дрожжи были открыты японскими исследователями в 1969 году в лаборатории профессора Агаты, когда он выделил дрожжи, которые росли с хорошей скоростью и образовывали большую биомассу на метаноле. Эти дрожжи стали повсеместно изучать — их энергетический метаболизм, углеродный метаболизм. Сейчас их интенсивно используют во многих лабораториях мира, пересаживая и делая метилотрофные штаммы для получения гетерологичных белков (белков человека для медицинских целей).

Дрожжи относятся к грибам, классифицируются в царство *Mycota*

Отдел *Eumycota*

Подотделы *Ascomycotina* и *Deuteromycotina*

В *Ascomycotina* входят виды дрожжей *Hansenula Polymorpha*, *Hansenula capsulate*, *H. minuta* (9 штаммов), *Pichea Pinus* (наиболее используемый вид дрожжей), *P. Pastores* (6 видов), *Saccharomicetas* (1 вид).

В *Deuteromycotina* входят *Candida* (18 видов), *Rodotorola* (1 вид)

Среди мицелиальных грибов так же есть такие, которые могут расти на метаноле, но их количество мало.

Среди дрожжей, голландские ученые проверили, сколько дрожжей из коллекции в 700 представителей из 60 родов способно расти на средах с метанолом. Оказалось, что только представители 5 родов поддерживали свое существование на метаноле, то

есть, в природе достаточно небольшое количество дрожжей является метилотрофами. Тем не менее, эти дрожжи довольно интенсивно изучали и продолжают изучать, поскольку они являются довольно удобным объектом для исследования.

Срезы метилотрофных дрожжей, которые были выделены в 1969 году были рассмотрены на электронном микроскопе и было установлено, что они имели необычное внутрицитоплазматическую структуру. Дрожжи — овальные большие клетки. У дрожжей, росших на средах с метанолом были обнаружены структуры, которые сначала получили названия микротельца, после было переименовано в пероксисомы (по аналогии с дрожжами, которые росли на углеводах нефти). Эти тельца составляли до 90 % клетки дрожжей. Только к одному концу были сдвинуты все остальные структуры, присутствующие у нормальных эукариотических клеток — ядро, комплекс Гольджи, митохондрии и др. (рисунок 14.1.).

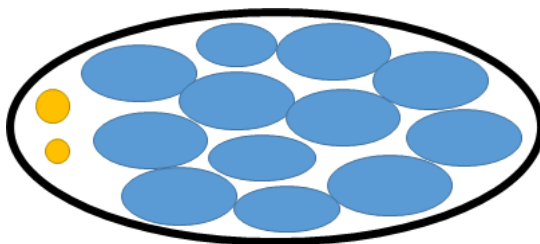


Рисунок 14.1

Позже, под электронным микроскопом было установлено, что пероксисомы имеют правильно очерченную кристаллическую структуру. Кристаллы двух белков (фермента), которые локализуются в пероксисомах — алкогольоксидаза и каталаза. Алкогольоксидаза синтезируется в больших количествах в этих дрожжах — до 20% от всех белков клетки. Этот фермент окисляет метанол. Долгое время шли споры и дебаты в научной литературе, на тему, как ферменты, находясь в кристаллическом состоянии способны проводить какие-то реакции, быть метаболически активными. Позже, были обнаружены подобные структуры у других организмов, поэтому установилось такое мнение, что каталитическая активность может проявляться и у ферментов в форме кристалла.

Позже, встал другой вопрос — дрожжи являются факультативные метилотрофами — могут расти на одноуглеродных соединениях (метанол), так и на многоуглеродных субстратах (глюкоза), Куда девается пероксисома при пересевании культуры дрожжей на многоуглеродную среду? Оказалось, что есть действует механизм ограниченного протеолиза, когда пероксисомы довольно быстро исчезают, поскольку уже не нужны. Ограниченный протеолиз помогает клетке регулировать распад пероксисом, когда они становятся не нужны и клетки выращивают на других средах.

Пероксисома — структурное образование клеток дрожжей, которое препятствует выходу токсичного продукта в цитозоль клетки, который появляется при выращивании дрожжей на среде метанолом, при реакции алкогольоксидазы на метанол, которая при окислении метанола образует формальдегид и перекись водорода. Чтобы перекись водорода, которая является токсичным веществом для клетки не выходила в

цитозоль, формируются пероксисомы, которые ограничены от цитозоли простой мембраной — белковая оболочка, которая не позволяет формальдегиду и перекиси водорода переходить в цитозоль

Метаболизм метанола в пероксисомах.

Метаболизм метанола в пероксисомах протекает следующим образом:

Метанол в пероксисому входит в результате простой диффузии и алкогольоксидаза превращает метанол в формальдегид, образуя перекись водорода.

Перекись водорода расщепляется каталазой на воду и кислород.

Формальдегид транспортируется в цитозоль, где мгновенно связывается с восстановленным глутатионом образуя S-оксиметилглутатион (субстрат для формальдегиддегидрогеназы).

При окислении S-оксиметилглутатиона образуется NAD(P)H и S-формил

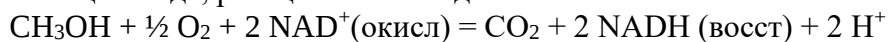
S-формилглутатион гидролизуеться гидролазой, в результате чего регенерируется восстановленный глутатион и образуется формиат.

Формиатдегидрогеназа окисляет формиат до CO_2

Уровень глутатиона в клетках метилотрофных дрожжей чрезвычайно высок, он связывает химически формальдегид и таким образом в виде оксиметилглутатиона идут дальнейшие реакции окисления.

Таким образом, при окислении метанола образуется 2 молекулы восстановленного пиридиннуклеотида, что достаточно клеткам дрожжей для получения энергии, так как NAD поступает в клетки, где окисляется и как в клетках обычных дрожжей образует АТФ.

В общем виде, реакция имеет вид:



Энергия образуется из окисления NAD в митохондриях до АТ. Особых отличий между пекарскими и метилотрофными дрожжами не существует.

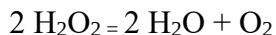
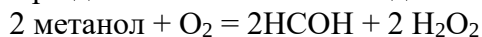
Для формальдегида, который идет на фиксацию, существует механизм, который позволяет его фиксировать при нахождении в пероксисоме:

Ксилулоза-5-фосфат + формальдегид = диоксиацетон + фосфоглицериновый альдегид, переносятся из пероксисомы и идут на биосинтез, который идет в цитозоле клетки.

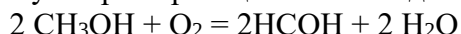
Пероксидазное действие каталазы.

При изучении фермента каталазы у метилотрофных дрожжей, оказалось, что она так же может окислять метанол с помощью пероксидазного действия каталазы.

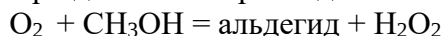
При действии алкогольоксидазы и каталазы происходит следующая реакция:



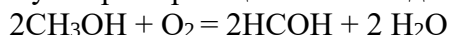
Суммарная реакция имеет вид:



При действии пероксидазы + алкогольоксидаза, происходит следующая реакции:



Суммарная реакция имеет вид:



Суммарные реакции одинаковы, то есть или каталаза действует как собственно каталаза (расщепляя перекись водорода), либо действует как пероксидаза. Для метилотрофных организмов было показано, что карбоксилаза за счет действия перекиси водорода может окислять метанол.

Позже, были сделаны точные эксперименты с расчетом масс и изотопными метками и было показано, что в клетках метилотрофных дрожжей действует механизм, когда работает алкогольоксидаза и каталаза.

Метилотрофные дрожжи были впервые выделены и описаны в 1969 году, уже в 1970-х годах, те же японские исследователи проели эксперименты по включению метки из метанола в метаболиты дрожжей и сказали, что метка включается в фосфаты сахаров, поэтому у метилотрофных дрожжей действует, который был уже хорошо описан у облигатных бактерий. Однако, у дрожжей были особенности, например, у метилотрофных клеток не шла фиксация, пока не добавляли АТФ, что нехарактерно для рибулозомонофосфатного цикла. К 1986 году Джон Вандайкен приехал в лабораторию профессора Квейла, где они решили заняться изучением особенностей рибулозомонофосфатного цикла у метилотрофных дрожжей. Было обнаружено, что рибулозомонофосфатного цикла у дрожжей нет — нет ферментов, соответствующих метаболитов, что привело к повторному началу изучения механизма фиксации формальдегида (Шерфилдский университет).

Перенос кетольной группы с сахаров в фиксации углерода.

В 1953 году у пекарских дрожжей была обнаружена реакция переноса кетольной группы с сахаров на другие соединения. При проверке этой реакции у метилотрофных дрожжей, было установлено, что у них происходит именно эта реакция:

Ксилулозо-5-фосфат + СНО при действии транскеталазы переносится кетольная группировка на формальдегид. В итоге, получается 2 соединения — фосфоглицериновый альдегид и диоксиацетон.

Этот цикл фиксации формальдегида у метанотрофных дрожжей получил название диоксиацетоновый цикл, который протекает следующим образом:

3 Ксилулоза-5-фосфат под действием транскеталазы образует 3 фосфоглицеринового альдегида и 3 диоксиацетона.

3 диоксиацетона фосфорилируются за счет 3 АТФ с образованием 3 фосфодиоксиацетона (поэтому требовался АТФ при проведении реакции в выделенных клетках).

Фосфодиоксиацетон + фосфор неорганический при помощи пиридиннуклеотида (восст.) образует 1,3-дифосфоглицериновую кислоту (макроэргическое соединение), за счет него происходит субстратное фосфорилирование с образованием фосфоглицериновой кислоты.

Остальные 4 молекулы гидролизуются каталазой с образованием 2 фруктоза-6-дифосфата

От фруктоза-6-дифосфата отщепляется неорганический фосфор с образованием фруктозо-6-фосфата

Фосфоглицериновый альдегид + фруктозо-6 фосфат под действием транскеталазы образуют ксилулозофосфат, который изомеризуется в ксилулозо-5-фосфат и ксилулозо-5 фосфат, который реагирует под действием трансальдолазы превращается в ксептогептулозу-7-фосфат и фосфоглицериновый альдегид.

Ксептогептулоза-7-фосфат + фосфоглицериновый альдегид при действии транскеталазы образуют C5 сахара — ксилозо-5-фосфат и рибозо-5-фосфат.

Рибозо-5-фосфат изомеризуется в ксилозо-5-фосфат.

Ксилоза-5-фосфат превращается в ксилулозу.

Цикл не предполагает фиксации как таковую. Скорее, это перенос альдольной группировки на молекулу формальдегида с образованием C3 соединений из C5 и C1.

Образование диоксиацетона объясняет зависимость протекания цикла от наличия АТФ. Общая реакция цикла выглядит следующим образом:

$\text{ЗНСОН} + \text{АТФ} + 2 \text{ пиридиннуклеотид (окисл)} = \text{фосфоглицериновая кислота} + \text{АДФ} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$

Энергетически выгодный цикл для дрожжей, поскольку, обычно при фиксации энергия затрачивается, как, например, в цикле Кальвина, где большое количество энергии и NAD тратится на фиксацию CO_2 .

Лекция 15. Биотехнологии с использованием метилотрофов Выращивание биомассы на средах с метаном.

Биомасса полученных микроорганизмов при выращивании их на средах с метаном была высокого качества, с большим содержанием белка (до 60%), практически не обладала неприятным запахом — органолептические свойства были приемлемы. Её рассматривали в качестве претендента на включение в пищу, корм животных и как пищевую добавку. Однако, при выращивании биомассы на средах с метаном, есть недостатки, так, метан и кислород, которые нужны микроорганизмам, слабо растворимы в воде, что требует проведения экспериментов при высоком давлении. Высокое давление для газовой смеси метан-кислород потенциально взрывоопасно, поэтому, это всегда настораживало регулирующие органы и всегда было опасение о большом взрыве. В нашей стране не было ни одной вспышки-взрыва на предприятиях за все время эксплуатации, потому как ферментер был так оборудован, что если что-нибудь произойдет, то произойдет несколько отсечек в подаче метана. Вся водная часть представляла собой пузырьки метана и пузырьки воздуха — не было газовой смеси в привычном понимании. Что представляло собой вспененную биомассу, уменьшая возможность неконтролируемого взрыва. Этот недостаток усугубляется необходимостью в 60 атм. (очень много для промышленных ферментеров). Эта газовая смесь постоянно циркулировала внутри, кислород запитывался через стерилизованный воздух. Но, при метаболизме, клетки окисляют метан до CO_2 , который начинал накапливаться в циркулирующей смеси. Доходило до того, что CO_2 начинал ингибировать рост микроорганизмов — необходимо было как-то вводить CO_2 . Проблема была решена с помощью применения мембран (Владимир Васильевич Тепляков), которые расчищают и пропускают CO_2 . Свойства этих мембран таково, что одни газы проходили через мембрану, а другие нет. С помощью установки мембранного модуля, CO_2 стал постепенно удаляться из ферментера, что послужило новым стимулом для роста клеток — более их ничего не ингибировало.

Второй недостаток метана как субстрата — его высокая теплоотдача при этом процессе. На первом этапе окисления метана до метанола действует метанмонооксидаза, которая включает кислород в реакцию с появлением метанола. Этот процесс идет с выделением тепла, что приводит к разогреву ферментера. Требуется значительные усилия для отвода тепла, что так же снижая производство, так как требуются дополнительные вложения, энергия для поддержания ферментера — требуется проводить дополнительные трубы внутрь ферментера с подачей охлаждающей воды.

Высокое требование по кислороду характерно для всех процессов, использующие в качестве субстратов углеводороды (нефть или метан). Соответственно, нужно вдувать большое количество стерильного воздуха, что так же связано с определёнными проблемами, поскольку воздух нужно стерилизовать. Процесс идет при сравнительно невысокой температуре — нет селективного давления на посторонние микроорганизмы и велика вероятность того, что процесс может быть заражен посторонними микроорганизмами.

Более сложная конструкция ферментера (по сравнению с этанольными реакциями). Концентрация кислорода, для того чтобы смесь была не взрывоопасна, не должна превышать 12%, в то время, как в обычном воздухе содержится 20%. Соответственно, необходимо поддерживать необходимую концентрацию кислорода на

низком уровне — либо увеличивать подачу метана, либо подавать смесь метан:воздух в соотношении 1:1, тогда концентрация составит около 10%. Концентрация кислорода не должно превышать 12.1%.

Эти недостатки и опасения возникновения взрыва, препятствовали широкому внедрению данной технологии. Параллельно с метановым процессом, разрабатывали процесс на метаноле для роста дрожжей и бактерий. Преимущества получения БВК (белково-витаминный концентрат) с метановыми процессами или нефти:

1. Метанол получают из метана в 1 стадию (каталитический процесс, разработанный Imperial Chemical Industries (ICI, Великобритания) и применяемый во всем мире) при повышенной температуре. В 1985 г. ICI построила завод под Томском по производству метанола. Завод был построен на условии, что ICI строит завод, продает лицензию и в течении 5 лет вся продукция поступает в копанию, а после переходит в распоряжение страны. Метанол — летучий спирт, температура испарения 63°C, поэтому он легко отделяется от этанола и других спиртов. Его модно получать со 100% чистотой. Его легко хранить и использовать, потому как он хорошо растворим в воде, поэтому его легко транспортировать и использовать в качестве среды. Нет проблемы с доставкой субстрата в клетки.

2. Меньшее требование по кислороду на единицу используемого субстрата

3. Можно использовать для выращивания термофилов — не столь летуч, как этан при повышении температуры

4. Дрожжи и бактерии проявляют высокую скорость роста на средах с метанолом.

5. Мало микроорганизмов, которые могут использовать в качестве субстрата, поэтому нет проблем с возможностью заражения ферментера другими микроорганизмами

6. Нет проблем с остаточным содержанием метанола в продуктах — легко испаряется

7. Ферментеры устроены проще, чем ферментеры, устроенные для выращивания микроорганизмов на метане.

К недостаткам выращивания белково-витаминной биомассы на средах с метанолом относятся:

1. Меньший выход клеток по сравнению с метаном на единицу сырья (меньшее количество биомассы)

2. Более высокое требование к стерильности процесса — непрерывный процесс, протекающий с высокой скоростью

3. Метанол более дорогой субстрат, если рассчитывать по содержанию на углерод, то будет стоить дороже, чем метан

4. В биомассе обнаруживается высокое количество нуклеиновых кислот, которое нельзя сразу вносить в рацион животных. Будет приводить к значительному вреду из-за образования из нуклеиновых кислот мочевой кислоты, которая откладывается в костях, сосудах, соединительной тканью, что вызывает большую боль. У человека такое заболевание е называется подагра. Поэтому, после получения биомассы, её надо обрабатывать с целью быстрого снижения количества нуклеиновых кислот (до обработки РНК 30%, ДК 3%, после обработки РНК 1%, ДНК — 0.3%, что приемлемо для биомассы)

Биотехнология с использованием *Methylophilus methylotrophus* (ошибка, надо *Methylophilus methylotrophus*).

Самый интересный процесс по выращиванию бактерий был реализован ICI на микроорганизме *Methylophilus methylotrophus*. В компании ICI было создано научное подразделение, которое занималось разработкой данного процесса. Все затраты на разработку процесса и доказательства безопасности разработки составили около 100 млн \$ компанией ICI. В конце концов был построен завод по производству БВК на метаноле в городе Билинг в 1969 г, который проработал до 1986 г. С возможностью 50-70 т. биомассы в год, которая имела название прутин (торговое название «Pruteen»). Это вещество выпускалось в виде порошка или гранул серовато-коричневого оттенка, без запаха, без вкуса — сухая биомасса, содержащая до 64% сырого/истинного белка и применялся для введения в рацион кур, свиней и коров для откорма и получения мяса. Это процесс и продукт выращивали в огромном стерильном ферментере. Который представлял собой трубу в которую подавали воздух. Чтобы пузырьки не слипались, были специальные разделяющие, перемешивание поток. Слева был слив для культуральной жидкости без пузырьков. Более тяжелая жидкость (без пузырьков) стекала, в нее подавали стерильный воздух. Благодаря этому жидкость перемешивалась. Такой тип ферментера носит название Airlift. Такие ферментеры распространены, поскольку переносят большие объемы (1500 куб. л), которые крайне проблематично перемешать мешалками, поскольку высота ферментера составляет 42 м в высоту (13-14 этажный дом). Соотношение длины к диаметру составляло 6:1. Чтобы использовать мешалки, необходимо применить большое усилие на двигатель, пропеллер будет разбивать клетки микроорганизмов, что так же плохо. Поскольку метанол является токсичным и его нельзя вносить в одной точке, поскольку будет слишком большая концентрация в одном месте, что будет губительно влиять на микроорганизмы. Поэтому, метанол и минеральные вещества вносились в 3000 различных точках. Информация с помощью датчиков передавалась на ПК, откуда происходило регулирование скорости подачи субстрата (кислород, метанол).

Возникла проблема с образованием большого количества мены, поскольку клетки выделяют небольшое количество белков, полисахаридов, некоторые клетки разрушаются, что приводит к белковому выходу из клеток. Эти вещества связываются с пузырьками и образуют пену. Проблему возникновения пены решили добавлением антипенного вещества — диметилсилоксана (которое так же проверялось на токсичность).

При разработке процесса размер ферментера увеличивался с 1 куб. ферментера до 30 куб. ферментера. Был проверен продукт на токсичность влияния на несколько поколений домашних животных. Были взяты на откорм куры, индейки, гуси, кролики, свиньи, крупный рогатый скот — добавляли до 20% в корм прутину и смотрели, как добавка влияет на потомство (мозг, печень, почки). Так, доказал, что новый продукт безвреден для животных, тогда правительство разрешило выпускать в продажу прутин. Завод был закрыт поскольку не выдержал конкуренцию по цене (стоимость 1 т = 600 \$), которая была в 2 раза выше белка по той же питательной ценности из сои. Продукт не выдержал экономической конкуренции. ICI предложило продать технологию и завод в СССР, но СССР не согласился. Была идея разработки пищевой добавки на основе прутину для людей, что окупало бы его стоимость, но проект не был поддержан.

Производство метилотрофных дрожжей.

В США был реализован один из двух успешных процессов с использованием метилотрофных дрожжей двух видов — *Pichea pastores*, *Pichea pinus*. Эти два вида метилотрофных дрожжей хорошо растут, не требуют больших затрат при выращивании, устойчивы к посторонним микроорганизмам и во всех лабораториях мира их до сих пор использовать как продуцентов гетерологичных белков. Компания Provesta Corporation, дочерняя компания от Philips Petrollium (Оклахома, США). Удалось сконструировать небольшой ферментёр в 25 т. в котором удалось с помощью различных операций по дозированию метанола и кислорода до величин, нехарактерных для дрожжей. Концентрация клеток доходила до 70 г/л — очень высоковязкая жидкость (жидкая сметанообразная масса). Ферментер выращивался и поддерживался в непрерывном режиме культивирования. Биомасса поставлялась в ИК-сушилку, которая после запивалась в мешки и продавалась на корм скоту. Из этой биомассы стали извлекать алкогольоксидазу (не простой процесс, поскольку клетки дрожжей обладают толстой клеточной стенкой, поэтому необходимо использовать стеклянную мельницу, процесс идет с выделением тепла при котором могут инактивироваться ферменты, либо использования прессов, что является медленным процессом) в промышленном уровне, из которой делали датчики/тесты на содержание метанола в слюне.

По сравнению с бактериальной биомассой, у дрожжей процесс образования БВК проигрывает по содержанию белка (максимум 45%, против бактериальных 70%). На единицу использованного метанола, клетки дрожжей синтезируют меньшую биомассу — из-за энергетических возможностей получения энергии и метанола. У дрожжей прочная клеточная стенка, содержащая хитин. Она на пищеварительных трактах таких животных как свиньи или человек не гидролизуется (расщепляется), поэтому свиньям запрещено давать корм из дрожжей. В нашей стране даже разработан термин «транзитный корм» — когда все проходит не усваиваясь у свиней. В то время как крупный рогатый скот прекрасно переваривает дрожжи, так как в их рубце содержится множество простейших, которые хорошо растут на продуктах из дрожжей. Природные источники белка содержат:

Соя — 45%

Рыба — до 65%

Говядина — 25-35%

Психологически легче продавать биомассу дрожжей, чем бактерий, поскольку производители и их посредники разрабатывают с фермерами, которые не знакомы с микробиологией и при упоминании бактерий, единственная ассоциация, которая у них возникает — «патогены». Поэтому, корм из «патогенов» скармливать животным не хотят. Если упоминают «дрожжи», то ассоциации «пиво, вино, хлеб», сразу же располагает к себе. Поэтому, убеждать фермеров в том, что добавки из бактерий лучше, полезнее, более питательны по белку — бесполезно, все равно попросят из дрожжей. Так привычнее и фермер будет спокоен, что его животные не заболеют. А если заболеют, то он не будет думать, заболели они от корма или от каких-то других причин. Поэтому, с точки зрения маркетинга, это сильно сдерживало продажу, хотя по экономике, продавать белки из бактерий выгоднее.

В этих белках высокое содержание лизина и триптофана которых мало в растительной пище.

Процессы производства БВК на метаноле.

Таблица 15.1. по процессам БВК, реализованным в мире на метаноле

Компания	Производство/ мощность ферментера, куб.м.	Сырье	Продукт
ICI (Великобритания)	1500	Метанол	Прутин (бактерии)
Hoehst Unde (ФРГ)	20	Метан	Пробиом(бактерии)
Phillips petroleum (США)	25	Метанол	Провестин (дрожжи)
Norsk-Hydro (Швеция)	45	Метанол	Норпротеин (бактерии)
Mitsubishi Gas Company (Япония)	2	Метанол	?
Микробиопром (СССР)	20	Метанол	Меприн (дрожжи)
	10	Метан	Гаприн (бактерии)
	900	Углеводороды C11- C17	Паприн (парафины нефти) (дрожжи)
	?	Этанол	Эприн (дрожжи)
ICI (Великобритания)	1-2	Сахароза	Корн (Quorn, съедобные мицелиальные грибы)
Norferm (совместное предприятие DuPont (США) и Statoil (Великобритания))	10 кт/год	Метан	Биопротеин, 20-25 г/л биомассы
Монолит (РФ)	20 кт/год	Метан	? 20 г/л биомассы

Во времена раннего Горбачёва в качестве этанола использовался субстрат вино+коньяк — в качестве утилизации спирта, продукт шел на субстрат для дрожжей

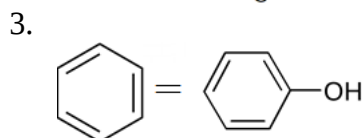
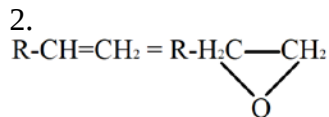
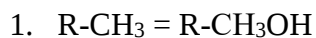
Из высушенных Quorn можно выделить грибы, которые по вкусу похожи на мясо и их можно использовать в качестве мясозаменителей.

Метилотрофы как биотрансформанты.

Белок и БВК — не единственные продукты, которые можно полечить при использовании метилотрофных организмов. Метилоокисляющие бактерии можно использовать в качестве биотрансформанта.

Растворимый фермент метанмонооксигеназа имеет широкую субстратную специфичность и может алифатические и ароматические молекулы использовать, встраивая атом кислорода. Если это алифатический углеводород, то получается соответствующий спирт. Если это соединение ароматическое, то получается структура

типа эпоксида. Циклическое соединение способно преобразовать в соответствующее циклическое соединение с группой OH:

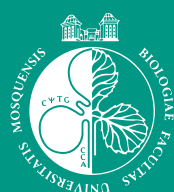


Метанмонооксигеназа мембранная не выделяется в чистом виде, это мембраносвязанный фермент.

Из биомассы метилотрофных дрожжей и бактерий можно выделить вещества:

- Q_{10} (убихинон) — идет в косметическую промышленность, омолаживающие крема
- Полисахариды используют для усиления добычи нефти (закачивают в скважины и как бы, выдавливают нефть, что приводит к увеличению выхода нефти на 10-15%) и в качестве загустителей в пищевые продукты (майонез, чтобы снизить количество жира и увеличить густоту)
- Поли-бета-окси-масляная кислота — природный полимер, легко разлагается в окружающей среде. Предполагается использовать для создания пластиковых пакетов. Используют в хирургии при наложении швов — рассасываются за 2-3 недели и не требуется повторное вынимание нитей из швов.
- Аминокислоты (лизин, метионин, триптофан) — на стадии разработки, уже созданы, но улучшаются продуценты аминокислот, которые на основе дешевого этана синтезируют аминокислоты и могут вытеснить те микроорганизмы, которые используют в качестве субстрата сахара
- Получение витаминов

Метилотрофные дрожжи образуют алкогольоксидазу (до 90%) и имеют её большой промотор. В этот промотор вставляются различные гены, чтобы получить синтез необходимых белков. С помощью такого процесса, эукариотически экспрессированные белки более похожи на человеческие, чем синтезированные в *E.coli* (у дрожжей есть посттрансляционная репликация), которые нуждаются в доработке, чтобы быть похожими на белки человеческого организма. Наиболее распространенными и используемыми дрожжами являются *Pichia pastores*, *Pichia pinus*, в которые вставляют гормон роста (применяют для быстрого откармливания кур, индейки, крупного рогатого скота, рыб (форель, семга)), инсулин, интерфероны α и γ , фактор некроза опухоли.



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
Л Е К Ц И И У Ч Е Н Ы Х М Г У

