

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова»**

ОБЩАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

краткий курс лекций

для бакалавров III - IV курса

Направление подготовки
19.03.01 Биотехнология

Профиль подготовки
Пищевая биотехнология

Саратов 2016

УДК 575
ББК 30
Ф28

Рецензенты:

Заведующая кафедрой «Экология», доктор биологических наук,
профессор ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет»

Е.И. Тихомирова

Доцент кафедры «Кормление, зоогигиена и аквакультура»,
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

Л.А. Сивохина

Ф28 **Общая биотехнология:** краткий курс лекций для студентов III - IV курса
направления подготовки 19.03.01 Биотехнология / Сост.: Е.А. Фауст //
ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. – Саратов, 2016. – 123 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Общая биотехнология» составлен в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначен для студентов направления подготовки 19.03.01 Биотехнология. Краткий курс лекций содержит теоретический материал по технологии ферментационных процессах; о технологических приемах и особенностях культивирования микроорганизмов, клеток растений и животных; рассмотрены основные типы биотехнологических процессов (производство биомассы, спиртов, ферментов, витаминов, аминокислот, органических кислот и др.); технология иммобилизации клеток и ферментов; основы клеточной инженерии и молекулярной биотехнологии; принципы организации, контроля и управления биотехнологическими процессами. Курс лекций направлен на формирование у студентов знаний основ реализации различных биотехнологических процессов.

УДК 575
ББК 30

© Фауст Е.А., 2016
© ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2013

Введение

Биотехнология является в настоящее время одним из приоритетных направлений науки, с которым связывают благосостояние всего человечества в обозримом будущем. Однако достижения биотехнологии становятся реальной помощью народному хозяйству и отдельным людям лишь тогда, когда на их основе создаются промышленные производства, функционирование которых направлено на разработку практически ценных продуктов.

Краткий курс лекций содержит теоретический материал по технологии ферментационных процессах; о технологических приемах и особенностях культивирования микроорганизмов, клеток растений и животных; рассмотрены основные типы биотехнологических процессов (производство биомассы, спиртов, ферментов, витаминов, аминокислот, органических кислот и др.); технология иммобилизации клеток и ферментов; основы клеточной инженерии и молекулярной биотехнологии; принципы организации, контроля и управления биотехнологическими процессами.

Курс лекций направлен на формирование у студентов знаний основ реализации различных биотехнологических процессов.

Лекция 1

ТЕХНОЛОГИЯ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ – I

1.1. Устройство и основные конструкторские детали ферментеров и биореакторов

Ферментаторы – это герметичные цилиндрические емкости, высота которых в 2-2,5 раза превышает диаметр. Их изготавливают из нержавеющей стали; они снабжены мешалкой диаметром примерно $\frac{1}{3}$ диаметра аппарата. Рабочий объем – не более 0,7 общего объема. Свободное пространство выполняет роль буфера, здесь накапливается пена и таким образом предотвращаются потери культуральной жидкости. Биореакторы укомплектовывают измерительными приборами, регулирующими устройствами, устройствами для пеногашения, смотровыми люками.

К биореакторам и к другому оборудованию предъявляют следующие требования: возможность использования для культивирования разных биообъектов (бактерий, грибов, клеток растений и млекопитающих); они должны быть изготовлены из инертных и коррозионностойких материалов; эксплуатационная надежность; стабильность в работе; высокие экономические показатели; эстетичность; легкость в обслуживании.

Различают следующие **типы биореакторов:**

- по способу перемешивания и аэрации: аппараты с механическим, пневматическим и циркуляционным перемешиванием;
- по размеру и целевому назначению: лабораторные, пилотные, промышленные;
- по режиму работы: периодические и непрерывно действующие, периодический режим с доливом субстрата, полупериодические, непрерывно-проточные;
- по условиям культивирования: аэробные и анаэробные, мезофильные и термофильные, для глубинного и поверхностного культивирования, аппараты для жидких питательных сред, твердофазные и газофазные.

Современный биореактор должен обладать следующими системами: 1) эффективного перемешивания и гомогенизации питательной среды; 2) обеспечения доступа и быстрой диффузии газообразных агентов (система аэрации среды); 3) теплообмена; 4) пеногашения; 5) стерилизации сред, аппаратуры и воздуха; 6) контроля и регулировки процесса.

1.2. Обеспечение тепло- и массообмена

Теплообмен – перераспределение тепловой энергии между взаимодействующими фазами. Теплообмен является важной составной частью процессов, протекающих в биореакторе, т.к. жизнедеятельность и метаболическая активность биообъекта в зависимости от температуры.

Теплообмен зависит от ламинарного и турбулентного движения теплоносителя; толщины и качества материала стенок биореактора; вязкости среды; скорости потока при полунепрерывном и непрерывном способах культивирования биообъектов; характера охлаждения биореактора.

Большинство биотехнологических процессов протекают при температуре 30 - 50 °С (мезофильные условия). Поэтому всегда необходим отвод тепла, особенно в биореакторах, в которых выращивают аэробные клетки. Для отвода тепла используют рубашки аппаратов, змеевики, которые монтируют внутри биореактора, выносные теплообменники и др. Для поддержания теплового режима в ферментаторе используют

артезианскую воду (12 - 15 °С); смесь артезианской и оборотной воды, т.е. воды, которая прошла через ферментатор (18 - 20 °С); «захоложенную» воду (10 °С), получаемую на специальных установках.

Расчет и оптимизация системы теплообмена усложняется наличием в биореакторе контактирующих поверхностей: между клеткой и питательной средой; между средой и стенкой аппарата; между стенкой и охлаждающей жидкостью рубашки биореактора; между рубашкой и наружной средой и т.д.

Теплообмен описывается уравнением: $Q = U \cdot A \cdot \Delta T$, где Q – теплота, переданная в единицу времени от одной фазы другой (например, внутренний объем биореактора – окружающая среда); A – площадь поверхности теплообмена; ΔT – межфазная разность температур.

Коэффициент теплопередачи U соответствует количеству теплоты, которая передается в единицу времени через единичную поверхность при разности температур в 1°С.

Повысить скорость передачи теплоты между внутренним объемом и системой теплообмена, т.е. увеличить эффективность работы этой системы, можно за счет: повышения коэффициента теплопередачи; увеличения поверхности теплообмена; увеличения разности температур.

Коррозия стенок биореактора или их загрязнение снижают коэффициент теплопередачи. Поэтому необходимо изготавливать аппараты из неподверженных коррозии материалов и его поддержания в чистоте.

Для регуляции теплообмена изменяют длину трубопровода, используют теплообменники пластинчатого типа или типа «труба в трубе» и др.

Массопередача – обмен веществом между различными фазами (например, перенос кислорода из газовой фазы в жидкую).

Так, при выращивании биообъекта в ферментаторе образуется сложная система массопереноса кислорода: газ – жидкость – твердое тело (т.е. биообъект). Эту систему можно разделить на три части: газ – жидкость, жидкость – жидкость и жидкость – твердое тело. В этих системах перемещение кислорода будет неравноценным и зависит от растворимости газа в жидкой фазе, мощности барботажа, размеров пузырьков, скорости вращения вала и формы мешалки, химического состава питательной среды, температуры, толщины невозмущаемых слоев жидкости вокруг газового пузырька и клетки и т.д. Исходя из этого необходим постоянный контроль за содержанием кислорода в среде.

Для эффективного переноса кислорода необходимо добиваться разности его концентрации в направлении от газового пузырька к клетке. С этой целью, учитывая низкую растворимость кислорода в воде и водных растворах, приходится подавать его в биореактор в повышенных количествах. Следует добиваться, чтобы все аэробные клетки были насыщены кислородом.

Для микроорганизмов, например кишечной палочки, такая критическая концентрация растворенного кислорода составляет 0,0082 ммоль/л при 38°С, для пеницилла – 0,022 ммоль/л при 24°С, для дрожжей – 0,0037 ммоль/л при 20°С. Причем общая потребность в кислороде достигает максимума в конце log-фазы и начале const-фазы. Это означает, что удельная скорость размножения клеток достигает своего пика раньше, чем скорость использования кислорода.

Скорость потребления кислорода биообъектом зависит от:

- возраста культуры – размножающиеся клетки потребляют больше кислорода;
- межклеточной адгезии – конгломераты клеток потребляют меньше кислорода,

чем отдельные клетки;

- скорости накопления биомассы клеток – чем она больше, тем скорость поглощения кислорода быстрее;
- динамических изменений питательной среды – большая вязкость снижает поступление кислорода к клеткам;
- качества источников питания – отношение количества потребляемого кислорода к количеству превращенной глюкозы всегда меньше, чем аналогичное соотношение при окислении углеводов из нефти;
- продуктов метаболизма – секретируемые белки снижают массопередачу кислорода;
- пеногасителей – лаурилсульфат натрия, например, снижает коэффициент массопередачи кислорода.

Скорость переноса кислорода (QO_2) рассчитывают на единицу объема реактора, исходя из отношения произведения плотности потока и площади поверхности раздела фаз (газ – жидкость) к объему жидкой фазы в биореакторе:

$$QO_2 = \frac{K_1(C_1' - C_1) \cdot A}{V},$$

где K_1 – объемный коэффициент массопередачи; C_1' – концентрация растворенного вещества в жидкой фазе, находящейся в равновесии с газовой фазой; A – площадь поверхности раздела фаз “газ – жидкость”; V – объем жидкой фазы.

$C_1 = 0$, когда кислород быстро усваивается клетками; массообмен кислорода при этом максимален.

Объемный коэффициент массопередачи зависит от характеристики среды культивирования и аппарата. Он существенно меняется при внесении в среду биообъекта, обычно в сторону увеличения, что объясняется активным поглощением кислорода клетками – это способствует поступлению его новых порций в жидкость из газовой фазы.

В биосистемах массообмен связан также с выведением углекислоты и транспортом различных соединений через мембраны клеток. Диоксид углерода может находиться в среде в виде CO_3^{2-} ; HCO_3^- ; H_2CO_3 и CO_2 . Растворимость диоксида углерода зависит от pH жидкости; он транспортируется через границу раздела фаз “газ – жидкость” только в растворенном виде.

1.3. Системы аэрирования и перемешивания

Перемешивание в биореакторах решает следующие задачи: интенсификация процессов массопередачи газ-жидкость и жидкость-клетка; интенсификация теплопередачи при термостатировании среды; диспергирование капель жидкости и пузырьков газа; выравнивание температуры в объеме перемешиваемой среды; выравнивание концентраций в объеме среды.

Для аэрации культуральной среды при аэробных биотехнологических процессах используют воздух или воздух, обогащенный кислородом, реже чистый кислород. В ходе метаболизма выделяются газообразные продукты (например, CO_2), которые подлежат удалению.

Анаэробные процессы зависят от газообразных субстратов или требуют отвода газообразных продуктов жизнедеятельности. Для этого существуют системы газоснабжения и газоотвода, примером которых служат аэраторы. Потребность в кислороде меняется по мере развития культуры. Аэратор должен вовремя реагировать на эти изменения, увеличивая или уменьшая подачу кислорода.

Биореакторы с механическим перемешиванием – имеют мешалку, которая состоит из центрального вала и 6-8 лопастей, расположенных в несколько этажей. В систему перемешивания входят отражательные перегородки, которые переводят круговое движение жидкости в вихревое. Аэрация осуществляется путем подачи воздуха снизу через горизонтальную трубку с отверстиями (барботер). Такие биореакторы используют для производства кормовых дрожжей и спирта.

Биореакторы с пневматическим перемешиванием – мешалка отсутствует; перемешивание осуществляется пузырьками газа. В таких биореакторах скорость массопередачи между газом и жидкостью усиливается вращающимися дисками с отверстиями или придонными пропеллерами. Возможен вариант, когда воздух подается не во внутренний, а во внешний объем среды. На пневматическом перемешивании основаны колоночные биореакторы, они разделены горизонтальными перегородками на этажи, это усиливает аэрацию и перемешивание. Такие биореакторы используют для культивирования клеток животных и растений.

Биореакторы с циркуляционным перемешиванием – содержат насосы, которые создают направленный ток жидкости по замкнутому контуру. Жидкость увлекает за собой пузырьки газа. Разработаны аппараты, в которых сочетается циркуляционное и пневматическое перемешивание. Такие ферментаторы можно заполнять твердыми частицами (песок, куски обожженной глины, гранулы полимеров), это улучшает перемешивание, препятствует обрастанию стенок биообъектом, улучшает диспергирование воздуха в жидкости. При этом клетки растут в виде пленки на твердых частицах. Такие биореакторы используют для культивирования грибов и актиномицетов.

1.4. Системы пеногашения, асептики и стерилизации

Серьезная проблема для аэрируемых биотехнологических процессов – вспенивание культуральной среды (образование на ее поверхности слоя из пузырей). Пенообразование связано с наличием в среде поверхностно-активных веществ (продукты распада жиров – мыла, белки).

Пена способствует росту многих аэробных микроорганизмов. В пенном слое («кислородный коктейль») наибольший прирост дают дрожжи. Внедряясь в границу раздела вода/воздух, пенообразующие ПАВ стимулируют массопередачу между этими фазами, снижая затраты на перемешивание и аэрацию.

Однако избыточное пенообразование ведет к сокращению полезного объема биореактора, создает угрозу заражения культуры посторонней микрофлорой. Поэтому система пеногашения – необходимая составная часть реактора.

Различают механические, акустические, химические пеногасители и их комбинации. Химические пеногасители: жировые (соевое, рапсовое, кокосовое, подсолнечное, горчичное масла, сало, рыбий жир и др.) и синтетические (силиконы, пропинолы, контрамины, полимерные многоатомные спирты, полиэфир и др.). Механические пеногасители – лопасти, диски, барабаны, расположенные в верхней части биореактора, сепараторы пены.

Система стерилизации – специфический элемент биореактора. Принципы асептики биотехнологического производства: устранение посторонней микрофлоры из реактора до введения в него штамма-продуцента; поддержание чистоты культуры на всем протяжении биотехнологического процесса; стерилизация питательных сред, добавочных компонентов, титрантов, пеногасителей, подаваемого в биореактор воздуха

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что собой представляют ферментаторы?
- 2) Какие требования предъявляют к биореакторам и к другому оборудованию для реализации биотехнологических процессов?
- 3) Типы биореакторов.
- 4) Какими системами должен обладать современный биореактор?
- 5) Что понимают под теплообменом при реализации биотехнологических процессов?
- 6) Уравнение теплообмена.
- 7) Что понимают под массообменом при реализации биотехнологических процессов?
- 8) От каких факторов зависит скорость потребления кислорода биообъектом?
- 9) Как рассчитывают скорость переноса кислорода?
- 10) Какие задачи решаются в биореакторах при перемешивании?
- 11) Охарактеризуйте биореакторы с механическим перемешиванием.
- 12) Охарактеризуйте биореакторы с пневматическим перемешиванием.
- 13) Охарактеризуйте биореакторы с циркуляционным перемешиванием.
- 14) Системы асептики и стерилизации при реализации биотехнологических процессов.
- 15) Виды пеногасителей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4

Дополнительная

1. Общая и фармацевтическая биотехнология: учебное пособие. – Самара: НОУ ВПО СМИ «РЕАВИЗ», 2012. – 118 с.
2. Основы биотехнологических процессов: Учебно-методическое пособие по биотехнологии. Часть I. Способы поддержания асептических условий при культивировании / И.В. Тихонов. – М.: МГАВМиБ, 2001. – 31 с.
3. **Пшеничникова, А.Б.** Основы биотехнологии: учебное пособие / А.Б. Пшеничникова. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 92 с.
4. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.

5. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6

6. Журналы: Биотехнология, Прикладная биохимия и микробиология, Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии, Фармацевтическая промышленность, Кондитерское и хлебопекарное производство, Масложировая промышленность, Молочная промышленность, Переработка молока, Мясные технологии, Сыроделие и маслоделие, Пиво и напитки, Пищевая технология.

7. <http://www.biotechnolog.ru>

Лекция 2

ТЕХНОЛОГИЯ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ – II

2.1. Твердофазная, жидкофазная и газофазная ферментация

Твердофазная ферментация. Используется для культивирования мицелиальных грибов и дрожжей. В таких процессах роль воды сведена до минимума.

Различают три типа таких процессов:

- поверхностные процессы – слой субстрата не превышает 3-7 см («тонкий слой»), а роль биореакторов выполняют подносы из алюминия или культивационные камеры;
- глубинные процессы в неперемешиваемом слое («высокий слой») – биореакторы представляют собой глубокие открытые сосуды;
- твердофазные процессы с перемешиванием и аэрацией – масса субстрата здесь может быть гомогенной (полужидкий навоз) или состоять из частиц твердого субстрата, взвешенных в жидкости. Таким методом проводят микробиологическое выщелачивание сернистых соединений из каменного угля.

Преимущества твердофазных процессов:

- меньшие затраты на оборудование и эксплуатацию;
- облегчено отделение и очистка продуктов;
- небольшое количество воды препятствует контаминации;
- образуется мало сточных вод.

Недостатки твердофазной ферментации – неравномерный рост колоний из-за неравномерного распределения субстрата, аэрации, температуры и влажности.

Жидкофазная ферментация – биомасса микроорганизмов суспендирована в жидкой питательной среде, через которую при необходимости продувается воздух или другие газы. Глубинный способ является более выгодным для промышленности по сравнению с поверхностным способом, так как позволяет осуществлять полную механизацию и автоматизацию процесса, избегать инфицирования технологического процесса посторонней микрофлорой.

Газофазная ферментация. Протекает в аппаратах с твердым наполнителем, где закрепляются микроорганизмы, но сами частицы носителя взвешены в потоке газа, насыщенном аэрозолем питательной среды. Газофазные аппараты могут быть аэробными (пропускают воздух) или анаэробными (пропускают диоксид углерода). Этот способ ферментации используется довольно редко, в основном при очистке газов от вредных и одорирующих примесей. Так получают спирт при культивировании дрожжей, биомассу дрожжей. При этом газ уносит летучие продукты жизнедеятельности (спирт), который затем конденсируется в холодильнике.

2.2. Периодический способ культивирования

Это такой процесс, когда в ферментер со стерильной питательной средой подается посевной материал, задаются определенные технологические параметры (температура,

pH, обороты мешалки) и процесс проходит самостоятельно с образованием целевого продукта. Далее в этой же емкости микроорганизмы при определенных условиях проходят через все стадии роста и развития популяции.

Когда процесс культивирования заканчивается, емкость для выращивания освобождают, и цикл возобновляется. Этот процесс экономически не выгоден, т.к. образуется мало целевого продукта. При таком способе культивирования скорость роста биомассы всегда стремится к нулю либо из-за недостатка питательных веществ, либо из-за накопления в среде токсических метаболитов.

Этот способ используется для получения посевного материала на некоторых этапах, а также при микробиологическом производстве аминокислот, в производстве вакцин и т.д.

2.3. Промежуточные способы культивирования

Продленный периодический процесс – предусматривает одноразовую загрузку и разгрузку ферментера. Однако цикл развития микроорганизмов в продленном периодическом процессе удлиняется двумя способами:

1) за счет подпитки – периодическое или непрерывное добавление питательной среды;

2) за счет длительного удержания клеток в системе (*диализная культура*). При этом культура развивается в пространстве, ограниченном полупроницаемой мембраной, а продукты метаболизма диффундируют во внешний раствор. В этом случае продлевается экспоненциальная фаза и фаза линейного роста. Наиболее простой диализный метод – культивирование в целлофановых мешках, погруженных в питательную среду.

Многоциклические процессы культивирования – ведут в одном ферментере, многократно повторяя полный цикл развития культуры без перерыва на стерилизацию. Применяют как для получения биомассы; для производства продуктов микробного синтеза – антибиотиков, внеклеточных ферментов, аминокислот. Применение данного способа позволяет в несколько раз сократить затраты труда на производство продукта по сравнению с периодическим способом.

Различают:

1) Одностадийные многоциклические процессы – осуществляются в одном ферментере.

2) Многостадийные многоциклические процессы – основаны на принципе повторного и последовательного периодического культивирования. Протекает в нескольких ферментерах, которые соединены в батарею с целью длительного использования культуры.

Вариант такого способа: культура выращивается в одном биореакторе. В то время, когда она проходит в своем развитии экспоненциальную фазу, из нее берется инокулят (посевной материал) для засева следующего реактора. В первом реакторе культура доращивается до необходимой фазы роста. Когда культура во втором реакторе достигает экспоненциальной фазы, из нее также делается пересев в третий реактор и т.д. Так как культура все время пересеивается в экспоненциальной фазе, не происходит ее старения и вырождения.

Полунепрерывные системы – при этом полная загрузка и разгрузка ферментера осуществляются однократно, однако в процессе роста культуры часть культуральной жидкости сливается, а освободившийся объем заливается свежей питательной средой. Таким образом, функционирует сливно-доливная система. Различные варианты полунепрерывных систем используются в производстве дрожжей, водорослей, антибиотиков и лимонной кислоты.

2.4. Непрерывный способ культивирования

При этом в процессе биосинтеза из ферментера берется определенное количество культуральной жидкости и вносится в другой ферментер, в котором тоже начинается биосинтез. Культуральная жидкость выполняет функции посевного материала. Микроорганизмы постоянно получают приток свежей стерильной питательной среды, а из аппарата непрерывно отбирается биомасса вместе с образуемыми метаболитами. Такой способ культивирования можно назвать «открытой» системой.

Непрерывная ферментация может проходить в следующих системах:

Гомогенные системы идеального смешения – микроорганизмы растут в культуральной среде, постоянной по своему составу, и, следовательно, в каждый данный момент времени находятся в одном и том же физиологическом состоянии.

По количеству ферментеров гомогенные системы могут быть одностадийными, двухстадийными и многостадийными.

Так, для получения высоких концентраций биомассы используют *одностадийные системы с возвратом клеток*. В них клетки отделяют от культуральной жидкости с помощью насоса, возвращают обратно в ферментер. Возврат клеток (рециркуляция) имеет важное значение в тех процессах, в которых за время пребывания в ферментере клетки не успевают реализовать свои потенциальные возможности в отношении синтеза целевого продукта.

Многостадийные системы состоят из ряда последовательно соединенных ферментеров – батарей. Это позволяет получать культуру при любой скорости роста – от лаг-фазы до экспоненциальной и стационарной. Применяется при получении молочной кислоты, этилового спирта.

Основной аппарат для выращивания непрерывной гомогенной системы – ферментер идеального смешения с устройством для потока среды и слива культуры, поддерживающим постоянный уровень среды. Такой процесс называют непрерывно-проточным, обеспечивающим одинаковую концентрацию всех продуктов внутри ферментера и в вытекающей жидкости.

Непрерывно-проточное культивирование дает возможность поддерживать постоянные условия роста микроорганизмов за счет лимитирования (ограничения) какого-то одного фактора среды.

При этом различают:

Хемостатное культивирование – при этом лимитирующим рост фактором является химический состав питательной среды. В хемостате скорость разбавления питательной среды является постоянной в соответствии с заданной плотностью популяции. Изменяя скорость разбавления, можно получать режимы, обеспечивающие различную скорость роста.

Турбидостатное культивирование – при этом подача питательной среды осуществляется по команде фотоэлектрического элемента, регистрирующего оптическую плотность культуры в ферментере. Скорость разбавления устанавливается автоматически в соответствии с заданной плотностью популяции.

Системы культивирования полного вытеснения – в ней культура не перемешивается, а представляет собой поток жидкости через трубку. Наиболее распространенный аппарат для культивирования в данном случае – трубчатый ферментер. Он может иметь различную форму (прямую, S-образную, спиральную) и устанавливается горизонтально или вертикально. Такая культура за время посева до выгрузки проходит через все стадии периодической культуры, то есть фазы роста распределены не во времени, а в пространстве. Каждой части ферментера в установленном режиме соответствует определенный отрезок кривой роста. Этот способ культивирования используется для анаэробных процессов. Посев осуществляется непрерывно на входе в ферментер одновременно с подачей среды. Этот принцип может использоваться на стадии брожения при производстве пива.

Системы твердожидкостного типа – это многофазные системы, в которых культура растет на границе разных фаз: жидкость - твердая фаза - газ. В этих системах клетки удерживаются путем прилипания к твердой основе – наполнителю и размножаются на нем, образуя пленку биомассы. Пример – производство уксуса в стружечных аппаратах.

В данной системе лимитирующим фактором для аэробных микробов являются кислород и субстрат (питательные вещества). В тонких пленках каждая из прикрепленных в поверхности клеток полностью обеспечена этими веществами и способна расти и размножаться с максимальной экспоненциальной скоростью. По мере того, как клетки образуют более толстую пленку биомассы, рост их ограничивается (верхним слоям не хватает кислорода, нижним – питательных веществ).

Системы твердожидкостного типа применяются при очистке сточных вод, в производстве органических растворителей и кислот и т.д.

2.5. Принцип масштабирования технологических процессов

Технология производственного процесса всегда обрабатывается поэтапно. Принцип масштабирования – поэтапное увеличение объема аппаратов. Сначала его моделируют в лабораторных биореакторах, затем в пилотных и только после этого в промышленных установках.

Лабораторные биореакторы (объем – 0,5-100 л) по форме, системам аэрации и перемешивания напоминают промышленные. В них используется механическое перемешивание с барботажом.

По типу теплообмена могут быть двух категорий:

1. Лишенные собственных систем теплообмена и стерилизации. При этом установку помещают в водяную баню с постоянной температурой, а стерилизацию проводят в автоклаве;
2. Принцип устройства полностью соответствует промышленным биореакторам.

Лабораторные ферментаторы применяют для решения следующих задач:

1. кинетических – скорость роста клеток, утилизация субстратов и образование целевого продукта;

2. массообменных – рассчитывают коэффициент массопередачи, скорость поступления в среду кислорода и других газов, скорость освобождения среды от газообразных продуктов жизнедеятельности;

3. стехиометрических – связь потребленных субстратов и кислорода с получаемыми целевыми и побочными продуктами.

Пилотные биореакторы (*пионерские, поисковые, указывающие путь*) (объем – 100 л - 5 м³) дублируют промышленные установки. В них изучают макрокинетику потоков жидкости, газа и теплоты. Такие установки позволяют решать вопрос о том, пойдет ли процесс в промышленном масштабе.

Промышленные биореакторы (объем – 5-1000 м³). В них осуществляется синтез кинетических и стехиометрических характеристик. Причем многие параметры не соответствуют лабораторным и пилотным установкам. Для них важным критерием является масштабирование. Как правило, оптимальные условия в ферментаторах изменяются при каждом десятикратном увеличении объема установки.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Принцип твердофазной ферментации.
- 2) Типы процессов при твердофазной ферментации.
- 3) Преимущества и недостатки твердофазных процессов.
- 4) Принцип жидкофазной ферментации.
- 5) Принцип газофазной ферментации.
- 6) Периодический способ культивирования.
- 7) Продленный периодический процесс.
- 8) Многоциклические процессы культивирования, типы.
- 9) Полунепрерывные системы культивирования.
- 10) Непрерывный способ культивирования.
- 11) Гомогенные системы идеального смешения
- 12) Хемостатное культивирование.
- 13) Турбидостатное культивирование.
- 14) Системы культивирования полного вытеснения
- 15) Системы твердожидкостного типа.
- 16) Принцип масштабирования технологических процессов.
- 17) Лабораторные биореакторы.
- 18) Классификация лабораторных биореакторов по типу теплообмена.
- 19) Значение лабораторных ферментаторов.
- 20) Пилотные биореакторы.
- 21) Промышленные биореакторы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.

2. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)

3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.

4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4

5. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4

Дополнительная

1. Общая и фармацевтическая биотехнология: учебное пособие. – Самара: НОУ ВПО СМИ «РЕАВИЗ», 2012. – 118 с.

2. Основы биотехнологических процессов: Учебно-методическое пособие по биотехнологии. Часть II. Способы культивирования микроорганизмов / И.В. Тихонов. – М.: МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2001. – 58 с.

3. **Пшеничникова, А.Б.** Основы биотехнологии: учебное пособие / А.Б. Пшеничникова. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 92 с.

4. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.

5. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6

6. Журналы: Биотехнология, Вестник СГАУ, Прикладная биохимия и микробиология, Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии, Фармацевтическая промышленность, Кондитерское и хлебопекарное производство, Масложировая промышленность, Молочная промышленность, Переработка молока, Мясные технологии, Сыроделие и маслоделие, Пиво и напитки, Пищевая технология.

7. <http://www.biotechnolog.ru>

Лекция 3

ТИПОВЫЕ ПРИЕМЫ И ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ - I

3.1. Роль кислорода в жизни микроорганизмов

Дыхание, или биологическое окисление, основано на окислительно-восстановительных реакциях, идущих с образованием АТФ.

При дыхании происходят процессы окисления и восстановления: окисление – отдача донорами (молекулами или атомами) водорода или электронов; восстановление – присоединение водорода или электронов к акцептору. Акцептором водорода или электронов может быть молекулярный кислород (такое дыхание называется *аэробным*) или нитрат, сульфат, фумарат (такое дыхание называется *анаэробным* – нитратным, сульфатным, фумаратным).

Анаэробноз (от греч. *aer* – воздух + *bios* – жизнь) – жизнедеятельность, протекающая при отсутствии свободного кислорода. Если донорами и акцепторами водорода являются органические соединения, то такой процесс называется *брожением*. При брожении происходит ферментативное расщепление органических соединений, преимущественно углеводов, в анаэробных условиях. С учетом конечного продукта расщепления углеводов различают спиртовое, молочнокислое, уксуснокислое и другие виды брожения.

По отношению к молекулярному кислороду бактерии можно разделить на три основные группы: 1) облигатные, т.е. обязательные аэробы, 2) облигатные анаэробы и 3) факультативные анаэробы.

Облигатные аэробы могут расти только при наличии кислорода.

Облигатные анаэробы (клостридии ботулизма, газовой гангрены, столбняка, бактериоиды и др.) растут только на среде без кислорода, который для них токсичен. При наличии кислорода бактерии образуют перекисные радикалы кислорода, в том числе перекись водорода и супероксид-анион кислорода, токсичные для облигатных анаэробных бактерий, поскольку они не образуют соответствующие инактивирующие ферменты.

Аэробные бактерии инактивируют перекись водорода и супероксид-анион соответствующими ферментами (каталазой, пероксидазой и супероксиддисмутазой).

Факультативные анаэробы могут расти как при наличии, так и при отсутствии кислорода, поскольку они способны переключаться с дыхания в присутствии молекулярного кислорода на брожение в его отсутствие. Факультативные анаэробы способны осуществлять анаэробное дыхание, называемое нитратным: нитрат, являющийся акцептором водорода, восстанавливается до молекулярного азота и аммиака.

Среди облигатных анаэробов различают **аэротолерантные бактерии**, которые сохраняются при наличии молекулярного кислорода, но не используют его.

Для выращивания анаэробов в бактериологических лабораториях применяют анаэроостаты – специальные емкости, в которых воздух заменяется смесью газов, не содержащих кислорода. Воздух можно удалять из питательных сред путем кипячения, с помощью химических адсорбентов кислорода, помещаемых в анаэроостаты или другие емкости с посевами.

3.2. Типы размножения микроорганизмов

Бактерии размножаются путем бинарного деления пополам, реже путем почкования. Актиномицеты, как и грибы, могут размножаться спорами. Актиномицеты, являясь ветвящимися бактериями, размножаются путем фрагментации нитевидных клеток.

Грамположительные бактерии делятся путем врастания синтезирующихся перегородок деления внутрь клетки, а грамотрицательные – путем перетяжки, в результате образования гантелевидных фигур, из которых образуются две одинаковые клетки

Делению клеток предшествует репликация бактериальной хромосомы по полуконсервативному типу (двуспиральная цепь ДНК раскрывается и каждая нить достраивается комплементарной нитью), приводящая к удвоению молекул ДНК бактериального ядра – нуклеоида. Сначала происходит раскручивание (деспирализация) двойной цепи ДНК, в результате чего образуется репликативная вилка (разветвленные цепи); одна из цепей, достраиваясь, связывает нуклеотиды, другая – достраивается посегментно.

Репликация ДНК происходит в три этапа: инициация, элонгация, или рост цепи, и терминация. Образовавшиеся в результате репликации две хромосомы расходятся, чему способствует увеличение размеров растущей клетки: прикрепленные к цитоплазматической мембране или ее производным (например, мезосомам) хромосомы по мере увеличения объема клетки удаляются друг от друга. Окончательное их обособление завершается образованием перетяжки или перегородки деления.

Клетки с перегородкой деления расходятся в результате действия аутолитических ферментов, разрушающих сердцевину перегородки деления. Аутолиз при этом может проходить неравномерно: делящиеся клетки в одном участке остаются связанными частью клеточной стенки в области перегородки деления. Такие клетки располагаются под углом друг к другу, что характерно для дифтерийных коринебактерий.

3.3. Фазы роста культуры микроорганизмов

Микроорганизмы, попав в свежую полноценную питательную среду, начинают размножаться не сразу. Этот период называют лаг-фазой - **I фаза** (рис. 3.1). В этот период культура как бы привыкает к новым условиям обитания. Активируются ферментные системы, если необходимо, синтезируются новые ферментные системы, клетка готовится к синтезу нуклеиновых кислот и других соединений. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизмов, состава питательной среды и условий культивирования. Чем эти различия меньше и чем больше посевного материала, тем короче эта фаза.

II фаза называется фазой ускоренного роста, она характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы популяции и постоянным увеличением скорости роста культуры; обычно она непродолжительна.

Затем следует логарифмическая, или экспоненциальная фаза роста - **III фаза**. В этот период отмечается максимальная скорость роста культуры, интервалы между появлением предыдущего и последующего поколения постоянны. Логарифм числа клеток линейно зависит от времени.

Вследствие интенсивного роста и размножения культуры запас необходимых питательных веществ в среде уменьшается. Это является основной причиной снижения скорости роста культуры. Кроме того, в среде накапливаются продукты метаболизма, которые в определенной концентрации могут мешать нормальному протеканию биохимических процессов обмена веществ. Иногда в питательной среде образуется так много

клеток, что для новых поколений клеток не хватает пространства, а точнее, поверхности. Скорость роста снижается, уменьшается число делений клеток, наступает **IV фаза** – фаза замедления или уменьшения скорости роста.

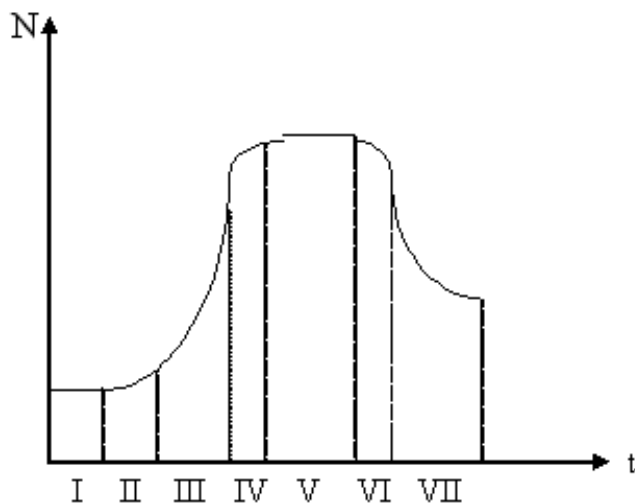


Рис. 3.1. Кривая роста микроорганизмов (зависимость количества клеток от времени культивирования): I, II, III, IV, V, VI, VII – фазы роста

V фаза называется стационарной (фазой линейного роста). Масса и количество всех живых клеток достигает максимума. Количество вновь образовавшихся клеток на этом этапе равно количеству клеток, отмерших и автолизированных (разрушенных клеточными ферментами).

В какой-то момент это равновесие нарушается, и количество отмерших клеток превышает прирост. Наступает **VI фаза** – фаза ускорения отмирания.

Завершается цикл роста и развития популяции в замкнутом объеме **VII фазой**, характеризующейся отмиранием и автолизом микроорганизмов, которая называется фазой отмирания. На этой стадии биомасса клеток значительно уменьшается, так как запасные вещества клетки исчерпываются.

При выращивании бактерий на жидкой питательной среде наблюдается придонный, диффузный или поверхностный (в виде пленки) рост культуры.

Бактерии, растущие на плотных питательных средах, образуют изолированные колонии округлой формы с ровными или неровными краями (S- и R-формы), различной консистенции и цвета, зависящего от пигмента бактерий. Пигменты, растворимые в воде, диффундируют в питательную среду и окрашивают ее, например синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) окрашивает среду в синий цвет. Другая группа пигментов нерастворима в воде, но растворима в органических растворителях. Так, колонии «чудесной палочки» имеют кроваво-красный пигмент, растворимый в спирте. И, наконец, существуют пигменты, не растворимые ни в воде, ни в органических соединениях.

Вид, форма, цвет и другие особенности колоний на плотной питательной среде могут учитываться при идентификации бактерий, а также отборе колоний для получения чистых культур.

3.4. Периодический метод культивирования микроорганизмов

При периодическом способе культивирования стерильная питательная среда засеивается исходной культурой продуцента, и далее в этой же емкости микроорганизмы при определенных условиях проходят через все стадии роста и развития популяции.

Когда процесс культивирования заканчивается, емкость для выращивания освобождают, и цикл возобновляется, начиная от засева питательной среды исходной культурой продуцента. При таком способе культивирования (его можно назвать «закрытой» системой, когда хотя бы один из компонентов не может поступать в нее или выводиться из нее) скорость роста биомассы всегда должна стремиться к нулю либо из-за недостатка питательных веществ, либо из-за накопления в среде токсических метаболитов.

Ранее применялось культивирование на поверхности плотных питательных сред в пробирках, колбах, матрасах, бутылках. Выращиваемая в этих условиях культура гетерогенна (разнородна) в физиологическом отношении, так как клетки на различных участках поверхности и в разных слоях находятся в различных условиях и развиваются неодинаково. Этот способ иногда применяется для наращивания биомассы.

В настоящее время в промышленности используют жидкие питательные среды, применение которых позволило избежать недостатков плотных питательных сред и увеличило выход процесса за счет использования больших емкостей для культивирования (ферментеров). Применение жидких питательных сред потребовало перемешивания культуры с целью выравнивания условий роста микробов в разных частях рабочего сосуда и аэрирования (насыщения кислородом). Для этого используются мешалки, качалки, бутылки с барботажем газа.

Периодический способ выращивания микроорганизмов используется для получения посевного материала на некоторых этапах.

3.5. Непрерывный метод культивирования микроорганизмов

При непрерывном способе культивирования микроорганизмы постоянно получают приток свежей стерильной питательной среды, а из аппарата непрерывно отбирается биомасса вместе с образуемыми метаболитами (такой способ культивирования можно назвать «открытой» системой). При непрерывном культивировании микроорганизмы не должны испытывать недостатка в питательном субстрате, так как скорость его притока сбалансирована со скоростью выхода биомассы. Кроме того, культура не отравляется продуктами обмена веществ – в этом большое преимущество непрерывного способа культивирования по сравнению с периодическим, преимущество «открытой» системы по сравнению с «закрытой». Непрерывная ферментация может проходить в гомогенной системе идеального смешения, системе полного вытеснения или в системе твердожидкостного типа.

Гомогенные системы идеального смешения. В системе идеального смешения микроорганизмы растут в культуральной среде, постоянной по своему составу, и, следовательно, в каждый данный момент времени находятся в одном и том же физиологическом состоянии, то есть в состоянии установившегося динамического равновесия.

По количеству ферментеров гомогенные системы могут быть одностадийными, двухстадийными и многостадийными.

Для получения высоких концентраций биомассы используют *одностадийные системы с возвратом клеток*, в которых клетки, отделенные от культуральной жидкости с

помощью насоса, возвращают обратно в ферментер. Возврат клеток (рециркуляция) имеет важное значение в тех процессах, в которых за время пребывания в ферментере клетки не успевают реализовать свои потенциальные возможности в отношении синтеза целевого продукта.

Многостадийные системы состоят из ряда последовательно соединенных ферментеров – батарей. Применение многостадийных систем позволяет получать культуру при любой скорости роста – от лаг-фазы до экспоненциальной и стационарной. Многостадийное культивирование применяется при получении молочной кислоты, этилового спирта.

Основным аппаратом для выращивания непрерывной гомогенной системы является ферментер идеального смешения с устройством для потока среды и слива культуры, поддерживающим постоянный уровень среды. Такой процесс называют непрерывно-проточным, обеспечивающим одинаковую концентрацию всех продуктов внутри ферментера и в вытекающей жидкости.

Непрерывно-проточное культивирование дает возможность поддерживать постоянные условия роста микроорганизмов за счет лимитирования (ограничения) какого-то одного фактора среды. В случае, когда лимитирующим рост фактором является химический состав питательной среды, процесс называют хемостатным культивированием. В хемостате (ферментере, где протекает хемостатное культивирование) скорость разбавления питательной среды является постоянной в соответствии с заданной плотностью популяции. Изменяя скорость разбавления, можно получать режимы, обеспечивающие различную скорость роста.

Другой принцип управления процессом – *турбидостат*. В нем подача питательной среды осуществляется по команде фотоэлектрического элемента, регистрирующего оптическую плотность культуры в ферментере. Скорость разбавления устанавливается автоматически в соответствии с заданной плотностью популяции.

Хотя теоретически взаимосвязь между концентрацией биомассы и скоростью разбавления подчиняется одним и тем же закономерностям в хемостате и турбидостате, методы управления процессами различны.

Системы культивирования полного вытеснения. Открытая система полного вытеснения отличается от системы идеального смешения тем, что культура в ней не перемешивается, а представляет собой поток жидкости через трубку. Наиболее распространенным аппаратом для культивирования в данном случае является трубчатый ферментер. Он может иметь различную форму (прямую, S-образную, спиральную) и устанавливается горизонтально или вертикально. Система полного вытеснения представляет собой пространственный, проточный вариант периодической культуры. Такая культура за время посева до выгрузки проходит через все стадии периодической культуры, то есть фазы роста распределены не во времени, а в пространстве, причем каждой части ферментера в установившемся режиме соответствует определенный отрезок кривой роста. Этот способ культивирования используется для анаэробных процессов. Посев осуществляется непрерывно на входе в ферментер одновременно с подачей среды. Этот принцип может использоваться на стадии брожения при производстве пива.

Системы твердожидкостного типа. К системам твердожидкостного типа относят многофазные системы, в которых культура растет на границе разных фаз: жидкость – твердая фаза – газ. В этих системах клетки удерживаются путем прилипания к твердой основе – наполнителю и размножаются на нем, образуя пленку биомассы. Типичным

примером является производство уксуса в стружечных аппаратах.

В данной системе лимитирующим фактором для аэробных микробов являются кислород и субстрат (питательные вещества). В тонких пленках каждая из прикрепленных в поверхности клеток полностью обеспечена этими веществами и способна расти и размножаться с максимальной экспоненциальной скоростью. По мере того, как клетки образуют более толстую пленку биомассы, рост их ограничивается (верхним слоям не хватает кислорода, нижним – питательных веществ).

Культивирование микроорганизмов, образующих пленку из биомассы, осуществляется в ферментере типа колонки с наполнителем. В качестве наполнителя может использоваться макроноситель (кокс, прутья, стружка, стеклянные шарики и т.д.) и микроноситель (амберлитовые смолы, частички сефадекса и т.д.). Клетки, культивируемые таким образом, называют иммобилизованными.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что понимают под дыханием (биологическим окислением)?
- 2) Какие процессы протекают при дыхании?
- 3) Анаэробиз.
- 4) Облигатные аэробы.
- 5) Облигатные анаэробы.
- 6) Аэробные бактерии.
- 7) Факультативные анаэробы.
- 8) Аэротолерантные бактерии.
- 9) Типы размножения микроорганизмов.
- 10) Фазы роста культуры микроорганизмов.
- 11) Периодический метод культивирования микроорганизмов.
- 12) Непрерывный метод культивирования микроорганизмов.
- 13) Гомогенные системы идеального смешения.
- 14) Классификация гомогенных систем культивирования по числу биореакторов.
- 15) Непрерывно-проточное культивирование.
- 16) Системы культивирования полного вытеснения.
- 17) Системы твердожидкостного типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. **Никитина Е.В.** Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
6. Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах: учебно-методическое пособие /

Дополнительная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
2. сост.: Блинов В.А. – Саратов: 410005, Саратов, Пугачевская, 161, офис 320, 2008. – 102 с.
3. Общая и фармацевтическая биотехнология: учебное пособие. – Самара: НОУ ВПО СМи «РЕАВИЗ», 2012. – 118 с.
4. Основы биотехнологических процессов: Учебно-методическое пособие по биотехнологии. Часть II. Способы культивирования микроорганизмов / И.В. Тихонов. – М.: МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2001. – 58 с.
5. **Пшеничникова, А.Б.** Основы биотехнологии: учебное пособие / А.Б. Пшеничникова. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 92 с.
6. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
7. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6
8. Журналы: Биотехнология, Вестник СГАУ, Прикладная биохимия и микробиология, Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии, Фармацевтическая промышленность, Кондитерское и хлебопекарное производство, Масложировая промышленность, Молочная промышленность, Переработка молока, Мясные технологии, Сыроделие и маслоделие, Пиво и напитки, Пищевая технология.
9. <http://www.biotechnolog.ru>

Лекция 4

ТИПОВЫЕ ПРИЕМЫ И ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ - II

4.1. Получение чистой культуры

Чистой культурой микроорганизма называют культуру микроорганизмов одного вида, представленную потомством одной клетки. Для выделения чистой культуры используют, как правило, плотные питательные среды, на которых каждая клетка вырастает в виде изолированной колонии – потомства микроорганизмов, образовавшееся из одной клетки.

Выделение чистой культуры микроба является основой бактериологической работы, так как чаще всего исследуемый материал содержит смесь различных видов микробов. Чистые культуры нужны для изучения свойств микроорганизмов и установления их видовой принадлежности. Кроме того, чистые культуры микроорганизмов (дрожжей, микроскопических грибов, молочнокислых, уксуснокислых, пропионовокислых и других бактерий) обладают промышленно ценными свойствами и нужны для получения различных продуктов и веществ, нашедших применение в пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства.

Перед выделением чистой культуры из различных объектов окружающей среды (пищевого продукта, с поверхности плодов и овощей, из почвы, воды и др.), в которых находится множество микроорганизмов, вначале получают накопительные культуры, проводя культивирование в селективных условиях – условиях, способствующих развитию одной культуры и ограничивающих развитие сопутствующих микроорганизмов. Обеспечить селективные условия для микроорганизмов можно только в том случае, если известны особенности обмена веществ выделяемого микроорганизма. Так как различные микроорганизмы используют различные источники питания, то селективные условия легче всего обеспечить, подбирая определенный состав питательных сред. Можно создать селективные условия, обеспечивая соответствующую температуру, рН, освещение и др.

Накопительные культуры состоят преимущественно из клеток микроорганизмов одного вида. Для получения накопительных культур используют жидкие накопительные питательные среды, различные методы обработки материала, содержащего смесь микробов, а также учитывают другие особенности выделяемых из объекта микроорганизмов.

Для выделения чистых и накопительных культур из различных объектов в лабораториях используют методы посева и пересева. *Посевом* называется внесение части исследуемого материала в стерильную питательную среду, *пересевом* – перенос части выросшей на питательной среде культуры микроорганизмов на другую свежую питательную среду.

Методы выделения накопительных культур микроорганизмов

К таким методам относятся методы обогащения, метод нагревания исследуемого материала для выделения спорообразующих бактерий, метод выделения подвижных форм бактерий (метод Шукевича) и др.

Методы обогащения. Их часто применяют для выделения чистых культур микроорганизмов (например, бактерий группы кишечной палочки (БГКП), сальмонелл и др.) из материалов, в которых мало выделяемых микроорганизмов, но содержится большое количество сопутствующей микрофлоры. Для увеличения численности выделяемого вида микроорганизмов вначале делают посев исследуемого материала в накопительные питательные среды, которые содержат вещества, стимулирующие его рост и угнетающие или задерживающие размножение сопутствующей микрофлоры. Например, для выделения сальмонелл проводят посев в среды обогащения Кауфмана, Мюллера и др., для выделения БГКП – на среду Кесслера. При выделении культур молочнокислых бактерий из почвы, сырого молока или растений посева делают на стерильное обезжиренное молоко, содержащее 5 % этилового спирта для подавления роста гнилостных бактерий.

Метод нагревания. Применяют для выделения чистых культур споровых форм бактерий (бацилл, клостридий). В этом случае перед посевом исследуемый материал прогревают на водяной бане при температуре 75...85 °С в течение 20...30 мин. Вегетативные формы погибают во время прогревания, а споры микробов остаются живыми и при последующих высевах на плотную среду прорастают, формируя колонии.

Метод выделения подвижных форм бактерий (метод Шукевича). Заключается в посеве исследуемого материала в конденсационную воду скошенного мясопептонного агара. При размножении подвижные формы микроорганизмов из конденсационной воды распространяются на агаре, как бы вползая на его поверхность.

Методы выделения анаэробных микроорганизмов. Основаны на выращивании микроорганизмов в средах с низкой концентрацией кислорода или в бескислородной среде, что достигается:

- посевом исследуемого материала в среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества (антиоксиданты). В качестве таких веществ чаще всего используют тиогликолят натрия, солянокислый цистеин, кусочки животных и растительных тканей;
- посевом исследуемого материала в глубину плотных питательных сред. Посев делается уколом препаровальной иглой в пробирку со столбиком плотной среды или в расплавленную плотную или полужидкую питательную среду с последующим перемешиванием;
- механическим удалением воздуха из сосудов при выращивании анаэробных микроорганизмов (создают вакуум);
- культивированием анаэробных микроорганизмов в жидких средах под слоем масла;
- культивированием анаэробных микроорганизмов в атмосфере инертного газа, диоксида углерода, азота.

Методы выделения чистых культур микроорганизмов

Метод Пастера (метод предельных разведений). Заключается в том, что из исследуемого материала делают ряд последовательных разведений в жидкой питательной среде. Для этого каплю посевного материала вносят в пробирку со стерильной жидкой средой, из нее каплю переносят в следующую пробирку и так засевают до 8...10 пробирок. С каждым разведением количество микробных клеток, попадающих в среду, будет уменьшаться и можно получить такое разведение, в

котором во всей пробирке со средой будет находиться только одна микробная клетка, из которой разовьется чистая культура микроорганизма. Так как в жидких средах микробы растут диффузно, т.е. легко распределяются во всей среде, то изолировать одну микробную клетку от другой трудно. Таким образом, метод Пастера не всегда обеспечивает получение чистой культуры. Поэтому в настоящее время этот метод используется, главным образом, для предварительного уменьшения концентрации микроорганизмов в материале перед посевом его в плотную среду для получения изолированных колоний.

Методы механического разделения микроорганизмов с использованием плотных питательных сред. К таким методам относятся метод Коха и метод Дригальского.

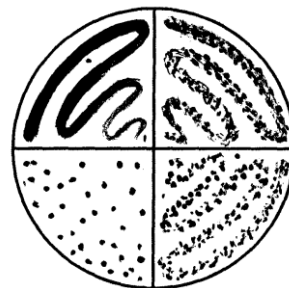
Метод Коха (метод глубинного посева). Исследуемый материал вносят бактериологической петлей или пастеровской пипеткой в пробирку с расплавленной плотной питательной средой. Равномерно размешивают содержимое пробирки, вращая ее между ладонями. Каплю разведенного материала переносят во вторую пробирку, из второй – в третью и т.д. Содержимое каждой пробирки, начиная с первой, выливают в стерильные чашки Петри. После застывания среды в чашках, их помещают в термостат для культивирования.

Для выделения анаэробных микроорганизмов по методу Коха необходимо ограничить доступ кислорода к культуре. С этой целью поверхность глубинного посева в чашке Петри заливают стерильной смесью парафина и вазелина (1:1). Можно также оставлять посевной материал, тщательно перемешанный с агаризованной средой, непосредственно в пробирке. Ватную пробку при этом заменяют резиновой или заливают поверхность агара смесью парафина и вазелинового масла. Чтобы извлечь выросшие колонии анаэробных микроорганизмов, пробирки слегка нагревают, быстро вращая над пламенем горелки. Агар, прилегающий к стенкам, расплавляется, и столбик легко выскользывает в подготовленную чашку Петри. Далее столбик с агаром разрезают стерильным скальпелем, колонии извлекают стерильной петлей или стерильной капиллярной рубкой и переносят в жидкую среду.

Метод Дригальского основан на механическом разделении микробных клеток на поверхности плотной питательной среды в чашках Петри. Каждая микробная клетка, фиксируясь в определенном месте, начинает размножаться, образуя колонию.

Для посева по методу Дригальского используют несколько чашек Петри, залитых плотной питательной средой. На поверхность среды вносят каплю исследуемого материала. Затем с помощью стерильного шпателя эту каплю распределяют по всей питательной среде (посев газоном).

Посев также можно проводить штрихом, используя бактериологическую петлю. Этим же шпателем или петлей осуществляют посев во вторую, третью и т.д. чашки. Как правило, в первой чашке после культивирования посева появляется рост микробов в виде сплошного налета, в последующих чашках содержание микроорганизмов снижается и образуются изолированные колонии, из которых отсевом можно легко выделить чистую культуру.



Таким образом, в первых секторах получается сплошной рост, а вдоль последующих штрихов вырастут обособленные колонии, представляющие собой потомство одной клетки.

В целях экономии сред и посуды можно пользоваться одной чашкой, разделив ее на сектора, и последовательно засеивать их штрихом (метод истощающего штриха). Для этого материал берут петлей и проводят ею ряд параллельных штрихов сначала по поверхности первого сектора, а затем последовательно оставшимися на петле клетками засеивают все другие сектора. При каждом последующем штрихе происходит уменьшение количества засеиваемых клеток.

Метод выделения чистых культур с помощью химических веществ используется при изолировании культур микроорганизмов, устойчивых к определенным химическим веществам. Например, с помощью этого метода можно выделить чистую культуру туберкулезных микобактерий, устойчивых к действию кислот, щелочей и спирта. В этом случае исследуемый материал перед посевом заливают 15 % раствором кислоты или антиформинном и выдерживают в термостате в течение 3...4 часов. После воздействия кислоты или щелочи клетки туберкулезной палочки остаются живыми, а все другие микроорганизмы, содержащиеся в исследуемом материале, погибают. После нейтрализации кислоты или щелочи обработанный материал высевает на плотную среду и получают изолированные колонии возбудителя туберкулеза.

Биологические методы выделения чистых культур патогенных микроорганизмов основаны на заражении исследуемым материалом лабораторных животных, восприимчивых к данному виду возбудителя. Если патогенный микроорганизм содержится в исследуемом объекте, то лабораторное животное заболевает и погибает. После вскрытия павшего животного из внутренних органов делают посева на специальные среды, на которых вырастают чистые культуры выделяемых микробов.

4.2. Выращивание микроорганизмов глубинным методом и методом поверхностных культур

При *поверхностном культивировании* посевной материал высевает на поверхность питательной среды, распределенной небольшим слоем (около 10 см) в металлических кюветах.

При *глубинном культивировании* погружение клеток микроорганизмов осуществляют за счет постоянного перемешивания в течение всего процесса ферментации. Глубинный способ является более выгодным для промышленности по сравнению с поверхностным способом, так как позволяет осуществлять полную механизацию и автоматизацию процесса, избегать инфицирования технологического процесса посторонней микрофлорой.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Понятие чистой культурой микроорганизма.
- 2) Понятие накопительной культуры микроорганизмов.
- 3) Что называют посевом и пересевом?
- 4) Методы выделения накопительных культур микроорганизмов (методы обогащения, метод нагревания, метод выделения подвижных форм бактерий (метод Шукевича).
- 5) Методы выделения анаэробных микроорганизмов.
- 6) Метод выделения чистых культур микроорганизмов (метод Пастера).
- 7) Методы механического разделения микроорганизмов с использованием плотных питательных сред – метод Коха и метод Дригальского.
- 8) Поверхностное культивирование микроорганизмов.
- 9) Глубинное культивирование микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. **Никитина Е.В.** Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4

Дополнительная

1. Основы биотехнологических процессов: Учебно-методическое пособие по биотехнологии. Часть II. Способы культивирования микроорганизмов / И.В. Тихонов. – М.: МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2001. – 58 с.
2. **Пшеничникова, А.Б.** Основы биотехнологии: учебное пособие / А.Б. Пшеничникова. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 92 с.
3. **Тарангул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание / В.З. Тарангул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6
4. <http://www.biotechnolog.ru>

Лекция 5

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ – I

5.1. Производство биомассы

В настоящее время существуют следующие *основные типы биопроцессов*:

- производство биомассы (например, белок одноклеточных);
- клеточных компонентов (ферменты, нуклеиновые кислоты и т.д.)
- метаболитов (химические продукты метаболической активности), включая первичные метаболиты, такие как этанол, молочная кислота;
- вторичные метаболиты;
- односубстратные конверсии (превращение глюкозы во фруктозу);
- многосубстратные конверсии (обработка сточных вод, утилизация лигноцеллюлозных отходов).

Из биомассы промышленных микроорганизмов можно получать продукты различного назначения, которые имеют важное значение в хозяйственной деятельности человека:

- *цистеин, метионин, лизин* – повышение питательной ценности белков;
- *глутамат* – усиление аромата мясных, рыбных и других изделий;
- *глицин, аспарат* – придание кондитерским изделиям и напиткам кислосладкого вкуса;
- *аспартам, тауматин, монелин* – выработка низкокалорийных, суперсладких веществ;
- *α -амилаза* – производство спирта, вин, пива, хлеба, кондитерских изделий и детского питания;
- *глюкоамилаза* – получение глюкозы, удаление декстринов из пива;
- *инвертаза* – выработка кондитерских изделий;
- *пуллуланаза* – производство мальтазных (в сочетании с β -амилазой) или глюконовых (в сочетании с глюкоамилазой) фруктозных сиропов из крахмала;
- *β -галактозидаза* – освобождение молочной сыворотки из лактозы, приготовление мороженого и др.;
- *целлюлазы* – приготовление растворимого кофе, морковного джема, улучшение консистенции грибов и овощей, обработка плодов цитрусовых;
- *пектиназа* – осветление вин и фруктовых соков, обработка цитрусовых плодов;
- *протеаза микробная* – сыроварение, ускорение созревания теста, производство крекеров, улучшение качества мяса;
- *пепсин, папаин* – осветление пива;
- *фицин, трипсин, бромелин* – ускорение процессов маринования рыбы, отделение мяса от костей;
- *липазы* – придание специфического аромата сыру, шоколаду, молочным продуктам, улучшению качества взбитых яичных белков;
- *глюкозооксидаза, каталаза* – удаление кислорода из сухого молока, кофе, пива, майонезов, фруктовых соков для их улучшения и удлинения сроков хранения;
- *витамины A, D, E, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, PP* – повышение питательной ценности продуктов;

- *витамины С, Е* – антиоксиданты;
- *гераниол, нерол, (терпены)* – ароматизаторы;
- *уксусная, бензойная, молочная, глюконовая, лимонная, яблочная кислоты* – консерванты, ароматизаторы;
- *ксантаны* – загустители и стабилизаторы кремов, джемов.

Кроме того, биомасса промышленных микроорганизмов используется для получения микробных препаратов (удобрителей почв, стимуляторов и регуляторов роста растений) и микробных полимеров (ферментных белков, иммунобиологических препаратов, интерферонов, антибиотиков, гормонов и т.д.).

Человек традиционно получает белки, жиры и углеводы (основные компоненты пищи) из животных и растительных источников. В настоящее время источники не покрывают все увеличивающиеся потребности человечества. Так, белки и жиры микроорганизмов заменить белки и жиры традиционного происхождения. Преимущества микроорганизмов как продуцентов белка состоит в высоком содержании белка в биомассе и высокой скорости роста микроорганизмов.

Термин белок одноклеточных (БОК) был предложен в 1966 г. для обозначения биомассы различных микроорганизмов (бактерий, дрожжей, грибов и водорослей). Микробная биомасса содержит также жиры, нуклеиновые кислоты, витамины и минеральные компоненты. Источниками получения пищевого белка могут стать также белковые изоляты из различных видов зеленой биомассы.

Для получения БОК используют самые разнообразные субстраты: парафины нефти, метан, водород, метанол, этанол, уксусную кислоту, углекислый газ, молочную сыворотку, мелассу, крахмал и целлюлозосодержащие отходы промышленности и сельского хозяйства.

Для промышленного использования перспективными являются термофильные микроорганизмы. Качество биомассы оценивается по высокому содержанию белка, низкому содержанию нуклеиновых кислот и отсутствию вредных веществ.

Рассмотрим промышленное производство биомассы на примере получения хлебопекарных дрожжей. В производстве хлебопекарных дрожжей используют специально отобранные расы *Saccharomyces cerevisiae*. При отборе культуры принимают во внимание способность дрожжей сбраживать тесто, они должны обладать хорошей подъемной силой и ферментативной активностью, хорошо расти на мелассной среде в условиях глубокой ферментации и давать высокий выход биомассы. Клетки дрожжей должны легко отделяться от культуральной жидкости сепарированием или фильтрацией и хорошо сохраняться в прессованном виде.

Хлебопекарные дрожжи обладают и бродильной активностью, но чтобы направить использование углеводов субстрата только на образование биомассы, спиртовое брожение ограничивают. Это достигается интенсивной аэрацией среды, а также поддержанием низкой концентрации сахара в ней (0,5-1,5%). При высокой концентрации сахаров наблюдается катаболитная репрессия ферментов цикла Кребса и переключение энергетического метаболизма преимущественно на брожение. Чтобы избежать этого, сахар в среду подают непрерывно с постоянной или возрастающей скоростью притока. Чтобы предотвратить чрезмерное размножение побочной микрофлоры, особенно так называемых диких дрожжей, удельная скорость роста которых выше, чем у хлебопекарных дрожжей, процесс ферментации обычно ведут по периодической схеме в течение 10-20 ч.

Товарные дрожжи получают в три этапа. Сначала размножают первый посевной материал (задаточные дрожжи), затем вторые задаточные дрожжи и из них получают товарные дрожжи. Получение первых задаточных дрожжей идет без притока среды; длительность процесса 6-7 ч. На втором этапе стремятся полностью исключить спиртовое брожение, поэтому дрожжи выращивают в условиях очень интенсивной аэрации, лимитируя концентрацию сахара в среде, по проточному методу культивирования. Чаще всего длительность этого этапа 10 - 12 ч. Последний этап производства товарных дрожжей длится 10 - 24 ч. Биомассу дрожжей отделяют от культуральной жидкости, используя сепарирование, в три этапа, при двукратной промывке суспензии клеток водой для удаления остатков среды, бактерий и примесей. Получают концентрат дрожжей, содержащий 80 - 120 г/л сухой биомассы. Его охлаждают до 8 - 10 °С, фильтруют на вакуум-фильтрах или фильтр-прессах и получают дрожжевую пасту с 70-75%-ной влажностью. После кондиционирования пасты водой до стандартной (75%) влажности, дрожжи фасуют в плитки массой 50, 100, 500, 1000 г и упаковывают. Хранят прессованные дрожжи при температуре 0 - 4 °С до 10 суток. Хлебопекарные дрожжи можно высушивать при температуре 30-40°С до влажности 8% и хранить до 6 мес.

Кормовые дрожжи получают с помощью *Candida* и *Trichosporon*. Выбирая культуру, надо следить, чтобы скорость ее роста в соответствующей среде была максимальной, в состав биомассы входило бы много белков, витаминов, чтобы культура в определенных условиях была вирулентной (могла конкурировать с сопутствующей микрофлорой).

Кормовые дрожжи получают из доступных, дешевых, содержащих углерод видов сырья:

- углеводсодержащее сырье (гидролизаты древесных и сельскохозяйственных отходов, меласса, сульфитный щелок целлюлозной промышленности);
- природные и синтетические субстраты, содержащие органические кислоты, спирты и другие окисленные соединения углерода (отходы спиртовой промышленности – барда, отходы производства синтетических моющих веществ и др.);
- углеводороды (нефть, парафины, природные газы).

При производстве кормового белка не требуется получение жизнеспособной микробной массы, поэтому требования при выделении клеток более просты.

Живая биомасса молочнокислых бактерий, которая широко используется в молочной промышленности, в пищевой промышленности, в сельском хозяйстве и в ветеринарии, называется молочнокислые закваски. Кроме этого, живые клетки микроорганизмов используются для получения бактериальных удобрений, микробных инсектицидов.

5.2. Производство спиртов и полиолов

Производство этанола

Этанол используется как растворитель, экстрагент, антифриз, сырье для химического синтеза, в медицине, служит субстратом для многих красителей, фармацевтических препаратов, смазочных материалов, клеев, моющих средств, пластификаторов, взрывчатых веществ и смол для производства синтетических волокон. Предприняты попытки использовать этанол в качестве автомобильного топлива.

Спиртовое брожение – хорошо изученный биохимический процесс. Спиртовое брожение вызывают чаще всего дрожжи, реже некоторые бактерии (*Sarcina*) и плесневые грибы (*Mucor*). В промышленности дрожжи обычно разделяют на верховые и низовые. Верховые дрожжи интенсивно ведут брожение и труднее осаждаются. К ним принадлежат спиртовые и хлебопекарные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, а также винные дрожжи из вида *Saccharomyces elipsoideus*. К низовым дрожжам относятся виды, используемые в пивоваренной промышленности. В производстве процесс брожения ведут 2 - 3 суток.

В ходе брожения углеводы распадаются в конечном итоге до этилового спирта, углекислого газа и воды. Промежуточный продукт – ацетальдегид. Если к питательной среде добавить сульфиты, которые связывают ацетальдегид, при брожении можно получить значительное количество глицерина, что и применяется в промышленности. В этом случае основной конечный продукт брожения – трехатомный спирт глицерин. В процессе спиртового брожения могут накапливаться изоамиловый, амиловый и изобутиловый спирты (сивушные масла). Некоторые дрожжи и бактерии способны продуцировать бутанол, а также 2,3-бутандиол. Эти продукты обычно синтезируют из нефти, однако микробное получение этанола и других спиртов вызывает все больший интерес.

В России большая часть этанола получается микробиологическим путем из растительного сырья. Сырьем могут быть гидролизаты древесины, меласса, крахмал, молочная сыворотка. Отходы производства этанола – барда и диоксид углерода. Барду используют для откорма скота и птиц, а диоксид углерода – в пищевой промышленности.

При получении спирта из древесины перед гидролизом древесину размельчают до стружек толщиной 3 мм, шириной 10 - 70 мм и длиной 25 мм. Гидролиз идет в больших (до 50 м³) гидролизных аппаратах, которые наполняют стружкой, добавляют 0,5%-ный раствор H₂SO₄ и вводят пар давлением 1-1,2 МПа. Варка идет 40-50 мин. Выход сахара 45 - 48% от сухой массы древесины. Реакция среды полученного гидролизата кислая, pH 1,8-2,2, поэтому гидролизат нейтрализуют известковым молоком, в котором содержится 1,1 - 1,2 кг/л извести; в гидролизате сравнительно мало азота и фосфора, поэтому предварительно к каждому кубическому метру гидролизата добавляют 0,3 кг суперфосфата и 0,15 кг сульфата аммония. При температуре 85°C через гидролизат продувают воздух, pH среды 5-6. Гипс осаждают, а прозрачную часть гидролизата после охлаждения используют для сбраживания.

Спирт получают и из мелассы. Предварительно мелассу разбавляют и добавляют питательные соли. Для приготовления напитков используют спирт, полученный только из пищевого сырья. Для технических нужд используют спирт, полученный из гидролизатов древесины, сульфитного щелока.

Найдены бактерии *Zyotomonas mobilis*, которые вдвое эффективнее сбраживают углеводы в этанол, чем дрожжи.

Производство ацетона и бутанола

Ацетонбутиловое брожение является анаэробным. Возбудители – спорообразующие бактерии *Clostridium acetobutylicum* или близкие к ним виды маслянокислых бактерий. Сырье – зерновые и меласно-зерновые заторы, меласса, крахмал, патока, гидролизаты целлюлозы различного происхождения, сульфитные щелока. В первый период ацетонбутилового брожения образуется уксусная и масляная кислоты, выделяются водород и диоксид углерода. Затем масляная кислота восстанавливается до бутанола. Ацетон об-

разуется из ацетоуксусной кислоты при ее декарбосилировании.

Технология получения ацетона и бутанола из кукурузы. Муку грубого помола смешивают с водой (6-8 кг муки на 100 л воды). Затем затор варят 2 ч под давлением 200 кПа и стерилизуют. Полученную массу охлаждают до 37-42°C, а затем сбрасывают в течение 2 суток при рН среды 5-7. В результате из глюкозы образуется смесь, которая содержит 6 частей бутанола, 1 часть этанола и 3 части ацетона. Их разделяют перегонкой при различных температурах кипения (ацетон – 56,2°C, этанол – 78,4°C, азеотроп бутанола с водой – 93,4°C, чистый бутанол – 117,7°C).

Отходы производства – газообразные водород и диоксид углерода и плотная ацетонбутиловая барда. Газы улавливают и применяют для синтеза аммиака и метанола. Барда содержит значительное количество рибофлавина, поэтому ее используют для получения кормового витамина В₂. Для этого ее десятикратно концентрируют в многоступенчатых вакуум-выпарных аппаратах и высушивают в распылительных сушилках. Получают сухой концентрат, который содержит 60-100 мкг/г рибофлавина. Барду также применяют для выращивания кормовых дрожжей.

Интенсифицировать производство ацетона и бутанола можно следующими путями: ферментация продуцента в биореакторе с псевдооживленным слоем при непрерывной экстракции бутанола из многофазной среды; иммобилизация клеток продуцента на стеклянной поверхности биореактора; биосинтез на основе синтетического газа (смесь H₂ и CO).

Вопросы для самоконтроля

- 1) Перечислите основные типы биопроцессов.
- 2) Какие продукты получают из биомассы промышленных микроорганизмов?
- 3) Технология получения хлебопекарных дрожжей.
- 4) Субстраты для получения белка одноклеточных.
- 5) Сырье для получения кормовых дрожжей.
- 6) Технология производства товарных дрожжей.
- 7) Применение этанола.
- 8) Характеристика спиртового брожения.
- 9) Сырье для производства этанола.
- 10) Отходы производства этанола.
- 11) Технология получения спирта из древесины.
- 12) Характеристика ацетонбутилового брожения, возбудители.
- 13) Технология получения ацетона и бутанола из кукурузы.
- 14) Пути интенсификации производства ацетона и бутанола.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Безбородов, А.М.** Микробиологический синтез / А.М. Безбородов, Г.И. Квеситадзе. – СПб: Проспект Науки, 2011. – 144 с. – ISBN 978-5-903090-52-5
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4

5. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
6. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2

Дополнительная

1. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года / утверждено председателем правительства Российской Федерации В. Путиным 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8. – М., 2012. – 76 с.
2. Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах: учебно-методическое пособие / сост.: Блинов В.А. – Саратов: 410005, Саратов, Пугачевская, 161, офис 320, 2008. – 102 с.
3. Общая и фармацевтическая биотехнология: учебное пособие. – Самара: НОУ ВПО СМИ «РЕАВИЗ», 2012. – 118 с.
4. Рабочие материалы к стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности до 2020 года / Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Союз предприятий биотехнологической отрасли. – М., 2009. – 85 с.
5. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6
6. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Институт биохимии им. Н.А. Баха РАН. – М., 2011. – 323 с.
7. Журналы: Биотехнология, Вестник СГАУ, Прикладная биохимия и микробиология, Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии, Фармацевтическая промышленность, Кондитерское и хлебопекарное производство, Масложировая промышленность, Молочная промышленность, Переработка молока, Мясные технологии, Сыроделие и маслоделие, Пиво и напитки, Пищевая технология.
8. <http://www.biotechnolog.ru>
9. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)
10. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
11. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 6

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ – II

6.1. Производство вторичных метаболитов

Вторичные метаболиты, называемые также **идиолитами**, это низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре. Они производятся ограниченным числом таксономических групп и часто представляют собой смесь близкородственных соединений, относящихся к одной и той же химической группе.

Вторичные метаболиты являются биологически активными веществами: одни из них обладают антимикробной активностью, другие являются специфическими ингибиторами ферментов, третьи – ростовыми факторами, многие обладают фармакологической активностью. Ко вторичным метаболитам относятся антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений и токсины.

Получение такого рода веществ послужило основой для создания целого ряда отраслей микробиологической промышленности. Первым в этом ряду стало производство пенициллина; микробиологический способ получения пенициллина был разработан в 1940-х годах и заложил фундамент современной промышленной биотехнологии.

Молекулы антибиотиков очень разнообразны по составу и механизму действия на микробную клетку. При этом в связи с возникновением устойчивости патогенных микроорганизмов к старым антибиотикам постоянно существует потребность в новых. В некоторых случаях природные микробные антибиотические продукты химическим или энзиматическим путем могут быть превращены в так называемые полусинтетические антибиотики, обладающие более высокими терапевтическими свойствами.

Антибиотики – органические соединения. Они синтезируются живой клеткой и способны в небольших концентрациях замедлить развитие или полностью уничтожить чувствительные к ним виды микроорганизмов. Их продуцируют не только клетки микроорганизмов и растений, но и клетки животных. Антибиотики растительного происхождения называют фитонцидами. Это хлорелин, томатин, сативин, получаемый из чеснока, и алин, выделяемый из лука.

Микроорганизмы, производящие вторичные метаболиты, вначале проходят стадию быстрого роста, тропофазу, во время которой синтез вторичных веществ незначителен. По мере замедления роста из-за истощения одного или нескольких необходимых питательных веществ в культуральной среде микроорганизм переходит в идиофазу; именно в этот период синтезируются идиолиты. Они не играют явной роли в процессах метаболизма, они вырабатываются клетками для адаптации к условиям окружающей среды, например, для защиты. Их синтезируют не все микроорганизмы, а в основном нитчатые бактерии, грибы и спорообразующие бактерии. Таким образом, продуценты первичных и вторичных метаболитов относятся к разным таксономическим группам.

Особенности культурального роста этих микроорганизмов необходимо учитывать при производстве. Например, в случае антибиотиков большинство микроорганизмов в процессе тропофазы чувствительно к собственным антибиотикам, однако во время идиофазы они становятся к ним устойчивыми.

Чтобы уберечь микроорганизмы, продуцирующие антибиотики, от самоуничтожения, важно быстро достичь идиофазы и затем культивировать микроорганизмы в этой фазе. Это достигается путем варьирования режимов культивирования и составом питательной среды на стадиях быстрого и медленного роста.

6.2. Биотрансформация

Микроорганизмы способны осуществлять реакции трансформации (изменение отдельных участков в молекулах органических веществ), превращая те или другие соединения в новые продукты. Условия протекания этих реакций мягкие, и во многих случаях микробиологические трансформации предпочтительнее химических.

Пример существующих крупномасштабных промышленных биоконверсий – производство уксуса из этанола, глюконовой кислоты из глюкозы. Широко используется микробная модификация стероидов, которые являются сложными полициклическими липидами. Теперь с использованием биоконверсии получают кортизон, гидрокортизон, преднизолон и целый ряд других стероидов. Применение и совершенствование микробной технологии в сотни раз снижает себестоимость производства стероидов.

В микробиологической трансформации обычно работает один определенный фермент, катализирующий окисление, декарбоксилирование, метилирование или какую-либо другую реакцию. Чтобы провести трансформацию какого-либо вещества, вначале размножают культуру соответствующего микроорганизма до количества, равного 5-10% объема трансформируемого раствора. Раствор для трансформации вещества готовят, учитывая, что в нем надо растворить максимально возможное количество трансформируемого вещества (обычно 10-25%) и надо использовать минимальное количество необходимых для развития культуры питательных солей, в таком виде, чтобы не было затруднено химическое выделение вещества. Если трансформируемое вещество не растворяется в воде, его предварительно растворяют в нейтральном органическом растворителе и затем, при интенсивном перемешивании, смешивают с основной средой. Трансформацию ведут в стерильных условиях при оптимуме рН, температуры и других условий. Длительность процесса обычно 1-2 суток. После микробиологической трансформации следует химическое выделение вещества из раствора. Процессы микробиологической трансформации органических соединений можно разделить на следующие группы:

- *реакции окисления:* гидроксילирование неактивированного углерода, окисления олефинов, окисление аллильной группы, микробиологическое гидроксילирование ароматического кольца, окисления ароматических соединений с разрывом кольца, β -окисление жирных кислот, дегидрирование, окисление карбинольной группы в карбонильную и карбоксильную, альдегидной в карбоксильную, метильной в карбоксильную, дегидрогенизация циклических спиртов, окисление аминогруппы в нитрогруппу, окисление циклопарафинов до циклокетонов, смешанные типы окисления;

- *реакции восстановления:* восстановление альдегидов до первичных спиртов, восстановление кетонов и дикетонов, гидрирование двойных связей, восстановление нитрогруппы, восстановление первичных и вторичных спиртов, трансформация альдегидов в меркаптосоединения и др.;

- *декарбоксилирование:* декарбоксилирование органических кислот с образованием концевой метильной группы, окислительное декарбоксилирование кетокислот с образованием карбоновых кислот, восстановительное декарбоксилирование кетокислот в спирты, декарбоксилирование аминокислот с образованием аминов и аминокислот, превращение моноаминокислот в спирты и оксикислоты, смешанные типы декарбоксилирования;

- *реакции дезаминирования:* аминокислот в карбоновые кислоты, аминокислот в кето- и оксикислоты, амидов в спирты, окислительное дезаминирование аминов в аль-

дегиды и кетоны, аминов до соответствующих карбоновых кислот и смешанные типы дезаминирования;

- образование гликозидов, например синтез мальтозы из глюкозы дрожжами;
- гидролиз: омыление эфиров, гидролиз гликозидной связи, гидролиз амидов, гидролиз белков и др.;

- реакции метилирования;
- этерификация, в том числе фосфорилирование и ацетилирование;
- дегидратация;
- реакции конденсации;
- аминирование и амидирование;
- реакции диметоксилирования;
- нуклеотизация;
- галогенирование;
- деметилирование;
- ассиметризация;
- рацемизация;
- изомеризация.

Подбор культур микроорганизмов для микробиологической трансформации определенных соединений по заданному типу реакции осуществляется эмпирическим путем.

6.3. Производство ферментов

Получение ферментов с помощью микроорганизмов более выгодно, чем из растительных и животных источников. Микробные клетки продуцируют более 2 тысяч ферментов, катализирующих биохимические реакции, связанные с ростом, дыханием и образованием продуктов. Многие из этих ферментов могут быть выделены и проявляют свою активность независимо от клетки. Для получения ферментных препаратов используют как микроскопические грибы, так и бактерии и дрожжи. Иногда получение технического ферментного препарата кончается проведением процесса ферментации, однако активность ферментов в культуральной жидкости быстро снижается. Поэтому широко практикуют получение сухих технических ферментных препаратов.

Производство ферментов является крупнотоннажным, а производство медицинских (очищенных) ферментов – к тонкому синтезу.

В мире производится около 20 ферментов в объеме 65 тыс. тонн (а существует, как предполагают 25000 ферментов). Например, промышленным способом производят такие ферменты как амилаза, глюкоамилаза, протеаза, инвертаза, пектиназа, каталаза, стрептокиназа, целлюлаза и др.

Амилазы и протеазы используют в текстильной, хлебопекарной и кожевенной промышленности. Пектолитические ферменты могут быть использованы для мацерации тканей при переработке растительного сырья, например, при получении льноволокна. Щелочные протеазы, особенно иммобилизованные, очень эффективно используются в составе моющих средств. Кроме протеолитических ферментов в состав моющих средств вводят липазу, целлюлазу, оксидазу и амилазу для удаления загрязнений крахмального происхождения. Использование иммобилизованной глюкозоизомеразы для непрерывного получения глюкозы является наиболее крупным процессом такого рода в мире.

Микробные ферменты активно используют в клинической диагностике при определении уровня холестерина в крови и мочевой кислоты. Ферменты предлагают исполь-

зовать для очистки канализационных и водопроводных труб и т.д. Ферменты для медицинских или аналитических целей должны быть высокоочищенными.

Технологические процессы производства ферментных препаратов

1) Глубинный метод культивирования продуцентов ферментов в жидкой питательной среде. Проводят в строго асептических условиях:

- получение посевного материала: исходная культура продуцента → маточная культура, выращенная в колбах на качалке → посевная культура, выращенная в инокуляторе → посевная культура, выращенная в посевном аппарате. Объем посевного аппарата – до 10% от объема промышленного ферментатора;
- приготовление питательных сред;
- стерилизация питательных сред с помощью мембран или высоких температур;
- очистка воздуха до и после аэрирования;
- производственное культивирование с учетом увеличения биомассы, накопления ферментов, изменения состава питательной среды, её кислотности, аэрации и т.д.

Этот метод более совершенен, чем поверхностный, т.к. легко поддается механизации и автоматизации, легче и проще осуществляется переход к большим масштабам производства. Концентрация ферментов в среде обычно значительно ниже, чем в водных экстрактах поверхностной культуры.

2) Поверхностный метод культивирования продуцентов ферментов на рыхлой и увлажненной питательной среде. При этом культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды в неасептических условиях.

Недостатки метода: большая поверхность контакта рыхлой среды с воздухом, что снижает интенсивность процесса; большие затраты ручного труда для мойки, стерилизации, перемещения кювет с небольшой высотой слоя, их заполнение и освобождение.

Преимущества метода: конечная концентрация фермента на единицу массы среды более высокая, чем при глубинном методе выращивания; культуры легко выращивать и приводить в товарную форму; снижена потребность в электроэнергии и т.д.

Культура микроорганизмов, выращенная поверхностным методом, и культуральная жидкость после глубинного культивирования содержат большое количество балластных веществ: биомассу продуцента, непотребленные компоненты среды, продукты метаболизма. Доля собственно ферментов для поверхностных культур составляет около 1%, для глубинных – не более 0,1%.

Выделение и очистка ферментов – трудоемкий и дорогой процесс. Некоторые микроорганизмы выделяют ферменты из клеток в окружающую среду (гидролазы, амилазы, протеазы, целлюлазы и др.). Это облегчает их выделение и очистку.

Выделение ферментов из биомассы – сложный процесс. Для превращения растворенного фермента в форму нерастворимых частиц используют высаливание, осаждение путем изменения температуры и рН, осаждение растворителями, при помощи высокомолекулярных полимеров, ионами металлов. Например, для осаждения α -амилазы в биореактор добавляют этанол. Затем осадок уплотняют в фильтр-прессе и сушат в вакуумной сушилке. При этом из 5000 л среды получают 73,5 кг препарата с высокой активностью. Затем его стандартизируют гипсом до получения нужной активности.

Так, в кожевенной и спиртовой промышленности, для введения в корма животных применяют ферментные препараты в неочищенном виде. В пищевой промышленности, в текстильных и микробиологических производствах, в медицине используют только высокоочищенные ферменты. В результате очистки происходит повышение удельной активности препарата.

Технология получения очищенных ферментов включает следующие этапы: экстракция из поверхностной культуры; отделение твердой фазы; концентрирование ферментных растворов; ультрафильтрация; осаждение органическими растворителями; высушивание; сорбционная очистка; сушка; стандартизация ферментных препаратов.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Общие сведения о биотехнологии производства вторичных метаболитов.
- 2) Общие сведения и биотрансформации.
- 3) Типы процессов микробиологической трансформации органических соединений.
- 4) Общие сведения о биотехнологии производства ферментов.
- 5) Глубинный метод культивирования продуцентов ферментов в жидкой питательной среде.
- 6) Поверхностный метод культивирования продуцентов ферментов на рыхлой и увлажненной питательной среде.
- 7) Технология получения очищенных ферментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Безбородов, А.М.** Микробиологический синтез / А.М. Безбородов, Г.И. Квеситадзе. – СПб: Проспект Науки, 2011. – 144 с. – ISBN 978-5-903090-52-5
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
6. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2

Дополнительная

1. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года / утверждено председателем правительства Российской Федерации В. Путиным 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8. – М., 2012. – 76 с.
2. Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах: учебно-методическое пособие / сост.: Блинов В.А. – Саратов: 410005, Саратов, Пугачевская, 161, офис 320, 2008. – 102 с.
3. Общая и фармацевтическая биотехнология: учебное пособие. – Самара: НОУ ВПО СМИ «РЕАВИЗ», 2012. – 118 с.
4. Рабочие материалы к стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности до 2020 года / Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Союз предприятий биотехнологической отрасли. – М., 2009. – 85 с.

5. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6

6. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Институт биохимии им. Н.А. Баха РАН. – М., 2011. – 323 с.

7. Журналы: Биотехнология, Вестник СГАУ, Прикладная биохимия и микробиология, Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии, Фармацевтическая промышленность, Кондитерское и хлебопекарное производство, Масложировая промышленность, Молочная промышленность, Переработка молока, Мясные технологии, Сыроделие и маслоделие, Пиво и напитки, Пищевая технология.

8. <http://www.biotechnolog.ru>

9. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)

10. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)

11. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 7

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ – III

7.1. Производство аминокислот

Производство аминокислот относится к одной из наиболее передовых областей биотехнологии. Аминокислоты получают путем химического синтеза или экстракцией из белковых гидролизатов.

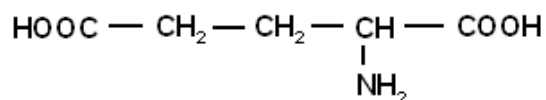
Незаменимые аминокислоты могут получаться микробиологическим путем более эффективно, чем путем химического синтеза, так как при биологическом синтезе используемые микроорганизмы образуют аминокислоты в биологически активной L-форме. Как продуценты лизина изучаются *Brevibacterium lactofermentum* и бактерии рода *Corynebacterium*, также предложены способы биотехнологического получения изолейцина, треонина при использовании *E. coli*. Большинство исследованных штаммов микроорганизмов независимо от их систематического положения преимущественно накапливают L-аланин и глутаминовую кислоту. Значительно меньше штаммов и в меньшем количестве выделяют аспарагиновую кислоту, лейцин, валин, изолейцин, лизин. За рубежом 60% мощностей по производству аминокислот занимают глутаминовая кислота, далее идут метионин, лизин и глицин. Глутаминовая кислота производится при участии в качестве продуцента штамма *Corynebacterium*.

Способы получения аминокислот:

1. *Одноступенчатый* – при этом мутантный полиауксотрофный штамм-продуцент аминокислоты культивируют на оптимальной для биосинтеза среде. Целевой продукт накапливается в культуральной жидкости, из которой его выделяют.

2. *Двухступенчатый* – при этом на первой ступени микроб-продуцент аминокислоты культивируют в жидкой питательной среде. Там происходит биосинтез предшественников аминокислоты (заготовка) и ферментов, которые катализируют образование целевого продукта. На второй ступени целевой продукт (аминокислота) синтезируется с помощью этих ферментов.

Микробиологическое производство L-глутаминовой кислоты



Это заменимая аминокислота, но на её основе синтезируются многие БАВ, которые необходимы для нормальной жизнедеятельности человека. Глутамат натрия применяется как добавка к пище для улучшения её вкусовых качеств. В медицине глутаминовая кислота используется при лечении заболеваний, связанных с отравлением печени и почек.

В наибольших количествах микробиологическим путем получают глутаминовую кислоту с помощью ауксотрофных мутантов рода *Corynebacterium* и др. Известны методы получения глутамата на этанольных средах (до 60 г/л) и на ацетате (до 98 г/л).

В основе сверхсинтеза глутаминовой кислоты из глюкозы у этих бактерий лежат два биохимических принципа: недостаток α -кетоглутаратдегидрогеназы (включает предшественник глутаминовой кислоты в цикл трикарбоновых кислот); блокировка

биосинтеза биотина – при этом нарушается нормальный синтез фосфолипидов мембраны и она становится более проницаемой для глутамата.

Технология получения L-глутаминовой кислоты

Одноступенчатый способ. Посевной материал получают в строго асептических условиях в течение суток.

Состав питательной среды для промышленных штаммов *Corynebacterium glutamicum* при производстве посевного материала (в %): меласса – 8, кукурузный экстракт – 0,3, хлорид аммония – 0,5, фосфат калия двухзамещенный – 0,05, сульфат магния – 0,03, вода – до 100%; pH среды 7,0-7,2.

Накопление биомассы производят в аэробных условиях сначала в инокуляторах объемом 2 м³, потом в посевных аппаратах объемом 5 м³ (до 6-8 г АСВ/л).

На стадии биосинтеза в питательную среду вводят до 2% мочевины, до 1% мела и до 0,1% синтетического пеногасителя; содержание мелассы увеличивают до 20%.

Биосинтез осуществляют в строго асептических условиях в ферментаторах объемом 50 м³ с коэффициентом заполнения аппарата 0,7 в течение 48-52 ч и интенсивной аэрации.

Температура культивирования на всех стадиях – 28-30°C. В конце процесса культуральная жидкость содержит до 45 г/л глутаминовой кислоты. Выход её по отношению к потребленным сахарам составляет 45-50%.

Для получения глутаминовой кислоты в качестве пищевой добавки или в виде лекарственных форм технологическую схему добавляют следующими этапами:

- *Предварительная обработка культуральной жидкости* – добавление негашеной извести или известкового молока, последующее осаждение ионов кальция фосфорной кислотой. Осадок способствует лучшему отделению клеток продуцента и других балластных примесей.

- *Отделение осадка* – центрифугирование, фильтрация под давлением.

- *Осветление фильтрата* – активированный уголь, ионнообменная сорбция на анионите).

- *Концентрирование осветленного раствора* – вакуум-выпаривание при 40-60 °С. При этом из исходного раствора отгоняется 50-80 % воды.

- *Осаждение кристаллов глутаминовой кислоты в изоэлектрической точке* (pH 3,2) – подкисление концентрата соляной кислотой и охлаждение раствора до 4-15 °С. Многократная перекристаллизация позволяет увеличить чистоту кристаллов до 99,6%.

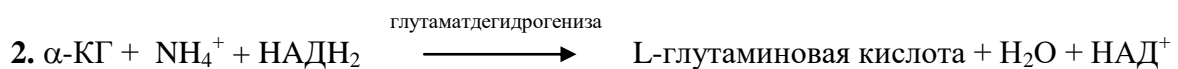
- *Отделение кристаллов глутаминовой кислоты от маточника* – центрифугирование, декантация и возврат маточника на стадию вакуум-выпаривания. Затем кристаллы промывают обессоленной водой.

- *Сушка* – в вакууме или в токе нагретого воздуха при 60-70 °С.

- *Получение глутамата натрия* – влажные кристаллы неперекристаллизованной глутаминовой кислоты обрабатывают гидроксидом натрия с последующими этапами согласно НТД. Глутамат натрия пищевой должен иметь следующий состав (в %): основное вещество – не менее 94, хлорид натрия – не более 5, влага – не более 1, общий азот – не менее 7,02.

Двухступенчатый способ. Для этого используют два варианта:

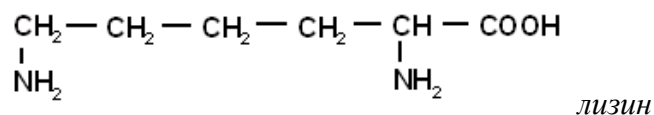




Продуценты – *Pseudomonas, Escherichia, Kluyverd citrophila u Candida*. Продуценты ферментов – различные микроорганизмы, например, *E. coli*. Доноры аминогрупп – аспарагиновая кислота или аланин.

Завершающие стадии процесса производства аминокислот – фасовка в полиэтиленовые мешки, упаковка и складирование готового продукта.

Технология получения L-лизина и кормовых препаратов на его основе – принципиально аналогичная. Лизин в организме человека и животных определяет биологическую ценность поступающего белка, способствует секреции пищеварительных ферментов и транспорту кальция в клетки, улучшает азотистый баланс.



Практически весь производимый лизин расходуется на обогащение кормов сельскохозяйственных животных и птицы: жидкий концентрат лизина, кормовой концентрат лизина, высококонцентрированные кормовые препараты лизина.

Технология производства L-аспарагиновой кислоты (сырье – фумаровая кислота и аммиак):

- выращивание клеток методом глубинной ферментации и их выделение центрифугированием;
- иммобилизация бактериальных клеток (биокатализаторов), которые обладают аспартазной активностью и катализируют присоединение аммиака по двойной связи фумаровой кислоты, в геле в виде гранул размером 2-3 мм. Время полуинактивации таких клеток составляет 4 мес.;
- биотрансформация фумарата аммония в колонке с катализатором в проточном режиме и получение L- аспарагиновой кислоты;
- кристаллизация, центрифугирование и промывка кристаллов.

7.2. Производство органических кислот

Органические кислоты используются в пищевой, химической, фармацевтической, лёгкой промышленности, в быту. Все органические кислоты являются промежуточными или конечными продуктами катаболизма углеводов.

С помощью микроорганизмов можно получить до 60 органических кислот. Многие из них получают в промышленном масштабе – итаконовая, молочная, уксусная, лимонная, яблочная, янтарная. Эти пищевые кислоты используются как регуляторы кислотности и консерванты. Лимонную кислоту получают с помощью *Yarrowia lipolytica, Aspergillus niger*, молочную – *Endomycopsis fibuligera, Rhisopus oryzae, Lactobacillus casei*, янтарную – *Anaerobiospirillum succiniproducens*. Уксусную кислоту получают путем микробиологической конверсии водорода и углекислого газа бактериями *Acetobacterium woodi* и *Clostridium aceticum*.

Микробиологические процессы получения органических кислот делят на две группы:

анаэробные – реализуют как глубинным, так и поверхностным методами ферментации (молочная, пропионовая); аэробные – реализуют глубинными методами ферментации (уксусная, лимонная, итаконовая, глюконовая).

Получение молочной кислоты

Молочная кислота (лактат) используется в качестве подкислителя при производстве джемов, желе, кондитерских изделий, наливок, экстрактов, при консервировании овощей, для регулирования pH пивного суслу, в кожевенной, текстильной, фармацевтической промышленности, при производстве растворителей, пластификаторов, лаков, олиф, моющих средств, при отделке натуральных тканей.

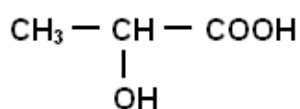
Продуценты молочной кислоты – молочнокислые бактерии 4 родов: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pedococcus*. Род *Lactobacillus* включает три подрода: *Thermobacterium* – не растут при 15°C, но выдерживают температуры выше 50°C; *Streptobacterium* – не являются термофильными; *Betabacterium* – образуют D,L-молочную кислоту из глюкозы.

Различают: *гомоферментативные молочнокислые бактерии* – образуют из гексоз преимущественно молочную кислоту (термо- и стрептобактерии, стрептококки и педикокки); *гетероферментативные молочнокислые бактерии* – наряду с молочной кислотой образуют уксусную кислоту, диоксид углерода и этанол (бетабактерии и лейконостоки).

Субстрат для молочнокислых бактерий – мальтоза, лактоза, глюкоза, осахаренный крахмал и др. Среда должна также содержать витамины группы В, аминокислоты, пурины, пиримидины, органические кислоты и др.

В промышленном производстве, как правило, используют термофильные гомоферментативные виды (например, *Lactobacillus delbrueckii* штамм Л-3, у которого выход молочной кислоты составляет 95-98% от потребленной сахарозы).

Технологическая схема получения L(+)-молочной кислоты



Lactobacillus delbrueckii засевают на меласную среду, которая содержит 5-20% сахара, вытяжку солодовых ростков, дрожжевой экстракт, витамины, фосфат аммония. Брожение протекает при 49-50°C при pH 6,3-6,5. По мере образования молочной кислоты среду периодически нейтрализуют мелом. Процесс завершается за 5-10 дней; при этом в культуральной жидкости содержится 11-14 % лактата кальция и 0,1-1,5 % сахарозы.

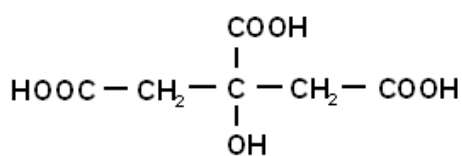
Клетки бактерий и мел отделяют фильтрованием (отход), фильтрат упаривают до концентрации 30%, охлаждают до 25°C, кристаллизуют (1,5-2 суток).

Кристаллы лактата кальция обрабатывают серной кислотой при 60-70°C. При этом гипс выпадает в осадок. К надосадочной жидкости добавляют желтую кровяную соль при 65°C для удаления ионов железа, а затем сульфат натрия для освобождения от тяжелых металлов. Красящие вещества удаляют с помощью активированного угля. Затем раствор молочной кислоты подвергают вакуум-упариванию до 50% или 80%. Такую молочную кислоту используют для технических целей. Более очищенную молочную

кислоту получают при перегонке ее сложных метильных эфиров, при экстракции простым изопропиловым эфиром в противоточных насадочных колоннах.

Известна технология получения молочной кислоты с помощью клеток *Streptococcus thermophilus*, которые адгезированы на микросферах из активированного угля и помещены в биореактор, который работает по принципу "кипящего" или псевдооживленного слоя, через который перемещаются микросферы. В нижней части они сорбируют субстрат, а в верхней части – молочную кислоту. Среда содержит глюкозу, дрожжевой экстракт, ацетат натрия, двузамещенный цитрат аммония, двузамещенный фосфат калия, сульфаты магния и марганца. Продуктивность системы – 12 г/(л·ч) молочной кислоты.

Получение лимонной кислоты



Лимонная кислота усиливает деятельность поджелудочной железы, возбуждает аппетит и стимулирует усвоение пищи. Ее используют в кулинарии, в виноделии, для рафинирования растительных масел, при производстве безалкогольных напитков, мармелада, вафель, пастилы, некоторых сортов колбас и сыра, сгущенного молока, шампуней и моющих средств. Мицелий продуцента лимонной кислоты используют для выделения фермента пектиназы, флавинов или высушивают и скармливают скоту и домашней птице.

Раньше лимонную кислоту получали из цитрусовых растений. В настоящее время разработаны поверхностные и глубинные методы культивирования микробов-продуцентов (*Aspergillus niger* и *Candida lipolytica*). Сырье для производства лимонной кислоты – меласса и n-алканы.

Споры (конидии) гриба *Aspergillus niger* получают в отдельном цехе. Сначала продуцент выращивают на скошенной агаризованной среде в пробирках. Затем его размножают на плотной или жидкой среде в колбах Эрленмейера или в алюминиевых кюветах площадью 8,5-12 дм² и с высотой бортиков от 7-20 см. Продолжительность каждой стадии 2-4 суток при 32°C. При образовании и созревании конидий бесцветный мицелий становится черным. Конидии собирают аспирацией вакуумным насосом, подсушивают в термокамере при 28-30°C, смешивают со стерильным активированным углем (1:2), фасуют в стерильные флаконы и хранят 1,5-2 года.

Способы производства лимонной кислоты:

1. Поверхностный способ жидкофазной ферментации. Осуществляют в «бродильных камерах», в которых на стеллажи помещают 8-10 кювет одну над другой. На дне каждой кюветы имеется сливной штуцер. Камеры оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией, температура в них 34-36°C, высота питающего слоя жидкой мелассной среды 6-12 см, исходная концентрация сахара – в среднем 12%. В течение первых суток рН от 6,8-7,0 снижается до 4,5, а к 8-9 суткам – до 3,0. В таких условиях максимальное кислотообразование происходит на 5-6 сутки. Обычно через 6-7 суток от начала ферментации доливают стерильный раствор мелассы без питательных солей. Таким образом ферментацию продлевают до 12 суток.

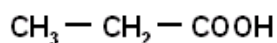
В культуральной жидкости содержится лимонная (80-90%), глюконовая, щавелевая кислоты и неиспользованный сахар. Для выделения лимонной кислоты культуральную жидкость нагревают до 100°C, затем добавляют известковое молоко (Ca(OH)₂) или мел

(CaCO₃), pH доводят до 6,8-7,0. Трехзамещенный кальция цитрат в горячей воде хуже растворяется, чем в холодной, и выпадает в осадок вместе с оксалатом кальция. Осадок отфильтровывают, промывают горячей водой и гидролизуют серной кислотой. При этом свободная лимонная кислота остается в растворе. Этот раствор очищают, подвергают вакуум-упариванию и кристаллизуют. Кристаллы кислоты высушивают и фасуют.

2. Твердофазная ферментация. Ферментацию штамма *A. niger* проводят на увлажненных отрубях риса или пшеницы, находящихся в кюветах. Условия такие же, как и в предыдущем способе. После завершения культивирования отруби экстрагируют водой, в которую переходят кислоты. Выделение цитрата кальция и чистой лимонной кислоты, как и в предыдущем способе.

3. Глубинный способ. Экономически выгоден при производственной мощности завода свыше 2,5 тыс. т кислоты в год. Используют специальные культуры *A. niger*. Сначала выращивают конидии. Затем инокулят подращивают в инокуляторе и в посевном аппарате на среде с 3-4 % сахара. Через 24-36 часов инокулюм передают в основной ферментатор. Процесс ведут 5-7-10 суток с трехразовым доливом раствора мелассы, до конечной концентрации сахара 12-15%. После окончания ферментации мицелий гриба отфильтровывают, а культуральную жидкость подвергают дальнейшей обработке.

Получение уксусной кислоты



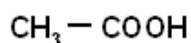
Уксуснокислое брожение вызывают *Acetobacter oxidans*, *A. aceti*, *A. xylinum* и др. Для того, чтобы развилось уксуснокислое брожение, сахар субстрата сначала должен превратиться в этиловый спирт, т.е. уксуснокислому брожению предшествует спиртовое. Спиртовое брожение лучше всего осуществляют селекционированные штаммы винных дрожжей (*Saccharomyces ellipsoideus*). Они образуют также и побочные продукты обмена, которые улучшают вкус и аромат уксуса (сложные эфиры, высшие спирты, органические кислоты). В зависимости от сбраживаемого субстрата различают уксус яблочный, виноградный, грушевый и другие сорта уксуса.

Уксуснокислые бактерии можно иммобилизовать на древесной стружке, древесном угле, коксе и т.д. Раствор этанола пропускают через такие генераторы и получают 10-15% раствор уксусной кислоты. Так, из 100 л этанола получают 90 л уксусной кислоты.

Уксусную кислоту используют для производства ацетона, ацетиленов, синтетических красителей, медицинских препаратов (аспирин, антипирин, фенацетин), ароматизирующих веществ (кумарин, ванилин), в качестве субстрата для микробиологической биотрансформации, в пищевой промышленности.

Продуцент уксусной кислоты рода *Acetobacter* развивается на поверхности среды, образует слизистую пленку, которая состоит из целлюлозы (90%) и клеток бактерий. Эту пленку снимают, высушивают, обрабатывают и получают биофильмы медицинского назначения, которые способствуют заживлению ожоговых ран.

Получение пропионовой кислоты



Продуценты – пропионовые бактерии семейства *Propionibacteriaceae*. Это грамположительные, бесспорные, неподвижные палочки. Для производства пропионовой кислоты используют *B. freudenreichii* и *Propionibacterium acidipropionici*, а для получения

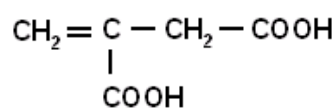
витамина В₁₂ – *Propionibacterium freudenreichii* и *Propionibacterium acne*. Источник углерода для пропионовых бактерий – глюкоза.

Биосинтез кислоты проводят на простых средах, например, (в %) углеводов – 1-2, аммония сульфат – 0,3, гидрофосфат калия – 0,2, кобальта хлорид – 0,0001, биотин – 0,00001, пантотенат – 0,1, тиамин – 0,01. Также клетки продуцента иммобилизуют в геле (ПААГ).

Конечные продукты ферментации – пропионат и ацетат. Обычно их не разделяют, так как обе кислоты обладают консервирующими свойствами. Отделенные клетки используют для получения СОД, каталазы, пероксидазы и витамина В₁₂. Высушенный экстракт в виде порошка используют в пищевой промышленности как антиоксидант и витаминизированный препарат.

Получение глюконовой кислоты

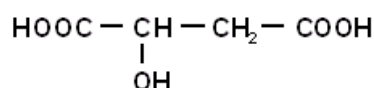
Продуцент – штаммы *Aspergillus niger*. Их культивируют в ферментаторах при интенсивной аэрации и перемешивании, при 30°C и при рН среды 6,0-7,0. Аппаратурное оформление процесса близко к производству лимонной кислоты глубинным методом. Селекционированный штамм *A. niger* продуцирует почти одну глюконовую кислоту, поэтому для ее выделения культуральную жидкость отфильтровывают от мицелия, упаривают и высушивают.



Мицелий гриба используют для выделения глюкозооксидазы, которая применяется в пищевой и фармацевтической промышленности. Глюконат кальция ускоряет свертывание крови. Глюконат натрия используется при производстве моющих средств. Глюконовую кислоту применяют в фотографии, литографии, при изготовлении красок, для очистки металлов и т.д.

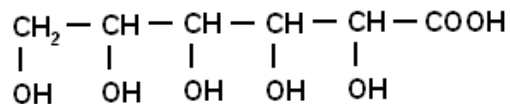
Получение итаконовой кислоты

Продуцент – *Aspergillus itaconicus* и *A. terreus*. Технология получения сходна с процессом получения лимонной кислоты. Так, ферментацию продуцента осуществляют поверхностным или глубинным методом. Итаконовую кислоту применяют в химическом синтезе высококачественных смол, волокон типа нитрон, детергентов, лекарственных веществ, красителей и др.



Получение яблочной кислоты

Яблочная кислота применяется в органическом синтезе (синтез урацила). Ее получают двумя путями:



1. *Химический синтез* – из малеиновой кислоты, в результате образуется рацемическая смесь D,L-яблочной кислоты.

2. *Микробиологический синтез* – из фумаровой кислоты при помощи иммобилизованной фумаразы, которая присоединяет воду с образованием L-яблочной кислоты. Для этого требуются клетки, содержащие фумаразу, которые можно иммобилизовать на геле каррагинана – полисахарида морских водорослей. Гранулы иммобилизованных клеток загружают в колонну, через которую пропускают раствор фумаровой кислоты. На

выходе из колонны получают раствор L-яблочной кислоты. Период инактивации такой колонны – 160 суток.

7.3. Производство витаминов

Микроорганизмы содержат много витаминов, которые чаще всего входят в состав ферментов. Состав и количество витаминов в биомассе зависят от биологических свойств данной культуры микроорганизмов и условий культивирования. Некоторые витамины микроорганизмы синтезируют, другие напротив усваивают в готовом виде из окружающей среды. Культура, способная синтезировать какой-либо витамин, называется автотрофной по отношению к нему, если культура не способна синтезировать данный витамин, она является авто-гетеротрофной.

Витамины синтезируют в основном химическим путем или получают из естественных источников. Однако эргостерин, рибофлавин (В₂), витамин В₁₂ и аскорбиновую кислоту (микроорганизмы используются как селективные окислители сорбита в сорбозу при производстве витамина С) получают микробиологическим путем. Для синтеза витаминов В₁, В₂, В₆, В₁₂ и аскорбиновой кислоты также используют кефирные грибки, а бифидобактерии – группы В, РР (никотиновая кислота) и Н, однако пока эти микроорганизмы не используются как продуценты витаминов в промышленных масштабах.

Изменяя условия среды, содержание отдельных витаминов можно увеличить. Так, количество рибофлавина зависит от интенсивности аэрации и содержания железа в среде. Количество витаминов в клетках, а также их выделение из последних можно изменить при помощи микроэлементов. Существует производство рибофлавина на основе использования дрожжеподобных грибов *Eremothecium ashbyii* и *Ashbia gossypii*. Рибофлавин продуцируется также видами *Clostridium* и *Ascomycetes*. Микроводоросль *Dunaliella viridis* культивируется с целью получения β-каротина.

Получение каротиноидов (предшественников витамина А)

Синтезируются пигментными микроорганизмами из рода *Fusarium*, *Pseudomonas*, *Sarcina* и др. Всего известно около 500 каротиноидов, которые продуцируются бактериями, дрожжами и мицелиальными грибами. Они находятся в клеточной мембране микроорганизмов в виде сложных эфиров и гликозидов или в свободном состоянии – в липидных гранулах цитоплазмы.

Питательные среды для культивирования каротиноидов сложные, они должны включать источники углерода, азота, витаминов, микроэлементов, стимуляторов (гидрол, кукурузно-соевая мука, растительные масла, керосин, изопреновые димеры и др.).

Биосинтезу каротиноидов способствует свет; можно получать до 3-4 г каротина на 1 л среды. Сначала штаммы выращивают отдельно, а затем совместно при 26°C и усиленной аэрации, затем их переносят в основной ферментатор на 6-7 дней. Каротиноиды извлекают растворителями. Затем при гидролизе β-каротина получают витамин А₁.

Получение витамина D

В его основе лежит скелет эргостерин, который находится в клеточных мембранах эукариот. Так, пекарские или пивные дрожжи содержат его 0,2-11%. Под влиянием УФО эргостерин трансформируется в витамин D₂, который легко переходит в D₃. Про-

дуцентами эргостерина также являются аспергиллы и пенициллы. В них содержится 1,2-2,2% эргостерина.

В производственных условиях эргостерина получают по следующей схеме: размножение исходной культуры и накопление инокулюма; ферментация; сепарирование клеток; облучение клеток ультрафиолетовыми лучами; высушивание и упаковка целевого продукта.

Для получения кристаллического витамина D₂ клетки продуцента гидролизуют соляной кислотой при 110°C, затем температуру снижают до 75-78°C и добавляют этанол. Смесь фильтруют, оставшуюся после фильтрации массу промывают водой, высушивают, измельчают, нагревают до 78°C и дважды обрабатывают тройным объемом этанола. Спиртовые экстракты объединяют и упаривают до 70%-го содержания сухих веществ. Такой «липидный концентрат» обрабатывают раствором едкого натра.

Затем эргостерин кристаллизуется. Его очищают повторными перекристаллизациями. Кристаллы высушивают, растворяют в серном эфире, облучают ультрафиолетовыми лучами, эфир отгоняют, раствор витамина D₂ концентрируют и кристаллизуют. «Кислотный фильтрат» упаривают до 50%-го содержания сухих веществ. Производят также масляный концентрат витамина D₂.

Получение витамина В₂ (рибофлавина)

Продуцируется бактериями, дрожжами и нитчатými грибами. В настоящее время получают до 0,5 г и более рибофлавина в 1 л среды.

В качестве источников углерода применяют глюкозу и сахарозу, дрожжевой и кукурузный экстракт, соевую муку, масла и др. Например, для получения посевного материала в среду вводят сахарозу, пептон, кукурузный экстракт, калий дигидрофосфат, магния сульфат, подсолнечное масло. На ней продуцент выращивают 2 суток при температуре 27-30°C. Чаще ферментацию проводят в течение 5 суток при pH 5,5-7,7. Полученную биомассу высушивают до статочной влажности 8%. В ней содержится 1,5-2,5% рибофлавина, 20% белка, тиамин, никотиновая кислота, пиридоксин, цианкобаламин, микроэлементы др. Эту биомассу используют для кормления животных. Если продукция рибофлавина высокая, то витамин В₂ выделяют отдельно и вместе с синтетическим витамином, используют в медицине.

Получение витамина С

Его синтезируют все растения и животные, кроме обезьян и морских свинок, а также человека. Микроорганизмы витамин С не синтезируют и в нем не нуждаются.

Аскорбиновую кислоту получают химико-ферментативным способом.

Так, некоторые виды уксуснокислых бактерий образуют полупродукт аскорбиновой кислоты – L-сорбозу. Эта стадия процесса катализируется мембраносвязанной полиолдегидрогеназой. Затем проводят химическую стадию. В результате получается 2-кетогулоновая кислота. Ее подвергают энолизации и трансформируют в L-аскорбиновую кислоту.

L-сорбозу также получают ферментацией *Gluconobacter oxydans* на средах, содержащих сорбат, кукурузный или дрожжевой экстракт при интенсивной аэрации. Выход L-сорбозы составляет 98% за 2 суток. Культивирование проводят в периодическом или непрерывном режиме. Аскорбиновую кислоту используют как антиоксидант в здравоохранении и пищевой промышленности.

Получение витамина В₁₂ (цианкобаламина)

Получают только микробиологическим синтезом. Его продуцируют пропионовые бактерии – *Propionibacterium var. Shermanii*. Культивирование ведут в периодическом режиме 6 суток без доступа кислорода. Среда содержит глюкозу, кукурузный экстракт, соли аммония и кобальта, рН≈7,0. Через 3 суток в среду добавляют предшественник витамина В₁₂ – 5,6-диметилбензимидазол.

Для выделения витамина В₁₂ из клеток используют: сепарирование клеток; экстрагирование водой. Экстракция длится один час, затем водный раствор охлаждают, нейтрализуют раствором едкого натра, добавляют коагулянты белка (хлорид железа, сульфат аммония), фильтруют. Фильтрат упаривают и очищают ионным обменом и хроматографией. Затем витамин кристаллизуют с использованием резорцина или фенола.

На ацетобутиловой и спиртовой бардах с добавлением кобальта и метанола получают кормовой препарат, который содержит витамин В₁₂ и другие ростовые факторы. Здесь биообъектом является смешанная культура метаногенных бактерий.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Общие сведения о производстве аминокислот.
- 2) Способы получения аминокислот.
- 3) Микробиологическое производство L-глутаминовой кислоты.
- 4) Одноступенчатый способ получения L-глутаминовой кислоты.
- 5) Двухступенчатый способ получения L-глутаминовой кислоты.
- 6) Технология получения L-лизина и кормовых препаратов на его основе.
- 7) Технология производства L-аспарагиновой кислоты.
- 8) Технологическая схема получения L(+)-молочной кислоты.
- 9) Продуценты молочной кислоты.
- 10) Субстрат для молочнокислых бактерий.
- 11) Типы микробиологических процессов получения органических кислот.
- 12) Способы производства лимонной кислоты.
- 13) Получение уксусной кислоты.
- 14) Получение пропионовой кислоты.
- 15) Получение глюконовой кислоты.
- 16) Получение итаконовой кислоты.
- 17) Получение яблочной кислоты.
- 18) Получение каротиноидов (предшественников витамина А).
- 19) Получение витамина D.
- 20) Получение витамина В₂ (рибофлавина).
- 21) Получение витамина С.
- 22) Получение витамина В₁₂ (цианкобаламина).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Безбородов, А.М.** Микробиологический синтез / А.М. Безбородов, Г.И. Квеситадзе. – СПб: Проспект Науки, 2011. – 144 с. – ISBN 978-5-903090-52-5
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
6. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2

Дополнительная

1. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года / утверждено председателем правительства Российской Федерации В. Путиным 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8. – М., 2012. – 76 с.
2. Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах: учебно-методическое пособие / сост.: Блинов В.А. – Саратов: 410005, Саратов, Пугачевская, 161, офис 320, 2008. – 102 с.
3. Общая и фармацевтическая биотехнология: учебное пособие. – Самара: НОУ ВПО СМИ «РЕАВИЗ», 2012. – 118 с.
4. Рабочие материалы к стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности до 2020 года / Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Союз предприятий биотехнологической отрасли. – М., 2009. – 85 с.
5. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6
6. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Институт биохимии им. Н.А. Баха РАН. – М., 2011. – 323 с.
7. Журналы: Биотехнология, Вестник СГАУ, Прикладная биохимия и микробиология, Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии, Фармацевтическая промышленность, Кондитерское и хлебопекарное производство, Масложировая промышленность, Молочная промышленность, Переработка молока, Мясные технологии, Сыроделие и маслоделие, Пиво и напитки, Пищевая технология.
8. <http://www.biotechnolog.ru>
9. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)
10. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
11. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 8

КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

8.1. Скорость роста биомассы и время генерации

Скорость роста биомассы – важный показатель процесса ферментации. Вид кривой роста очень похож для различных микроорганизмов, однако время ферментации существенно различается. Для быстрорастущих бактерий весь цикл может закончиться за несколько часов, а для мицелиальных микроорганизмов или изолированных клеток растений время составляет недели и месяцы.

Для описания скорости роста используется *общая скорость роста* Q_X :

$$Q_X = \frac{dX}{dt}$$

Этот показатель не вполне отражает физиологическое состояние биомассы в процессе его роста. На рис. 8.1 представлены два процесса, протекающие с одинаковой общей скоростью роста биомассы.

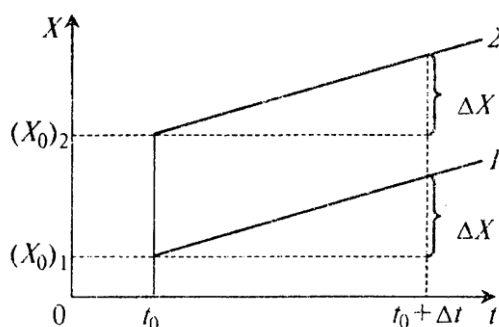


Рис. 8.1. Сравнение двух процессов ферментации (1 и 2) с одинаковой общей скоростью роста биомассы

В первом процессе исходная концентрация биомассы меньше, во втором – больше. Поэтому хотя абсолютный прирост биомассы ΔX за одинаковое время Δt такой же, относительный прирост $\Delta X/X_0$ различается существенно: в первом случае количество биомассы возрастает в несколько раз по отношению к начальному, а во втором – по отношению к начальной биомассе рост составляет всего 20 - 30 %. Ясно, что биомасса «работает» в этих двух процессах по-разному, хотя и «выдает» одинаковое количество продукции за то же время.

Большой интерес для характеристики интенсивности роста представляет *удельная скорость роста* в пересчете на единицу биомассы (так как рост биомассы пропорционален концентрации клеток) μ :

$$\mu = \frac{Q_X}{X} = \frac{dX}{X dt}$$

Величина μ в ходе обычного периодического процесса изменяется (рис. 8.2).

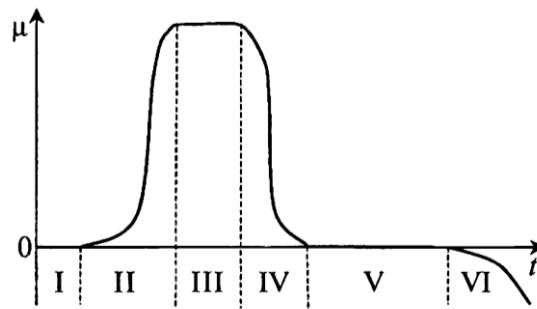


Рис. 8.2. Изменение удельной скорости роста биомассы во времени в периодическом процессе ферментации: I – лаг-фаза; II – фаза ускорения роста; III – фаза экспоненциального роста; IV – фаза замедления роста; V – стационарная фаза; VI – фаза отмирания.

В экспоненциальной фазе, когда рост ничем не лимитирован, величина μ постоянна, а рост биомассы описывается уравнением:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X.$$

Если бы процесс с самого начала определялся этой зависимостью, то концентрация биомассы изменялась бы начиная с X_0 по уравнению:

$$X = X_0 e^{\mu t}.$$

Прологарифмировав обе части уравнения, получаем:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t.$$

Это уравнение показывает, почему для экспоненциальной фазы в логарифмических координатах график будет прямолинейным, причем тангенс угла наклона пропорционален μ (рис. 8.3).

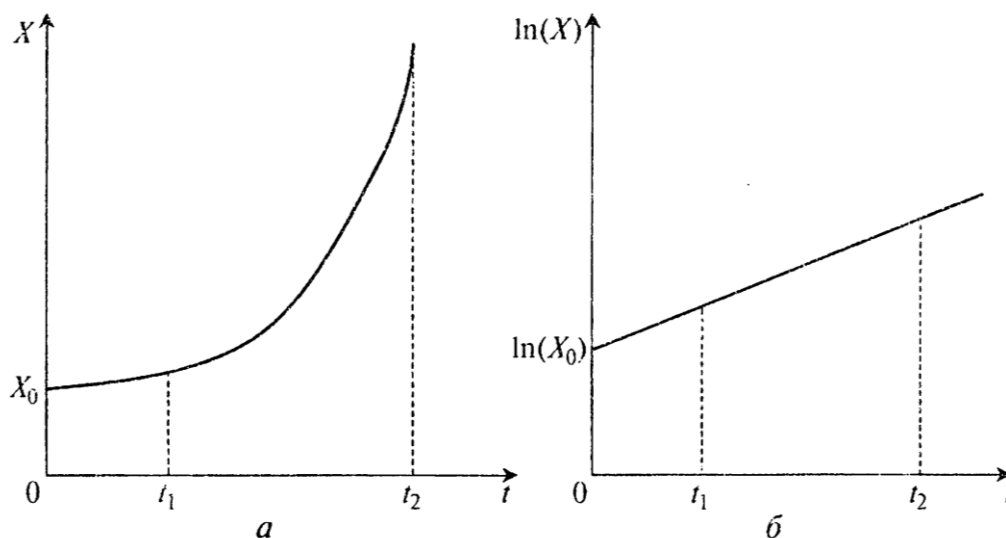


Рис. 8.3. Экспоненциальный рост биомассы во времени, представленный в обычной (а) и полулогарифмической (б) системе координат; тангенс угла наклона прямой равен μ

Таким образом, по двум точкам на линейном участке полулогарифмического графика можно определить μ по формуле:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_1 - t_2}.$$

Микробиологи предпочитают другой параметр – **время генерации g** – время, за которое биомасса культуры удваивается. Легко найти связь между величиной μ и g . Как видно из уравнения

$$\text{при } t = 0 \quad X = X_0;$$

$$\text{при } t = g \quad X = 2X_0.$$

Тогда

$$2X_0 = X_0 e^{\mu g}.$$

$$e^{\mu g} = 2;$$

$$\mu g = \ln 2;$$

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,69}{\mu}.$$

Удельную скорость роста μ иногда называют «коэффициент скорости роста». Это не совсем правильно. Слово «коэффициент» неявно подразумевает, что это некая постоянная величина, которая не изменяется со временем. На самом деле величина μ в ходе периодического процесса изменяется, и можно построить кривую этого изменения (рис. 8.3). Это не коэффициент, а параметр – такой же, как X , S , P .

Из рис. 8.3 следует, что в фазе отмирания удельная скорость роста приобретает отрицательное значение.

Размерность величины μ – [ч^{-1}] или [мин^{-1}], но лучше первое, так как микробиологические процессы протекают не так быстро.

Удельная скорость роста для различных видов микроорганизмов имеет разные значения. Для многих бактерий она велика и может достигать 0,5 и даже 1,0 ч^{-1} . Для грибов и актиномицетов скорость роста не выходит за пределы 0,1 ч^{-1} , а для микроводорослей, а также растительных и животных клеток находится на уровне 0,01 ч^{-1} .

8.2. Общая продуктивность процесса

Общую продуктивность процесса (P_{ap}) в биореакторе определяют количеством целевого продукта в ЕД активности или в кг, получаемого с 1 м^3 ферментационной емкости в час. Расчет в преобразованном виде проводят отдельно для периодического и непрерывного процесса.

$$\text{Периодический процесс} - P_{ap} = \frac{V_{cf} \cdot C}{V_f \cdot t_c}$$

$$\text{Непрерывный процесс} - P_{ap} = \frac{W_{cf} \cdot C}{V_f},$$

где V_{cf} (м^3) – объем культуральной жидкости за весь процесс ферментации;
 C ($\text{кг}/\text{м}^3$) - концентрация целевого продукта в культуральной жидкости;
 W_{cf} ($\text{м}^3/\text{ч}$) - скорость слива культуральной жидкости из ферментатора;
 t_c (ч) – время цикла работы ферментатора.

8.3. Скорость потребления субстрата

Поскольку субстрат потребляется, его концентрация S с течением времени падает, и, в конце концов, недостаток субстрата начинает тормозить дальнейший рост клеток микроорганизмов (рис. 7.5).

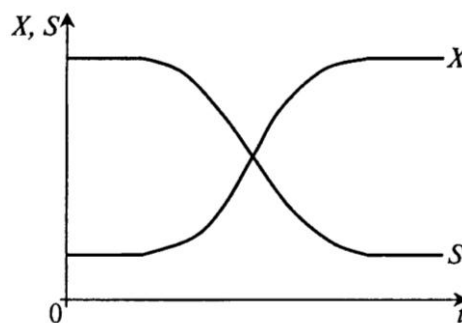


Рис. 7.5. Типичная взаимозависимость изменения во времени концентраций биомассы и субстрата

Общая скорость потребления субстрата Q_S :

$$Q_S = - \frac{dS}{dt}.$$

Знак (–) обозначает, что скорость потребления положительна, когда концентрация субстрата в среде падает (т.е. скорость изменения концентрации отрицательна).

Удельная скорость потребления субстрата q_S :

$$q_S = \frac{Q_S}{X} = - \frac{1}{X} \frac{dS}{dt}.$$

8.4. Скорость биосинтеза продукта

В некоторых процессах наряду с ростом биомассы происходит накопление в среде продукта метаболизма (его текущая концентрация P).

Общая скорость биосинтеза продукта метаболизма Q_P в периодическом процессе:

$$Q_P = \frac{dP}{dt}.$$

Удельная скорость биосинтеза продукта из единицы биомассы q_P :

$$q_P = \frac{Q_P}{X} = \frac{1}{x} \frac{dP}{dt}.$$

8.5. Экономические коэффициенты (коэффициенты выхода) и метаболические (трофические) коэффициенты

Экономический коэффициент по биомассе Y_{XS} – его определяют, сравнивая количество выросшей за весь цикл ферментации биомассы X_k к количеству загруженного субстрата S_0 :

$$Y = X_k / S_0.$$

Вернемся к коэффициенту Y_{XS} . Понятно, что он определен не совсем точно. В начале процесса уже существует некоторое количество биомассы, определяемое ее концентрацией X_0 , так что прирост ее за время ферментации меньше, чем X_k , и равен $(X_k - X_0)$.

В то же время не весь субстрат до конца расходуется за время процесса; какая-то часть его, определяемая конечной концентрацией S_k , останется, так что потребление субстрата будет не S_0 , а $(S_0 - S_k)$.

Таким образом, сам биологический процесс более правильно характеризовать коэффициентом, найденным по формуле:

$$Y_{XS} = \frac{X_k - X_0}{S_0 - S_k} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \left[\frac{\text{г биомассы}}{\text{г субстрата}} \right].$$

С точки зрения производителя лучше первое определение, так как остаточный субстрат – это в любом случае невосполнимые его потери, а выращенный до ферментации посевной материал – это достижение.

Экономический коэффициент по продукту метаболизма Y_{PS} :

$$Y = P_k / S_0.$$

$$Y_{PS} = \frac{P_k - P_0}{S_0 - S_k} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \left[\frac{\text{г продукта}}{\text{г субстрата}} \right].$$

Метаболические, или трофические, коэффициенты:

$$Y_{SX} = \frac{1}{Y_{XS}} = \frac{S_0 - S_k}{X_k - X_0} = \frac{\Delta S}{\Delta X} \left[\frac{\text{г субстрата}}{\text{г биомассы}} \right];$$

$$Y_{SP} = \frac{1}{Y_{PS}} = \frac{S_0 - S_k}{P_k - P_0} = \frac{\Delta S}{\Delta P} \left[\frac{\text{г субстрата}}{\text{г продукта}} \right].$$

Любой вид экономического или трофического коэффициента можно вычислять не только по начальным и конечным значениям параметров, т.е. за весь период ферментации, но и за любой произвольно взятый промежуток времени Δt , используя для его вычисления соответственно этому промежутку определенные значения ΔX , ΔS и ΔP (рис. 7.6).

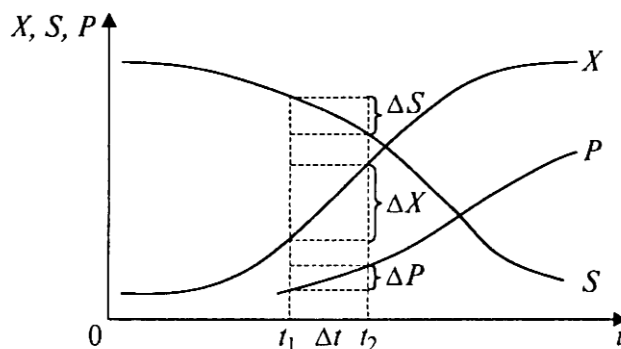


Рис. 7.6. К определению экономического коэффициента за произвольный промежуток времени $\Delta t = t_2 - t_1$

Тогда получим значения коэффициентов Y_{XS} и Y_{PS} за данный промежуток времени.

В пределе можно рассматривать промежуток Δt сколь угодно малым – вплоть до бесконечно малого dt , и ему будут соответствовать сколь угодно малые приросты dX , dP и dS .

Мгновенные текущие коэффициенты (относительные стехиометрические коэффициенты):

$$Y_{XS} = \frac{dX}{dS}; \quad Y_{PS} = \frac{dP}{dS}; \quad Y_{SX} = \frac{dS}{dX}; \quad Y_{SP} = \frac{dS}{dP}.$$

Относительные коэффициенты образования продуктов в соответствии с приростом биомассы:

$$Y_{PS} = \frac{dP}{dX}; \quad Y_{XS} = \frac{dX}{dP}.$$

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что понимают под скоростью роста биомассы?
- 2) Как определяют общую и удельную скорость роста биомассы?
- 3) Как определяют время генерации биомассы культуры?
- 4) Как определяют общую продуктивность периодического и непрерывного процесса?
- 5) Как определяют общую и удельную скорость потребления субстрата?
- 6) Как определяют общую скорость биосинтеза продукта метаболизма?
- 7) Как определяют удельную скорость биосинтеза продукта из единицы биомассы?
- 8) Экономический коэффициент по биомассе.
- 9) Экономический коэффициент по продукту метаболизма.
- 10) Метаболические, или трофические, коэффициенты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. **Никитина Е.В.** Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4

Дополнительная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
2. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6
3. <http://www.biotechnolog.ru>

Лекция 9

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ И ФЕРМЕНТЫ - I

9.1. Источники ферментов. Преимущества иммобилизованных ферментов

Ферменты и ферментные системы применяются в медицине, сельском хозяйстве, органическом синтезе, химическом анализе, в различных отраслях промышленности (пищевая, фармацевтическая, текстильная, кожевенная и др.). Ферменты получают из растительных и животных тканей или путем микробного синтеза.

Ферменты животного происхождения:

- лактатдегидрогеназа – сердце крупного рогатого скота;
- каталаза – печень КРС, свиньи;
- сычужный фермент – сычуг молочных телят и ягнят;
- щелочная фосфатаза – кишечник КРС;
- гиалуронидаза – семенники КРС;
- фумараза, трансаминаза – сердце свиньи;
- трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза, эластаза – поджелудочная железа свиньи;
- пепсин – желудок свиньи;
- люцифераза – мышечная ткань светлячков;
- ацетилхолинэстераза – мышечная ткань электрического угря.

Ферменты растительного происхождения:

- амилазы – ячмень;
- протеазы (папаин – дынное дерево; фицин – фиговое дерево; бромелин – ананас);
- кислая фосфатаза – картофель;
- пероксидаза – хрен;
- уреазы – канавалия мечевидная.

Получение ферментов из растительного и животного сырья имеет ряд недостатков. Так, для растений характерна сезонность, а содержание ферментов в них низкое. Выделение ферментов из животного сырья следует извлекать сразу на мясокомбинатах или возникает проблема его консервации и хранения.

Менее проблематично получение ферментов микробным синтезом. Методами генетической инженерии можно не только целенаправленно увеличить выход фермента, но и получить биообъект, который продуцирует ферменты с улучшенными свойствами (термостабильные, осмоустойчивые, кислото- и щелочустойчивые и др.). Многие микроорганизмы выделяют ферменты в питательную среду, это облегчает их выделение. В настоящее время налажено крупномасштабное микробиологическое производство следующих ферментов путем (протеаза, α -амилаза, глюкоамилаза, глюкоизомераза и пектиназа).

Однако применение нативных ферментов ограничено по следующим причинам: неустойчивость при хранении и различных воздействиях; сложность их отделения от реагентов и продуктов реакции.

Более перспективно использование **иммобилизованных ферментов** (от лат. *immobilis* – неподвижный). Это ферменты, адсорбированные различными физико-химическими методами на твердых носителях или связанные с ними химическими связями. Так, в 1916 г. Нельсон и Гриффин показали, что адсорбированная на угле инвертаза сохраняет каталитическую активность. В 1939 г. был получен первый патент на применение абсорбированных на опилках протеолитических ферментов для обработки шкур. Термин «иммобилизованный фермент» узаконен в 1971 г.

Особенности и преимущества иммобилизованных ферментов:

1. Фермент легко отделить от реакционной среды. Это позволяет остановить реакцию в нужный момент; использовать катализатор повторно; получить продукт не загрязненный ферментом;
2. Процесс можно проводить непрерывно. При этом можно регулировать скорость катализируемой реакции и выход целевого продукта;
3. Путем иммобилизации можно направленно изменить свойства катализатора (специфичность, зависимость от pH и ионного состава среды, действия денатурирующих агентов);
4. Путем иммобилизации можно регулировать каталитическую активность ферментов (путем изменения свойств носителя).

Кинетика ферментативных реакций с использованием иммобилизованных ферментов зависит от: концентрации субстрата; температуры; концентрации иммобилизованного фермента; степени измельчения частиц с иммобилизованным ферментом; скорости перемешивания; ингибирующего или активирующего действия полимерного носителя; pH и т.д.

Иммобилизованные ферменты и клетки применяются для производства глюкозо-фруктозных сиропов, L-аминокислот, L-яблочной кислоты, безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки, 6-аминопенициллановой кислоты и др.

Технология применения иммобилизованных ферментов и биокаталитических систем экономически эффективна. Так, получение фруктозы из глюкозы с применением иммобилизованной глюкоизомеразы стало дешевле почти вдвое.

9.2. Характеристика носителей для иммобилизации ферментов

Требования, предъявляемые к носителям:

1. Высокая химическая и биологическая стойкость, механическая прочность и гидрофильность;
2. Достаточная проницаемость для ферментов и субстратов, большая удельная поверхность, высокая вместимость и пористость;
3. Должны иметь удобные технологические формы (гранулы, мембраны, трубы, листья, волокна и др.);
4. Должны легко переводиться в реакционно-способную форму;
5. Низкая стоимость.

Носители могут быть органическими и неорганическими.

Органические носители

Природные полимерные носители:

- *Полисахаридные носители*

- целлюлоза – обладает хорошей гидрофильностью, содержит много гидроксильных групп, легко гранулируется, но неустойчива к действию сильных кислот, щелочей и окислителей;

- декстран – разветвленный полисахарид бактерий, состоит из остатков глюкозы. Гели на основе декстрана, сшитые эпихлоргидрином, выпускаются в Швеции под названием сефадекс, а в Венгрии – молселект. При высушивании сефадексы легко сжимаются, а в водных растворах сильно набухают;

- агароза и ее модификации (сефароза, биогель А);

- хитин, крахмал и губчатый крахмал, агар, каррагинан, альгиновые кислоты и их соли, гепарин и др.

- *Белковые носители* – кератин, фиброин, коллаген, миозин, сывороточный альбумин, желатин.

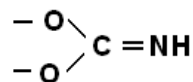
- *Липидные носители* – применяются в виде монослоев или бислоев. Монослои сорбируют белковые молекулы. Липидный монослой может на твердую подложку (силикагель, сажу, аэросил – коллоидный SiO₂) с последующей сорбцией белка из водного раствора. Для иммобилизации используют также липосомы, получаемые из различных фосфолипидов. К синтетическим аналогам липидов относятся поверхностно-активные вещества (ПАВ). При этом полярные головки ПАВ образуют ядро мицеллы, куда можно включить любое гидрофильное вещество, а углеводородные остатки этих молекул направлены в сторону органического растворителя.

Синтетические полимерные носители:

- полимеры на основе стирола (дауэкс и амберлит). Они подобны стеклам, имеют стабильную структуру пор, не набухают в воде, обладают высокой механической прочностью;

- носители на основе производных акриловой кислоты (акриламид). Клетки различного типа успешно иммобилизуются в полиакриламидном геле (ПААГ).

Функциональные группы полимерных носителей следует либо активировать, либо вводить дополнительные заместители. Так, при активации гидроксильных или аминогрупп на поверхности носителя образуют электрофильные группы, которые обладают высокой реакционной способностью по отношению к нуклеофильным группам на белке (ферменте). Например, амидокарбонаты:



Различными способами в носитель вводят аминогруппы.

Неорганические носители – силикагель, глины, керамика, природные минералы, графитированная сажа, металлы и их оксиды. Их применяют в виде шариков, монолитов, порошка. Они могут быть пористыми и без пор. Преимущества: легкость регенерации; возможность придания любой конфигурации. Для активации их покрывают пленкой оксида металла (алюминия, циркония, титана), полимерами (полиэтиленмин) или обрабатывают солями переходных металлов.

9.3. Физическая иммобилизация ферментов

При этом фермент включают в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в последней молекулами субстрата.

Методы физической иммобилизации

1. Иммобилизация путем адсорбции на нерастворимых носителях – основана на удержании фермента на носителе за счет ван-дер-ваальсовых и гидрофобных взаимодействий, электростатических сил и водородных связей между носителем и поверхностными группами белка. После отмывки неадсорбированного фермента препарат можно использовать. Метод применяется для иммобилизации каталазы, пепсина, аспарагиназы и др.

На адсорбцию фермента влияют следующие факторы: удельная поверхность и пористость носителя; рН, ионная сила и концентрация раствора фермента; температура.

Приемы:

1. Статический – носитель и водный раствор фермента смешивают и оставляют на сутки или более. Иммобилизация достигается за счет самопроизвольной диффузии фермента к носителю с последующей его адсорбцией.

2. Перемешивание раствора фермента и носителя с помощью магнитной мешалки.

3. Электроосаждение – в раствор фермента погружают два электрода, на один из которых нанесен носитель, и пропускают электрический ток.

4. Метод нанесения в колонке – через колонку с носителем прокачивают раствор фермента.

Для повышения эффективности адсорбции носитель и фермент предварительно модифицируют. Так, носитель выдерживают в буферном растворе или обрабатывают, например, веществами, молекулы которых содержат большое число функциональных групп (альбумин). Ферменты обрабатывают соединениями, содержащими ионогенные группы (поликислоты, карбоксиметилцеллюлоза и др.). Для дополнительного удержания фермента на носителе используют электроудержание.

Преимущества метода – доступность и дешевизна сорбентов, простота методики.
Недостатки метода – фермент удерживается на носителе недостаточно прочно.

2. Иммобилизация путем включения в поры геля – молекулы фермента включают в трехмерную сетку из тесно переплетенных цепей, образующих гель. На активность ферментов влияет содержание фермента, размеры гелевых частиц и природа полимерной матрицы.

Гели образуют из крахмала, агар-агара, каррагинана или агарозы. Сшитые гели можно получить, например, при воздействии на водные растворы поливинилового спирта гамма-излучением или потоком электронов. Используют включение ферментов в матрицу из фотополимеризующихся смол. Они содержат fotocувствительные функциональные группы и при действии ультрафиолетового облучения образуют между собой ковалентные связи и трехмерную сетку.

Для получения неорганических гелей используют поликремниевую кислоту (силикагель) или фосфат кальция.

Метод применяется для иммобилизации лактатдегидрогеназы, пероксидазы, α - и β -амилаз, трипсина и др.

Способы:

1. Фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию. В реакционную смесь добавляют сшивающие агенты, которые придают полимеру структуру трехмерной сетки. Таким путем иммобилизуют трипсин, рибонуклеазу и β -амилазу.

2. Фермент помещают в раствор уже готового полимера, который затем переводят в гелеобразное состояние.

Преимущества метода: простота методики; возможность создания иммобилизованных препаратов любой геометрической конфигурации (сферические частицы, пленки); высокая химическая, механическая и тепловая стойкость; неоднократность использования; универсальность – метод применим для иммобилизации практически любых ферментов, а также полиферментных систем, клеточных фрагментов и целых клеток; ферменты защищены от бактериального загрязнения.

Недостатки метода: полимерная матрица создает препятствия для диффузии субстрата к ферменту. Это снижает его каталитическую активность; если субстратом является ВМС, то метод не применим.

3. Иммобилизация путем отделения фермента от остальной среды полупроницаемой перегородкой (мембраной)

Способы:

- Микрокапсулирование. Изготавливаются микрокапсулы размером от нескольких десятков до нескольких сотен микрометров, толщина мембран – составляет десятые-сотые доли мкм, диаметр пор – несколько нм. Внутри этих микрокапсул находятся ферменты, например, аспарагиназа.

- Двойное эмульгирование. Получают эмульсию водного раствора фермента в органическом растворе полимера. Ее вновь диспергируют, но в воде. В результате получается водная эмульсия из капель органического раствора полимера, которые содержат еще более мелкие включенные капли водного раствора фермента. Через некоторое время органический раствор затвердевает, и образуются полимерные сферические частицы с включенным в них ферментом.

- Включение в волокна. Водный раствор фермента в органическом растворе волокнообразующего полимера (целлюлоза, поливинилхлорид и др.) продавливают через фильтры в жидкость (толуол), которая вызывает коагуляцию полимера. Так, например, изготавливают хирургические салфетки с иммобилизованным трипсином.

- Включение в липосомы. Ферменты, иммобилизованные этим методом, применяются, главным образом, в медицинских целях, а также для проведения фундаментальных исследований, ибо липосомы по своей природе близки природным биомембранам.

Преимущества метода – простота и универсальность, высокое содержание включенного фермента, сохранение его каталитической активности. *Недостатки метода* – затруднено ферментативное превращение ВМС.

4. Иммобилизация путем включения в двухфазную реакционную среду – при этом субстрат под действием фермента перерабатывается в водной фазе, а продукт экстрагируется в фазу органического растворителя. Так можно гидролизовать крахмал

под действием смеси α -амилазы и амилоглюкозидазы в двухфазной системе из водных растворов крахмала и полиэтиленгликоля. *Недостатки метода* – низкая скорость процесса, инактивация фермента при его адсорбции на границе раздела фаз, загрязнение продукта и др.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Приведите примеры ферментов растительного и животного происхождения.
- 2) Понятие «иммобилизованные ферменты».
- 3) Особенности и преимущества иммобилизованных ферментов.
- 4) От каких факторов зависит кинетика ферментативных реакций с использованием иммобилизованных ферментов?
- 5) Требования, предъявляемые к носителям для иммобилизации ферментов.
- 6) Природные полимерные органические носители.
- 7) Синтетические полимерные органические носители:
- 8) Неорганические носители.
- 9) Принцип физической иммобилизации ферментов.
- 10) Иммобилизация путем адсорбции на нерастворимых носителях.
- 11) Иммобилизация путем включения в поры геля.
- 12) Иммобилизация путем отделения фермента от остальной среды полупроницаемой перегородкой (мембраной).
- 13) Иммобилизация путем включения в двухфазную реакционную среду.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
3. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6

Дополнительная

1. Журналы: Биотехнология, Вестник СГАУ, Прикладная биохимия и микробиология, Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии, Фармацевтическая промышленность, Кондитерское и хлебопекарное производство, Масложировая промышленность, Молочная промышленность, Переработка молока, Мясные технологии, Сыроделие и маслоделие, Пиво и напитки, Пищевая технология.
2. <http://www.biotechnolog.ru>
3. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)
4. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
5. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

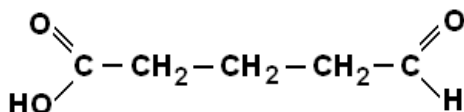
Лекция 10

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ И ФЕРМЕНТЫ - II

10.1. Химическая иммобилизация ферментов

При этом путем химического воздействия на структуру фермента в его молекуле создаются новые ковалентные связи (между белком и носителем). Ковалентная связь обеспечивает высокую прочность конъюгата. При этом существенно изменяется субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность фермента.

При химической иммобилизации фермент отдален от носителя благодаря «ножке». Для этого применяют сшивающие агенты различной длины, чаще всего это глутаровый альдегид:

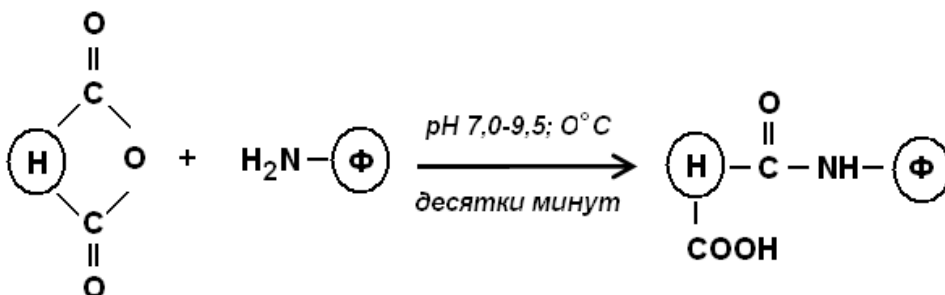


В процессе ковалентной иммобилизации должны участвовать только те группы молекулы фермента, которые несущественны для его функции. Эти группы должны быть высокореакционноспособными. Наиболее реакционноспособными группами в белках являются SH-группы цистеина. Они участвуют в реакциях окисления, ацилирования, алкилирования и т.д. Однако в белках свободных SH-групп недостаточно, так как они участвуют в образовании дисульфидных мостиков или необходимы для каталитической активности фермента. Поэтому используют аминогруппы. Они достаточно реакционноспособны, обычно играют второстепенную роль в поддержании структуры и функции ферментов. Используют также имидазольные, гуанидиновые и гидроксильные группы.

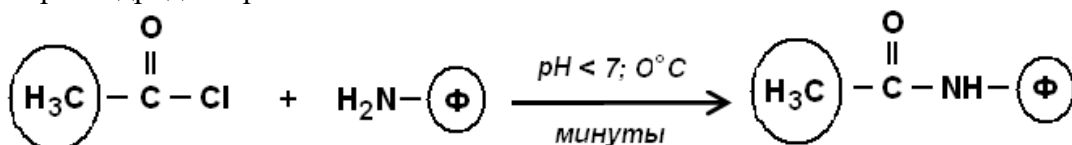
Приёмы химической иммобилизации:

1. Реакция образования амидной связи. Часто применяют реакцию ацилирования аминогрупп фермента, используя:

а) ангидриды карбоновых кислот:

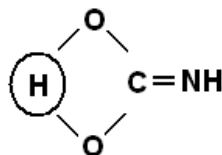


б) хлорангидриды карбоновых кислот:

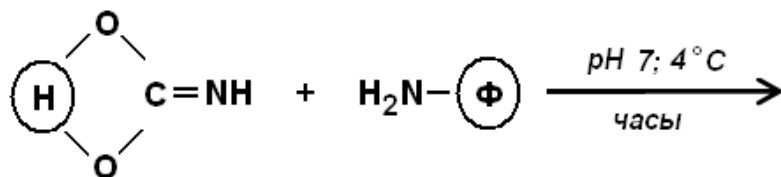


2. Реакция образования карбамидных связей. Для этого часто используют бромциановый метод. При обработке бромцианом на природных носителях (или синтетических полиолах) образуются очень реакционноспособные группы:

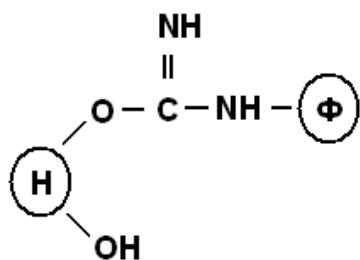
цианатные $-\text{O}-\text{C}\equiv\text{N}$ и имидокарбонатные



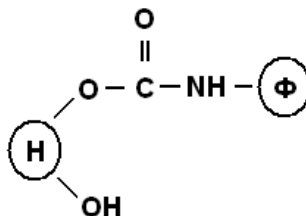
При взаимодействии белка с таким активированным носителем образуются:



а) изомочевины

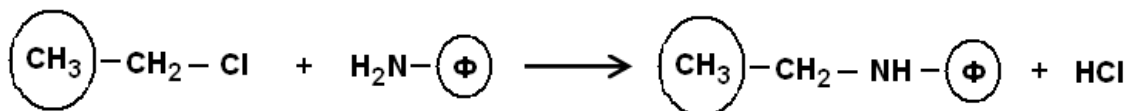


б) уретаны

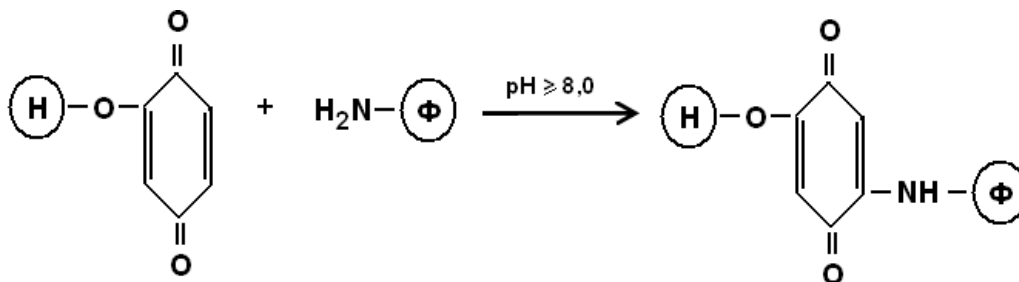


Бромциановым методом иммобилизуют аспарагиназу, ацетилхолинэстеразу, холинэстеразу.

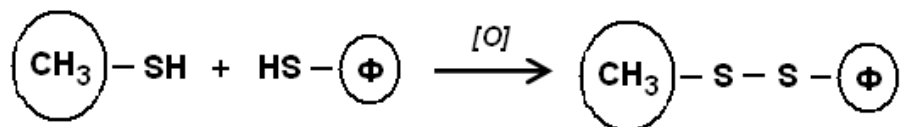
3. Реакции образования вторичных аминов – α - и ϵ -аминогруппы белков можно трансформировать во вторичные в реакциях алкилирования и арилирования, а также путем восстановления азометиновых связей (оснований Шиффа). Алкилирующими и арилирующими агентами служат галогенпроизводные алифатических и ароматических углеводородов, а также метилалканов:



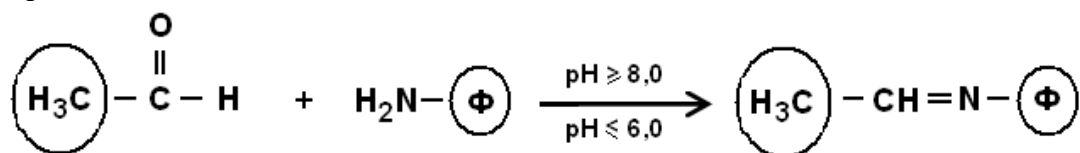
В таких условиях алкируются тиольные, имидазольные и гидроксильные группы. Окислительное арилирование осуществляют с помощью бензохинона:



4. **Реакции тиол-дисульфидного обмена** – основаны на формировании межмолекулярных дисульфидных связей боргидридом натрия, меркаптоэтанолом, цистеином и др.:



5. **Модификация аминогрупп с образованием азометиновых связей – CH=N–** в реакциях белков с альдегидами. Такие связи легко разрушаются в кислых средах с регенерацией исходных веществ:



10.2. Сохранение стабильности иммобилизованных ферментов

Для иммобилизованных ферментов число возможных инактивационных механизмов значительно меньше, чем для нативных ферментов. Так, иммобилизация подавляет агрегацию и автолиз, сорбцию на стенках реактора, нивелирует действие протеаз, фосфорилаз и фосфатаз. Носитель механически защищает молекулы ферментов от деформаций в потоке.

Инактивация ферментов может быть физической и химической. Молекулярные механизмы инактивации ферментов можно представить в виде двух стадий:



где *N* – нативная форма белка;

D – обратимо денатурированная форма белка;

I – необратимо инактивированная форма белка.

Стадия ($N \rightleftharpoons D$) – это чаще всего обратимое конформационное изменение.

На стадии ($D \rightarrow I$) инактивация ферментов усиливается при длительной инкубации, высокой температуре, экстремальных значениях pH, в присутствии химических денатуратов и т.д.

Инактивация ферментов сопровождается изменением первичной структуры за счет разрыва полипептидной цепи или химической модификации отдельных функциональных групп. Возможна рацемизация аминокислот, дезаминирование аспарагина, десорбция кофакторов из активного центра, сорбция белка на стенках реактора, инактивация в потоке и др.

10.3. Соиммобилизация

Вариантом иммобилизации является **соиммобилизация** – совместная иммобилизация различных биокатализаторов (двух или более ферментов, видов клеток,

комбинаций ферментов и клеток и т.д.). Соиммобилизация позволяет осуществлять многостадийные процессы *in vitro*. Важно учитывать функциональную совместимость биокаталитических систем. Например, превращение крахмала во фруктозу с применением соиммобилизованных глюкоамилазы и бактериальных клеток с глюкоизомеразной активностью не удастся. Это объясняется несовпадением оптимумов рН для двух биокатализаторов.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Принцип химической иммобилизации ферментов.
- 2) Реакция образования амидной связи.
- 3) Реакция образования карбамидных связей.
- 4) Реакции образования вторичных аминов.
- 5) Реакции тиол-дисульфидного обмена.
- 6) Модификация аминокрупп с образованием азометиновых связей.
- 7) Сохранение стабильности иммобилизованных ферментов.
- 8) Молекулярные механизмы инактивации ферментов.
- 9) Соиммобилизация.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
3. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6

Дополнительная

1. Журналы: Биотехнология, Вестник СГАУ, Прикладная биохимия и микробиология, Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии, Фармацевтическая промышленность, Кондитерское и хлебопекарное производство, Масложировая промышленность, Молочная промышленность, Переработка молока, Мясные технологии, Сыроделие и маслоделие, Пиво и напитки, Пищевая технология.
2. <http://www.biotechnolog.ru>
3. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)
4. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
5. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 11

ТИПОВЫЕ ПРИЕМЫ И ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ - I

11.1. История применения культур клеток животных

Этапы истории

1. в первом десятилетии XX века впервые выделили клетки из тканей организма высших животных и создали условия для их роста и воспроизводства в искусственных условиях (*in vitro*);
2. стало возможным выращивание и репродукция в таких клетках вирусов;
3. показана возможность получения в клетках животных больших количеств вирусного материала для применения в вакцинных препаратах;
4. стало возможным вставить в клетки специфические экзогенно полученные гены и получить их экспрессию; подтверждена возможность выращивания из одиночной клетки целой популяции.

К настоящему времени разработаны методы культивирования клеток и тканей животных на искусственных жидких и твердых средах в пробирках, чашках Петри, флаконах. Культура клеток позволяет решать фундаментальные научные проблемы генетики, физиологии, биохимии. Для культивирования используют клетки опухолевых тканей, различных органов, лимфоциты, фибробласты, эмбрионы и т.п.

Применение культуры клеток животных для практических целей началось впервые с работ, в которых была показана возможность выращивания вирусов в культивируемых клетках. Для этого в 1949 г. были использованы клетки почек взрослых обезьян, клетки куриного эмбриона.

11.2. Основные характеристики клеток животных

Рост – представляет собой увеличение биомассы. Достигается за счет увеличения средней массы клетки (гипертрофия) или числа клеток (гиперплазия). Масса клетки удерживается в строго определенных пределах регуляторными факторами, поэтому в практической технологии термин «рост» подразумевает пролиферацию, то есть увеличение числа клеток.

Выделяют следующие регуляторные агенты: *наследственные* – осуществляют внутриклеточную регуляцию при решении вопроса о том, будет или нет происходить митоз (например, масса и структура клетки); *межклеточные* – действуют внутри популяции (например, величина пространства, питательные факторы); *межпопуляционные* – осуществляют регуляцию между популяциями (например, гормоны, стимуляторы роста и ингибиторы).

Специализация клеток – благодаря этому свойству, формируются индивидуальные ткани с конкретными функциями.

Трансформация – изменение ростовых свойств культивируемых клеток. Это необратимый процесс. При этом клетки пролиферируют в условиях, неблагоприятных для нетрансформированных клеток.

11.3 Этапы культивирования клеток животных

1. Диссоциация тканей – при этом из организованных тканей получают одиночные клетки. Их затем используют для получения первичных культур, т.е. культур численно увеличивающихся клеток.

В качестве источника первичных клеток используют: почки обезьян, собак, кроликов, куриных эмбрионов 14-дневного возраста; клетки легких эмбриона человека 12-16-недельного возраста и клетки почек такого эмбриона.

Предпочтение отдается эмбриональным клеткам. При получении клеток от более старых доноров их урожай и качество снижаются, так как в их органах накапливается соединительная ткань.

Сначала ткань тонко измельчают с помощью гомогенизатора, путем продавливания ткани через сетку из нейлона или нержавеющей стали или нарезают скальпелем или ножницами. Содержимое разрушенных клеток захватывает интактные клетки, при этом образуются желатиноподобные агрегаты. Поэтому проводят дополнительную обработку этих агрегатов ДНК-азой.

Для предотвращения развития микробов-контаминантов растворы, которые используются при диссоциации ткани, должны содержать антибиотики широкого спектра действия (гентамицин, неомицин) или более специфичные антибиотики (фунгизон).

Для диссоциации тканей применяют гидролитические ферменты, которые разрушают внеклеточный матрикс:

- *Трипсин* – применяется в сочетании с хелатами (например, ЭДТА) или с другими ферментами (особенно коллагеназой) в присутствии ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} при pH 7,2-7,6.
- *Проназа* – группа ферментов из *Streptomyces griseus*. Она действует быстрее и дает лучшее разделение ткани на дискретные клетки, чем трипсин, применяется при работах с фибробластами, не подвергается ингибированию.
- *Коллагеназа* – действует на межклеточный матрикс и меньше на клеточную мембрану, сильно по сравнению с другими ферментами повреждает клетки. Применяется в сочетании с ионами Ca^{2+} .
- *Эластаза* – переваривает эластин, но нейтрализуется сывороткой.
- *Диспаза* – нейтральная протеаза из *Bacillus polymixa*, применяется в сочетании с коллагеназой или ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота).
- *Гиалуронидаза* – полисахаридаза специфически гидролизует связи, общие в гиалуроновой кислоте и хондроитинсульфатах, которые обнаружены в соединительной ткани.
- *Смеси ферментов* более эффективны для многих тканей. Например, смеси трипсина и коллагеназы для ткани печени и хрящей или коллагеназа и гиалуронидаза для эпителиальных клеток.

2. Сепарация клеток. При диссоциации получают смешанные популяции эндотелиальных, фибробластных и эпителиальных клеток. Для получения какого-то определенного типа кровяных клеток используют следующие методы:

- *Селективная обработка ферментами.* Так, в присутствии коллагеназы увеличивается доля эпителиальных клеток.
- *Специфические ингибиторы.* Так, например, этилмеркуритиосалицилат натрия и йодоуксусная кислота более токсичны для фибробластов.

- *Центрифугирование*: изопикническое центрифугирование – в градиенте плотности; зональное или дифференциальное центрифугирование – по скорости седиментации, т.е. по размеру.

- *Хроматография*

- *Физические методы*: электрофорез; дифференциальное прикрепление клеток к стеклу (например, эндотелиальные клетки прикрепляются к стеклу быстрее фибробластов, а фибробласты – быстрее эпителиальных клеток); разделение клеток между двумя водными фазами полимера (например, система декстран-полиэтиленгликоль, в которой полиэтиленгликоль сосредотачивается в верхней, а декстран в нижней фазах).

- *Сортировка клеток* – для этого используют автоматы по сортировке и учету потока клеток (цитомеры), с их помощью можно различать и сепарировать клеточные органеллы, например хромосомы в метафазе.

3. Субкультивирование и сбор урожая. Для снятия монослоя клеток с субстрата применяются те же ферменты, что и для диссоциации тканей, чаще – трипсин. Перед добавлением трипсина клеточный пласт промывают фосфатно-солевым буферным раствором для удаления остаточных следов сыворотки.

Если жизнеспособные клетки не требуются (например, при сборе клеток для извлечения антигенов), то их собирают следующими способами: встряхивание со стеклянными бусами; соскабливание пласта шпателем или стержнем с резиновым покрытием; применение ультразвука; применение детергентных препаратов; замораживание и оттаивание.

4. Подсчет общего числа клеток. Для этого используют: гемоцитомеры; электронный метод; прямой метод – определение массы клеток по содержанию в них белков, белкового азота или по сухому веществу при условии, если взятые клетки были полностью отмыты от сыворотки и других компонентов среды; косвенный метод – по изменению метаболических процессов; радиохимические методы.

5. Синхронизация роста. Для многих исследований требуются клетки в одной и той же фазе развития. Для получения таких клеток используют два метода:

1. Блокирование (индукция) – при этом клетки блокируются в фиксированной точке жизненного цикла и накапливаются в данной фазе. Затем клетки высвобождают из образовавшегося блока (обычно промыванием) и далее обеспечивают их синхронное развитие.

Для блокирования клеток применяют: ингибиторы митоза (колцеид, винбластин); ингибиторы синтеза ДНК (тимидин, аметоптерин, 5-аминоурацил и гидроксимочевина).

Частично синхронизируют клетки воздействием холодом, голоданием. Синхронизация обычно охватывает 20-50% клеток. Увеличение достигается повтором блокирований.

2. Селекция (сепарация) – при этом клетки извлекают из популяции физическими методами: *митотическое «стряхивание»* – основано на том, что во время митоза клетки монослоя округляются и слабее прикрепляются к субстрату и друг к другу; *скоростное центрифугирование* – при этом отсеlectionируют фракцию клеток одинакового объема и возраста. При этом синхронизируется 60-75% клеток.

6. Имобилизация и микрокапсулирование клеток. Основная задача – стабилиза-

ция клеток и создание для них оптимальных условий. Клетки могут быть иммобилизованы: адсорбцией; ковалентным связыванием; перекрестным связыванием; заключением в полимерные матриксы.

Для этого используют желатин, полилизин, альгинат, агарозу.

Такая техника обеспечивает: защиту клеток при перевозке; длительное хранение клеток при 4°C; исключение иммунного отторжения трансплантированных клеток; защиту хрупких клеток (например, гибридом) от механических воздействий.

При культивировании инкапсулированных клеток легче: производить смену среды в ферментере; регулировать соотношение объемов клеток и питательной среды; выделять продукты, свободные от клеток.

7. Консервирование клеток животных. Консервирование позволяет: сохранить нужный геном в биотехнологии; сохранить посевной материал высокого качества; длительно сохранить запас клеток, имеющих ограниченную продолжительность жизни и не выдерживающих большое число пассажей; обеспечить генетические исследования запасом родительских клеток; сохранить резервный фонд клеток на случай утраты основного фонда; не подвергать клетки субкультивированию до того времени, пока это непосредственно не потребуется; сберечь затраты труда, питательные среды, а также уменьшить риск контаминации; проводить эксперименты по слиянию клонов без спешки.

Клетки животных не переносят лиофильной сушки (сублимация). Практически утрачивают жизнеспособность при температуре ниже -25°C. Некоторые клетки выживают при -70°C и даже при -140°C.

Наиболее распространено хранение клеток в жидком азоте (температура – -196°C). При этом клетки полностью стабильны.

В зависимости от скорости замораживания происходят последовательно или одновременно три явления: образование кристаллов льда; удаление воды; повышение концентрации растворенных веществ.

Повреждение клеток и утрату ими жизнеспособности могут вызвать: образование внутриклеточного льда – это происходит при скорости охлаждения выше 100 °C/мин; высокая концентрация солей при пониженных скоростях охлаждения – менее 1 °C/мин.

Чтобы избежать значительных градиентов температуры в замораживаемой смеси, применяют как можно меньшие объемы замораживаемого материала. Обычно это стеклянные ампулы емкостью 1 мл. Если объем замораживаемого материала слишком большой, то используют пластиковые мешки, применяемые для хранения крови. При этом замораживаемый материал распределяется тонким слоем по большой поверхности. Это обеспечивает лучшие условия для теплообмена.

8. Восстановление жизненных функций. При оттаивании культуры её следует разогреть со скоростью не менее 400 °C/мин. Когда клетки оттают, ампулу открывают и ее содержимое вносят в среду для выращивания с температурой 37 °C.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Этапы истории применения культур клеток животных.
- 2) Что понимают под термином «рост» для культур клеток животных?
- 3) Регуляторные агенты роста популяции клеток животных.
- 4) Понятие специализации клеток.
- 5) Понятие трансформации клеток.

- 6) Перечислите этапы культивирования клеток животных.
- 7) Как проводят диссоциацию животных тканей?
- 8) Способы сепарации клеток.
- 9) Как осуществляют субкультивирование и сбор урожая?
- 10) Способы подсчета общего числа клеток.
- 11) Способы синхронизации роста клеток.
- 12) Особенности иммобилизации и микрокапсулирования клеток животных.
- 13) Способы консервирования клеток животных.
- 14) Техника восстановления жизненных функций клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
3. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4

Дополнительная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
2. **Пшеничникова, А.Б.** Основы биотехнологии: учебное пособие / А.Б. Пшеничникова. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 92 с.
3. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
4. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
5. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. <http://www.biotechnolog.ru>

Лекция 12

ТИПОВЫЕ ПРИЕМЫ И ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ - II

12.1. Глубинное выращивание клеток в монослое

Направлено на получение наибольшей концентрации клеток в наименьшем объеме газовой фазы. При этом клетки животных размножаются, растут и развиваются в прикрепленном состоянии до тех пор, пока не сольются в монослой.

Рост клеток в виде монослоя зависит от белков – фибронектинов (от лат. *fibro* – нить, *nectere* – связывать или соединять). Фибронектин – гликопротеин, обеспечивает межклеточную адгезию, прикрепление клеток к подложке, направляет их перемещение.

Прикрепление клеток зависит от следующих свойств субстрата: *гидрофильность* – адгезивные свойства более выражены для смачиваемых поверхностей; *протяженность* – поверхность субстрата должна быть больше нормальной длины клетки; *горизонтальность* – растущие клетки распространяются в направлении наименьшей кривизны субстрата.

Например, если принять прикрепление клеток к агар-агару за единицу, то к полиэтилену они прикрепляются лучше в 8 раз, к резине – в 12 раз, к стеклу – в 16 раз, а к стали – в 20 раз.

В монослое выращивают клетки соединительной ткани (фибробласты), клетки почек кроликов, обезьян, собак, 10-14-дневных куриных эмбрионов.

Выращивание проводят в строго асептических условиях при покачивании для омывания большей площади культуральной среды. Клетки попеременно погружают в жидкую и газообразную фазу, при этом с избытком обеспечивается потребность в кислороде.

Во время культивирования клеток учитываются следующие параметры: константные – качество материала, форма и объем культиватора; *вариабельные* – скорость покачивания, качество и объем среды, тип клеток и размер посевного материала, рН и температура среды, снабжение кислородом и содержание CO₂ в культиваторе, окислительно-восстановительный потенциал, концентрация основных источников питания.

12.2. Глубинное выращивание клеток в суспензированных культурах

При использовании микроносителей, суспендируемых в питательной среде, площадь выращиваемых клеток увеличивается. Клетки закрепляются на их поверхности, а затем разрастаются в виде монослоя. В таких системах совмещаются монослойные и суспензионные культуры клеток животных.

Применяют следующие микроносители: положительно заряженные ДЕАЕ-сефадексы (комбинация высокомолекулярного полимера декстрана с ионообменными смолами); сефадексы с коллагеновым покрытием (высокомолекулярный полимер декстрана); отрицательно заряженный полистирол; полые стеклянные сферы; микроносители из пористого шлачного стекла и др.

После выращивания клетки отделяют от микроносителей: центрифугированием; фильтрованием; обработкой трипсином с последующим промыванием и сепарированием.

Данный метод применяется для получения вирусных вакцин (против бешенства, полиомиелита, ящура).

Основные подходы к выбору оборудования и к реализации биотехнологических процессов с использованием животных клеток аналогичны с таковыми в микробной биотехнологии: хемо- и турбидостатные системы, циклические, непрерывные, полунепрерывные. Возможно отъемно-доливочное культивирование.

12.3. Среды для выращивания клеток

Функции сред для выращивания клеток: поддержание необходимых для роста физико-химических условий; обеспечение клеток питательными веществами для синтеза клеточной биомассы и продуктов.

Среда культивирования может создавать следующие условия: для клонального роста, т.е. для роста одиночной клетки; массового выращивания клеток; образования целевого продукта; поддержания обмена веществ у неделящихся клеток.

Первоначально для культивирования клеток создавались комплексные среды на основе плазмы крови и других биологических жидкостей. Наиболее рациональным при выборе состава сред является уменьшение числа компонентов до минимума, необходимого для роста, т.е. создание так называемых минимальных сред.

Термин «питательное вещество» подразумевает вещество, которое поступает в клетки и используется как метаболический субстрат или кофактор. Известны незаменимые питательные вещества – это аминокислоты, витамины, растворенные газы, неорганические ионы, источники энергии.

Основной состав питательных сред

Источники энергии – глюкоза, глютамин, фруктоза, галактоза, уридин и цитидин.

Аминокислоты. Для культивирования клеток незаменимыми считаются 13 аминокислот (аргинин, цистин, глютамин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, тирозин, валин). Потребность в них снижается, если в среде содержится достаточно заменимых аминокислот (аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, пролин, глицин, серин). Важное значение имеет баланс между аминокислотами.

Витамины

Водорастворимые витамины. Для многих культивируемых клеток необходимы биотин, фолиевая кислота, никотинамид, пантотеновая кислота, пиридоксин, рибофлавин и тиамин. Например, аскорбиновая кислота увеличивает урожай интерферона при его получении из культур клеток человека на микроносителе.

Жирорастворимые витамины. Информация о влиянии жирорастворимых витаминов (А, D, E, K и др.) на культивируемые клетки весьма ограничена.

Неорганические ионы. Клеткам животных для роста требуется натрий, калий, кальций, магний, фосфат, бикарбонат, хлорид. Они необходимы для: поддержания осмотического давления; создания потенциалов у мембран; регулирования рН (за счет буферности); способствуют прикреплению клеток к различным поверхностям; действуют как кофакторы для энзиматических реакций; от соотношения различных ионов, особенно

ионов натрия и калия, зависит урожай клеток и скорость их роста.

Следовые элементы. Считают, что для животных клеток незаменимыми или полезными являются 15 элементов: Co, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Zn, Se, Cr, Ni, V, As, Si, Sn. Следовые элементы переходят в среды из химических соединений или из стекла (колбы, бутылки).

Липиды. Источник липидов – сыворотка. Она содержит белки, транспортирующие липиды: альбумин – переносит свободные жирные кислоты, и липопротеины – транспортируют фосфолипиды, триглицериды и холестерол.

pH и буферные растворы. Оптимальное значение pH для максимального роста клеток – 6,9-7,8. Для оптимизации pH применяют неорганические буферы (например, карбонатный буфер – $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$) или органические буферы (α -глицерофосфат).

Газы. Кислород – незаменимый элемент для роста клеток млекопитающих. Потребность в нем обеспечивают путем обдувания поверхности среды воздухом или смесью, содержащей 95% воздуха и 5% CO_2 ; двуокись углерода – растворяется в воде, служит источником бикарбоната. Для некоторых клеток оптимальна газовая смесь, содержащая 0,5-2,0% CO_2 .

Антибиотики. Наиболее часто применяют: антибактериальные агенты – пенициллин, стрептомицин, гентамицин; противогрибковые агенты – амфотерицин, нистатин.

Постоянное применение антибиотиков не желательно из-за: выработки резистентных микроорганизмов; отрицательного влияния на рост и функции клеток; снижения урожайности, скорости роста и сохраняемости клеток.

Неопределенные добавки – сыворотки эмбриона теленка, новорожденных телят и лошадей.

Функции сыворотки: является носителем для лабильных или нерастворимых в воде питательных веществ; связывает или нейтрализует токсины; содержит ингибиторы протеазы, которая инактивирует трипсин; способствует прикреплению клеток к субстрату; является источником незаменимых низкомолекулярных питательных веществ, гормонов и пептидных факторов роста; обладает защитным эффектом (*например, при перемешивании*).

При использовании сыворотки возникают следующие проблемы: изменчивость состава; высокая стоимость и периодическая дефицитность; источник контаминации микоплазмами, бактериофагами, вирусами и др.; источник токсинов; модифицирование поверхности клеток вследствие адсорбции или внедрения сывороточных белков; невозможность точно определить питательность среды; осложнения при очистке продуктов; чрезмерный рост фибробластов в первичных культурах других типов клеток.

В бессывороточные питательные среды вводят и другие неопределенные добавки (пептоны, эмульсии яичного желтка, гидролизат лактальбумина, триптозный фосфат и молоко).

При выборе среды следует учитывать:

- Любые данные о предшествующем использовании; наиболее надежно применение той среды, которая ранее показала хорошие результаты для данного типа клеток.

- *Тип клеток.* Трансформированные и отселекционированные клеточные линии обычно относительно хорошо растут в более простой среде или требуют меньше сыворотки, чем нетрансформированные или первичные клеточные линии.

- *Обеспеченность материалом.* Специализированные предприятия обеспечивают широкий выбор традиционных сред и необходимый набор бессывороточных смесей (например, среда Искова). Должны быть также доступными ростовые факторы и добавки к бессывороточным средам.

- *Система культивирования.*

- *Стоимость.* Дороговизна сыворотки должна балансировать высокой стоимостью добавок к бессывороточным средам.

- *Точность химического состава.* Например, для ряда исследований предпочтительны бессывороточные среды.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Технология глубинного выращивания клеток животных в монослое.
- 2) Технология глубинного выращивания клеток животных в суспензированных культурах.
- 3) Функции сред для выращивания клеток животных.
- 4) Источники энергии, аминокислоты, витамины как компоненты питательных сред для культивирования клеток животных.
- 5) Неорганические ионы, следовые элементы, липиды, рН и буферные растворы, газы, антибиотики как компоненты питательных сред для культивирования клеток животных.
- 6) Неопределенные добавки для культивирования клеток животных.
- 7) Функции сыворотки.
- 8) Какие проблемы могут возникнуть при использовании сыворотки?
- 9) Какие условия следует считывать при выборе питательной среды для культивирования клеток животных?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
3. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4

Дополнительная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
2. **Пшеничникова, А.Б.** Основы биотехнологии: учебное пособие / А.Б. Пшеничникова. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 92 с.
3. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2

4. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.

5. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

6. <http://www.biotechnolog.ru>

Лекция 13

ТИПОВЫЕ ПРИЕМЫ И ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК - I

13.1. Вегетативное размножение растений методом культур тканей

Фитобиотехнология – составная часть биотехнологии (от греческих слов *phuton* – растение, *bios* – жизнь, *techné* – искусство и *logos* – наука, слово). Это наука об использовании растительных объектов в технике и промышленном производстве.

Объекты фитобиотехнологии – клетки и ткани растений, а также биологически активные молекулы растительного происхождения (ферменты, нуклеиновые кислоты, стероиды и др.).

К *фитобиотехнологическим процессам* относят процессы, которые базируются на клеточном уровне, в том числе, когда клетки уже использовались в генно-инженерном эксперименте.

С помощью методов фитобиотехнологии можно выращивать на питательных средах *in vitro* клетки и ткани высших растений, продуцирующих БАВ, в несвойственных им климатических зонах.

Растительные клетки и ткани способны культивироваться в форме неорганизованной клеточной массы – *каллуса*. Каллусную ткань можно "заставить" формировать зародышеподобные структуры, почки, побеги, а на их основе – *растения-регенеранты*. Все это происходит благодаря *тотипотентности* растительных клеток (от лат. *totus* – все, целый, *potentia* – сила, потенция). Т.е. клетка обладает способностью воспроизводить целый организм.

Если в качестве биообъекта применяют изолированный зародыш, меристему верхушечных или пазушных почек, то все получаемые растения-регенеранты полностью соответствуют исходному растению. При применении изолированных клеток и протопластов искусственно создают новые формы растений, пригодные для селекции.

Самые ранние работы по изолированию культур принадлежат Блоцишевскому (1876), Брауну и Моррису (1892), Боннэ, Саксу (1893). В этих исследованиях зародыши вычленились из семени и выращивались в искусственных условиях. Удачные методы выращивания изолированных тканей были впервые разработаны в 1949 г. Ф. Уайтом и Р. Готре. Дальнейшее развитие методов получения каллусной ткани получено в 1963 г. в лабораториях Б. Скуга и Р.Г. Бутенко.

Микроразмножение *in vitro* осуществляют из зародыша растения, верхушки основного побега, пазушных побегов, суспензионной культуры клеток, промежуточного каллуса и некоторых других. Для этого соответствующие ткани отбирают, стерилизуют и переносят на подходящую питательную среду.

Установлено, что меристемные ткани, сердцевина луковиц, клубнелуковиц и корневищ, которые надежно защищены листьями и чешуйками и являются стерильными. Перед удалением покрывающих структур их каждый раз протирают 70% этанолом. Если источниками тканей являются открытые органы, то их стерилизуют до 40 минут ртуть- или хлорсодержащими агентами (гипохлориты натрия и кальция, сулема) или пероксидом водорода.

После стерилизации растительный биообъект трижды промывают свежей стерильной дистиллированной водой.

Компоненты питательных сред делят на 3 группы: 1) источники органического углерода (чаще – сахароза); 2) неорганические соли (включая источники азота); 3) стимуляторы роста (некоторые витамины группы *B* и растительные гормоны – цитокинины (усиливают или поддерживают рост каллусов и/или корнеобразование *in vitro*) и ауксины (стимулируют образование почек).

Питательные среды могут быть плотными и жидкими. Например, для микрокультуры ананасов предпочтительнее жидкие среды.

В целях предотвращения возможного бактериального и грибного загрязнения в питательные среды добавляют антибиотики (нистатин, цефалоспорин, левомецетин, гентамицин сульфат, канамицин моносульфат, рифампицин и др.).

С помощью метода культур тканей повысили коэффициент размножения садовых древесных растений (яблони) и травянистых декоративных растений (ирис, нарцисс, петуния, фиалка и др.). Доступными для производства стали клетки барбариса – продуцента спазмолитика ятроризина, табака – продуцента убихинона-10. Весьма перспективны каллусные культуры древесных растений.

Перед высадкой проростков в грунт стимулируют корнеобразование с помощью индолилмасляной кислоты.

13.2. Поверхностное культивирование клеток растений

Осуществляют на полужидкой агаризованной среде, среде с добавлением других желеобразующих полимеров, на дисках из полиуретана, на мостиках из фильтровальной бумаги, полупогруженных в жидкую питательную среду. Можно также использовать комочки ваты, пропитанные питательной средой, которые сверху покрываются кусочком фильтровальной бумаги.

Для того, чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и дальнейшему росту, а также отмирания каллусных клеток, первичный каллус переносят на свежую питательную среду через 28 - 30 дней, то есть проводят пассирование или субкультивирование каллусной ткани.

При пассировании ткани на среду, содержащую индукторы органогенеза, клетки приступают к делению. Это приводит либо к формированию почек и побегов (геммогенез), либо к ризогенезу.

13.3. Культивирование клеток растений в глубинных условиях

Для глубинного культивирования растительных клеток применимы способы, разработанные в микробиологии.

Различают два вида систем культивирования:

1) *Закрытая система культивирования* – наиболее изучена и распространена. Для нее характерен периодический режим выращивания. При этом клеточная масса помещается в определенный объем среды. Система закрыта по всем параметрам, кроме газов, до конца выращивания. Периодически подается свежая питательная среда, а старая удаляется в том же объеме. Клетки остаются в системе в течение всего цикла выращивания.

2) *Открытая (проточная) система культивирования* – поступает свежая питательная среда, при этом отбирается старая питательная среда и часть урожая.

Первый крупномасштабный процесс по выращиванию культур клеток растений (воробейника) был осуществлен в начале 80-х годов для получения вторичного метаболита – шиконина. Это натуральный ярко-красный краситель, обладающий антисептическими свойствами. За один периодический процесс получается около 5 кг конечного продукта, который накапливается в клетках. На первой стадии клетки воробейника выращивают 9 суток в биореакторе объемом 200 литров на среде с подачей стерильного воздуха. Затем культуру переносят в биореактор меньшего размера со средой, которая стимулирует продукцию шиконина. В третьем реакторе на 750 л ферментацию ведут 2 недели. Клетки на первой стадии белые, на последней – красные. Стоимость красителя в 1983 г. составляла 4000 долларов за килограмм.

Суспензионные культуры используют для промышленного получения вторичных метаболитов, которые используются в медицине, парфюмерной промышленности, растениеводстве и других отраслях промышленности. Это – алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, пигменты, антиканцерогены, пептиды (ингибиторы фитовирусов). В настоящее время в разных странах в биосинтетической промышленности для получения экономически важных веществ используется около ста видов растений (женьшень, беладонна, паслен дольчатый, дурман обыкновенный, ландыш майский, клещевина, агава, мак снотворный и др.).

Вопросы для самоконтроля

- 1) Фитобиотехнология как раздел биотехнологии.
- 2) Объекты фитобиотехнологии.
- 3) Фитобиотехнологические процессы.
- 4) Термины «готипотентность» и «калус».
- 5) Компоненты питательных сред для культивирования клеток растений.
- 6) Методы стерилизации растительных биообъектов.
- 7) Способы предотвращения бактериального и грибного загрязнения питательных сред.
- 8) Техника поверхностного культивирования клеток растений.
- 9) Техника культивирования клеток растений в глубинных условиях.
- 10) Закрытая и открытая (проточная) система культивирования клеток растений в глубинных условиях.
- 11) Первый крупномасштабный процесс по выращиванию культур клеток растений.
- 12) Какие ценные вторичные метаболиты получают с использованием суспензионных культур?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
3. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2

Дополнительная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
2. **Пшеничникова, А.Б.** Основы биотехнологии: учебное пособие / А.Б. Пшеничникова. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 92 с.
3. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
4. **Тарангул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарангул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. <http://www.biotechnolog.ru>

Лекция 14

ТИПОВЫЕ ПРИЕМЫ И ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК - II

14.1. Иммуобилизация растительных клеток

Иммуобилизация клеток и тканей растений – это новый подход, направленный на увеличение выхода вторичных метаболитов. В 1966 г. Мосбаху впервые удалось зафиксировать клетки лишайника *Umbilicaria pustulata* в полиакриламидном геле.

Методы иммуобилизации клеток растений:

- *Иммуобилизация клеток или субклеточных органелл в инертном субстрате* – при этом клетки обволакиваются цементирующей средой (альгинат, агар, коллаген, полиакриламид).
- *Адсорбция клеток на инертном субстрате* – клетки прилипают к заряженным шарикам из альгината, полистирола, полиакриламида.
- *Адсорбция клеток на инертном субстрате с помощью биологических макромолекул* (например, лектин). Применяется редко.
- *Ковалентное связывание с другим инертным носителем*. Применяется редко.

Иммуобилизованные клетки имеют следующие преимущества перед каллусными и суспензионными культурами:

- Они образуют биомассу гораздо медленнее, чем клетки, растущие в жидких суспензионных культурах. Это способствует синтезу вторичных метаболитов.
- Клетки растут в тесном физическом контакте друг с другом. Это благоприятно отражается и на химических контактах.
- Выход вторичных метаболитов можно регулировать путем изменения химического состава окружающей среды.
- Удобство выделения вторичных метаболитов.

Существует 2 типа систем культивирования иммуобилизованных клеток: 1) *Система культуры с плоской основой* – клетки выращиваются в горизонтально расположенном сосуде; 2) *Система колоночной культуры* – клетки выращиваются в вертикальном сосуде.

В обеих системах жидкая среда циркулирует вокруг физически неподвижных клеток.

14.2. Сохранение культур клеток растений

Криосохранение – это замораживание при сверхнизких температурах. Обычно – в жидком азоте, при температуре - 196°C. Клетки для замораживания отбирают в середине экспоненциальной фазы ростовой кривой.

Предварительно проводят культивирование в особых условиях. В среду добавляют различные вещества, например: маннит или сорбит – для уменьшения размера вакуолей; аминокислота пролин – для связывания воды в клетке; диметилсульфоксид (ДМСО) – для увеличения проницаемости цитоплазматической мембраны.

Кроме того, применяют искусственное закаливание к холоду. При этом клеточные культуры выдерживают несколько суток при температуре +8 - +10°C, а затем до 6 недель при +2 - +5°C.

За час до замораживания в культуру вносят *криопротекторы* (сахароза, декстран, этиленгликоль, поливинилпирролидон, диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин). Они снижают повреждающее действие физико-химических факторов путем изменения проницаемости мембраны, а также точки замерзания и оттаивания.

Охлаждение проводят в два этапа: 1) От +20 до -35°C со скоростью 0,5 градусов в минуту, выдерживают при этой температуре 15 минут; 2) Погружение в жидкий азот (мгновенное охлаждение до -196°C).

Замораживание производят в ампулах объемом 1 мл.

Размораживают ампулы на водяной бане с температурой +37 - +40°C в течение 0,5 - 1 минуты.

После размораживания клетки отмывают 3 - 10 % раствором сахарозы.

Далее клетки проверяют на жизнеспособность сначала с помощью красителей, а затем по четкому возобновлению роста на стандартных питательных средах для данной культуры.

Замедление роста. Замедления роста можно добиться следующими методами:

- Изменение газового состава и атмосферного давления внутри культурального сосуда.
- Изменение светового режима.
- Охлаждение до температуры прекращения активного роста.
- Применение гормональных ингибиторов (хлорхолинхлорид).
- Применение осмотических ингибиторов (манит) и др.

Например, для картофеля рекомендуется клубнеобразование в пробирках.

14.3. Использование методов генетической инженерии в фитобиотехнологии

В генноинженерном эксперименте изолируют конкретный ген, включают его в наследственный аппарат растительной клетки и регенерируют растение с измененным наследственным признаком, которое способно приносить жизнеспособное потомство.

Объединение геномов клеток разных особей осуществляют:

1) *половая гибридизация* – известна давно, реализуется в природных и искусственных условиях, используется для выведения новых сортов растений и для повышения их продуктивности.

2) *соматическая гибридизация* – реализуется только в искусственных условиях. При этом соматические клетки предварительно лишают клеточной стенки и трансформируют в протопласты. Протопласты способны сохраняться и метаболизировать, а также реконструировать клеточную стенку в подходящих условиях. Они были впервые получены Дж. Клеркером в 1892 г. из листьев водного растения – телореза.

Протопласты получают следующими методами:

1) *механические методы* – 0,1% раствором сахарозы добиваются плазмолиза растительных тканей, затем разрезают эпидермис и освобождают протопласты в окружающую питательную среду.

2) *биохимические (энзиматические) методы* – при этом используют целлюлазы, пектиназы, гемицеллюлазы.

Протопласты используют для регенерации растения или для образования гетерокариотических гибридов. Относительно легко регенерируют из протопластов картофель, люцерна, маниок, рапс, табак.

Первые трансгенные растения были получены в 1983 г. Это – растения табака со встроенными генами из микроорганизмов, устойчивые к вирусной инфекции. Первые успешные полевые испытания этих трансгенных растений были проведены в США в 1986 г. Первые трансгенные продукты появились в продаже в США в 1994 г. (томаты с замедленным созреванием, гербицидустойчивая соя), а через 2 года еще и кукуруза, картофель, табак, рапс, кабачки, редис, хлопчатник. В настоящее время в США генетически модифицированные растения составляют около 50% посевов кукурузы и сои и более 40% посевов хлопчатника.

Первоначально трансгенные растения содержали дополнительные гены устойчивости (к болезням, гербицидам, вредителям, порче при хранении, стрессам). В настоящее время развивается "метаболическая инженерия". При этом ставится задача: научить растение производить новые соединения, используемые в медицине, химическом производстве и других областях.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Методы иммобилизации клеток растений.
- 2) Преимущества иммобилизованных клеток перед каллусными и суспензионными культурами.
- 3) Типы систем культивирования иммобилизованных клеток растений.
- 4) Сохранение культур клеток растений.
- 5) Криосохранение, криопротекторы.
- 6) Способы замедления роста.
- 7) Техника восстановления жизненных функций клеток после замораживания.
- 8) Использование методов генетической инженерии в фитобиотехнологии
- 9) Методы объединения геномов клеток разных особей.
- 10) Методы получения протопластов.
- 11) Трансгенные растения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
3. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2

Дополнительная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4

2. **Пшеничникова, А.Б.** Основы биотехнологии: учебное пособие / А.Б. Пшеничникова. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 92 с.
3. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
4. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. <http://www.biotechnolog.ru>

Лекция 15

ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

15.1. Протопласты: определение, применение

Протопласт – клетка, лишенная целлюлозной оболочки, окруженная цитоплазматической мембраной, сохраняющая все свойства, присущие растительной клетке.

Протопласты являются уникальной моделью для изучения фундаментальных физиологических проблем у растений. Они незаменимы при изучении состава, структуры и функционирования плазмалеммы в норме и при воздействии на нее гормонами, ингибиторами, фитотоксинами, а также при взаимодействии самих протопластов в популяции. Кроме того, протопласты могут использоваться для определения состава и архитектоники первичной клеточной стенки и изучения механизма ее репарации после разрушения.

Изолированные протопласты имеют ряд областей применения, как теоретического, так и прикладного характера:

1. Изучение химии и структуры клеточной стенки (и при разрушении, и при синтезе «de novo»).
2. Изучение свойств плазмалеммы, трансмембранных перемещений.
3. «Мягкое» выделение органелл.
4. Наблюдение за закономерностями дифференцировки клеток при слиянии протопластов, отслеживание взаимодействия ядра и цитоплазмы в полученной гибридной клетке, изучение соматических гибридов.
5. Введение чужих органелл.
6. Введение чужеродных генов в растительную клетку (трансгенез).

15.2. Способы выделения протопластов

Впервые протопласты в 1892 г. выделил Дж. Клеркер, который использовал *механический способ*. При этом способе у плазмолированных клеток разрезают клеточную стенку, протопласты выходят в среду. В настоящее время метод претерпел модификации, улучшен, но имеет ряд ограничений: невысокая производительность, можно использовать ткани только с экстенсивным плазмолизом, трудоемкость и длительность.

Другой метод выделения протопластов – *энзиматический способ*, с использованием ферментов. В 1952 году Салтон с помощью фермента лизоцима впервые разрушил клеточную стенку бактерий. В 1960 году Коккинг обработал кончики корней томата гидролитическим ферментом из культуральной жидкости плесневых грибов (*Myrothecium verrucaria*) и впервые получил изолированные протопласты высших растений энзиматическим способом.

Преимущества энзиматического метода по сравнению с механическим: одновременно выделяется большое количество протопластов (до 10 млн. из грамма ткани или клеток); клетки не подвергаются сильному осмотическому стрессу; клетки не повреждаются; метод сравнительно быстрый.

Для удаления клеточной стенки используют ферменты трех типов: целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы. Комбинация ферментов и их соотношение специфично для каждого типа клеток.

Выделение протопластов проводят в три этапа: 1) обработка ферментами; 2) выделение протопластов из клеточных стенок; 3) отделение интактных протопластов от клеточных осколков.

**Стандартная методика получения протопластов (по Такебе)
(из тканей листа *Nicotiana tabacum*)**

Зрелый, сформировавшийся лист отделяют от взрослого растения в возрасте 60 - 80 дней, окунают в 70% этанол, а затем помещают на 15 - 20 минут в 10% раствор гипохлорита кальция и многократно промывают дистиллированной водой. С помощью пинцета нижний эпидермис снимают, очищенные от эпидермиса листья разрезают скальпелем на небольшие кусочки площадью 4 см². Для лучшего снятия эпидермиса листья должны немного подвять, можно также ограничить снабжение водой перед срезанием листьев.

Далее ткань обрабатывают последовательно или одновременно пектиназой, вызывающей мацерацию, и целлюлазой, разрушающей клеточные стенки. Оптимальная концентрация ферментов, как и время обработки, индивидуальны для разных тканей. Протопласты должны находиться в растворе ферментов минимальное количество времени, после чего следует тщательная промывка. Ферменты стерилизуют через бактериальные фильтры.

Регуляция водообмена клетки связана с наличием клеточной стенки. Когда протопласт "голый", один из компонентов регуляции водообмена теряется, поэтому важное значение приобретают осмотические свойства среды выделения и культивирования. Среда должна быть немного гипертонической, чтобы протопласты находились в слегка плазмолизированном состоянии. Эти условия тормозят метаболизм и регенерацию клеточной стенки. В качестве осмотических стабилизаторов используют сахара (глюкозу, маннит, сорбит, ксилозу), ионные осмотики (CaCl₂, KCl) в концентрации 0,3 - 0,8 моль/литр. Концентрации подбираются индивидуально для каждого растительного объекта.

Удобнее обрабатывать ткани ферментами в чашке Петри, которую держат под углом 15°. Смесь ферментов с протопластами переносят в центрифужные пробирки. Отделить протопласты от ферментативной смеси можно двумя способами: либо фильтрация с центрифугированием, либо флотация.

При фильтрации смесь пропускают через фильтры с размерами пор 40 мкм. На фильтре при этом остаются комки клеток и их большие осколки. При дальнейшем центрифугировании оседают протопласты, осколки остаются в супернатанте. При повторном центрифугировании идет отмывка от фермента, после чего протопласты переносятся в среду для культивирования.

Метод флотации предложен О. Гамборгом с сотрудниками в 1981 году, и предназначен для ослабленных протопластов. Он основан на том, что протопласты имеют более низкую плотность, чем органеллы или остатки клеточных стенок. К исходной смеси добавляют раствор сахарозы и центрифугируют при скорости от 40 – 80 до 350 g. Чистые протопласты плавают, осколки оседают на дно.

Протопласты можно выделять также из суспензионных и клеточных культур. Лучше всего – в поздней стадии логарифмического роста, когда клеточные стенки легче поддаются разрушению, протопласты наиболее жизнеспособны.

Далее протопласты культивируют в тех же условиях, что и клетки. Состав солей может быть несколько изменен. Среда состоит из осмотического стабилизатора, неорганических соединений, источника углерода, азота, витаминов, фитогормонов. Условия

культивирования: рН среды 5,4 - 5,8, температура 22 - 28°C, невысокая освещенность (не более 2000 лк).

15.3. Способы культивирования протопластов

Существуют два способа культивирования протопластов: метод жидких капель и метод платирования.

В первом случае суспензию протопластов в виде капель помещают на пластиковые чашки Петри. Вариацией этого способа является культивирование единичных изолированных протопластов в микрокаплях объемом 1 мкл, предложенное Ю. Глебой в 1978 г.

Во втором – суспензию протопластов наливают в пластиковые чашки Петри, добавляют равный объем той же среды с 1% агаром при температуре не выше 45°C. После остывания чашки Петри переворачивают и культивируют при 28°C. В данном случае протопласты фиксированы в одном положении и физически отделены друг от друга. Это дает возможность наблюдать за развитием интактного протопласта: формированием клеточной стенки, делением, ростом и развитием растения. Вариантом этой техники является использование кормящих протопластов или клеток, подвергнутых воздействию рентгеновского или γ -излучения, что блокирует их способность к делению. Такие протопласты или клетки смешивают с жизнеспособными протопластами и они поддерживают и стимулируют их рост.

Сразу после удаления раствора фермента начинается образование клеточной стенки. Труднее добиться деления клеток и регенерации растений. Регенерация растений осуществляется либо через эмбриогенез, либо через развитие каллуса с дальнейшей индукцией морфогенеза. Добиваются этого добавлением в среду ауксинов или сочетания ауксинов с цитокининами.

На пролиферацию клеток, возникших из протопластов, влияет 4 фактора: видовая специфичность и физиологическое состояние исходной ткани растения; способ и условия выделения протопластов; плотность высева протопластов; состав питательной среды.

15.4. Слияние протопластов (парасексуальная гибридизация)

Изолированные протопласты, еще не образовавшие клеточной стенки, могут сливаться между собой. Слияние протопластов – своеобразный метод гибридизации, так называемая парасексуальная, или соматическая гибридизация. В отличие от обычной, где сливаются половые клетки (гаметы), в качестве родительских при парасексуальной гибридизации используются диплоидные клетки растений. Внеядерные генетические детерминанты у большинства высших растений наследуются в половом процессе строго одноядерно и матерински.

Техника парасексуальной гибридизации может позволить:

- скрещивание филогенетически отдаленных видов растений (организмов),
- получение асимметричных гибридов, несущих генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами, органеллами или цитоплазмой другого,
- слияние трех и более клеток,
- получение гибридов, представляющих сумму генотипов родителей,
- перевод мутаций в гетерозиготное состояние, что позволяет получать жизнеспособные формы при слиянии протопластов, поскольку мутагенез довольно часто дает дефектное по морфогенезу растение,

- получение растений, гетерозиготных по внеядерным генам и др.

Парасексуальная гибридизация важна для анализа как ядерных генов, так и внеядерных геномов. Цитоплазматический геном кодирует ряд признаков – скорость фотосинтеза, устойчивость к патогенам, абиотическим факторам и т. д. Наличие косегрегация генов (признаки, контролируемые внеядерным геном, сегрегируют совместно) свидетельствует о физическом сцеплении генов.

Слияние бывает *спонтанным* (чаще у протопластов из молодых тканей или суспензионных культур) и *индуцированным*. Для стимуляции слияния протопластов предложен ряд методов, как физических, так и химических.

При физическом способе слияния протопластов, разработанном Г. Циммерманом с сотрудниками в 1981 году, протопласты помещают в камеру с неоднородным электрополем. На электродах образуются агрегаты из 2 - 3 протопластов, либо цепочки из 5 - 6 протопластов между электродами. Дополнительный единичный импульс постоянного тока приводит к образованию пор в сильно сжатых мембранах, происходит перетекание цитоплазмы, так как переменный ток удерживает протопласты вместе некоторое время, и протопласты в таких агрегатах сливаются. Затухающий ток приводит к возвращению сферической формы у слившихся протопластов.

В основе слияния лежит различное действие постоянного и переменного электрического тока на плазмалемму. Постоянное эклектическое поле сжимает мембраны, ведя к их локальному разрушению, а переменное электрополе вызывает латеральную диффузию белков мембраны, образуя свободные от гликопротеидов липидные области, где противоположные мембраны могут установить контакт.

Чаще для индукции слияния протопластов используют методику «ПЭГ – высокие значения рН - высокая концентрация Ca^{2+} », которая дает до 50% слившихся протопластов (рН 9 - 11, концентрация Ca^{2+} 100 - 300 ммоль/л). В присутствии полиэтиленгликоля наблюдается сильная адгезия протопластов, после удаления полиэтиленгликоля и добавления кальция - их слияние. Предполагают, что рН и ионы кальция увеличивают текучесть мембран, что связано с их жидкостно-мозаичной структурой.

При слиянии протопластов различных растений, например, А и В, могут с равной вероятностью образовываться комбинации АА, ВВ и АВ. Желаемый продукт слияния – АВ, поэтому разрабатываются способы увеличения частоты слияния именно такого типа и избирательного выделения только продукта слияния АВ. Один из таких методов заключается в следующем. Поверхность протопласта обычно несет отрицательный заряд. Путем обработки ее фосфолипидом, несущим положительный заряд, можно временно придать поверхности протопласта положительный заряд. Если теперь протопласты А, имеющие положительный заряд, смешать с необработанными протопластами В, несущими отрицательный заряд, то будут в основном образовываться комбинации АВ в результате притяжения разноименных зарядов.

Разработаны также методы маркирования протопластов того или иного растения с помощью разных флуоресцентных красителей. Если обработать протопласты одного растения флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), а протопласты другого растения родаминозотиоцианатом (RITC), то можно, не изменяя активности клеток, пометить их желто-зеленой (FITC) или красной (RITC) флуоресценцией. Гибриды, образовавшиеся путем слияния разных типов клеток, будут иметь оба цвета флуоресценции – желто-зеленый и красный.

Протопласты могут сливаться как попарно, так и в большем количестве. Многоядерные продукты слияния, как правило, разрушаются. Первое сообщение о получении

соматических гибридов на уровне растений появилось в 1972 году (Карлсон и коллеги), в нашей стране подобное осуществили в лаборатории Бутенко Р.Г. в 1975 году.

Судьба геномов (ядерного и цитоплазматического) после слияния протопластов может быть различной:

1. Ядерные генетические детерминанты наследуются как дву-, так и однородительно. В последнем случае ядра не сливаются и впоследствии сегрегируют в процессе клеточных делений.

2. Внеядерные генетические детерминанты наследуются двуродительно. При этом в межвидовых комбинациях прослеживается тенденция к соматическому выщеплению и элиминации одного из родительских цитоплазматических геномов.

3. Возникновение гибридных клеток и растений в результате слияния более чем двух родительских клеток.

Слияние протопластов приводит либо к образованию гибрида, либо к образованию цибрида. *Соматический гибрид* – продукт слияния и цитоплазмы, и ядра обоих протопластов. *Цибрид* (цитоплазматический гибрид) – растение-регенерант, содержащее цитоплазму обоих родителей и ядро одного из них. Цибриды получают, облучая перед слиянием один из протопластов γ -лучами для разрушения ядра. Скрининг таких клеток проводится по генам – маркерам ядерного и цитоплазматических (митохондриального и хлоропластного) геномов. Есть указания на рекомбинацию ДНК митохондрий и хлоропластов в гибридных клетках (Ю.Ю. Глеба, К.М. Сытник, 1984).

При слиянии могут образовываться и так называемые *асимметричные гибриды* – продукты слияния, имеющие полный хромосомный набор одного из партнеров и часть хромосом другого партнера. Такие гибриды часто возникают при слиянии клеток организмов, филогенетически удаленных друг от друга. В этом случае вследствие неправильных делений клетки, обусловленных некоординированным поведением двух разнородных наборов хромосом, в ряду поколений теряются частично или полностью хромосомы одного из родителей. Асимметричные гибриды бывают устойчивее, плодовитее и жизнеспособнее, чем симметричные, несущие полные наборы генов родительских клеток. В целях асимметричной гибридизации возможна избирательная обработка клеток одного из родителей для разрушения части его хромосом. Возможен прицельный перенос в клетку нужной хромосомы.

Гибриды могут быть получены путем слияния трех и более родительских клеток. Из таких гибридных клеток могут выращены растения – регенеранты.

15.5. Виды соматических гибридов

Впервые зрелый *межвидовой гибрид*, полученный в результате парасексуальной гибридизации протопластов 2 сортов табака (*Nicotiana glauca*, с 24 хромосомами и *N. langsdorfii* с 18 хромосомами), описан Карлсоном в 1972 г. Каллус амфиплоидного гибрида мог расти на безгормональной среде. Гибридное растение цело. С тех пор были получены жизнеспособные внутривидовые, межвидовые, межродовые гибриды.

Осуществлено слияние протопластов культурного картофеля сорта Приекульский ранний (*Solanum tuberosum*) с протопластами дикого картофеля (*S. chacoense*). Известно, что у дикого картофеля клубни очень мелкие. Вместе с тем, растение устойчиво ко многим заболеваниям. Картофель сорта Приекульский ранний образует крупные клубни, но растения этого сорта восприимчивы к болезням. Размеры протопластов у этих растений разные. Соматические гибриды по форме листьев и кустов, размеру клубней занимали промежуточное положение между культурными и дикими растениями. Вме-

сте с тем гибрид, полученный в результате соматической гибридизации, оказался устойчивым к вирусу «У», чем отличался от полового гибрида.

Первая попытка по созданию **межродовых гибридов** принадлежит Г. Мельхерсу, создавшему в 1978 году гибрид картофель + томат, так называемый томатофель. Гибрид был стерилен, морфологически аномален: толстые корни, отсутствие типичных столонов, махровые цветки. Было еще несколько попыток получения таких гибридов, но все растения стерильны. Эти эксперименты показали ограниченность применения парасексуальной гибридизации для прикладной селекции. Японскими исследователями (Х. Кисака с соавт., 1997) путем электрослияния протопластов ячменя и риса был получен межродовой соматический гибрид. Протопласты риса получали из суспензионной культуры, а протопласты ячменя были изолированы из молодых листьев. Часть полученных каллусов сформировали зеленые участки и побеги. Только один побег сформировал корни, и это растение было успешно перенесено в почву. По морфологии было близко к растениям риса. Цитологический анализ показал, что растение имело и маленькие хромосомы от риса, и большие от ячменя. Были проанализированы также митохондриальная и хлоропластная ДНК. Растение содержало новые последовательности и в митохондриальной, и в хлоропластной ДНК, которые не обнаруживались ни в одном из родителей.

Ю.Ю. Глебой с сотрудниками проводились многочисленные эксперименты по созданию **межтрибных гибридов**. Триба – таксономическая единица между семейством и родом. Получены удачные гибриды между *Arabidopsis* и *Brassica* (турнепс) - *Arabidobrassica*. У гибридных линий индуцировали морфогенез корней и растения. Растения генетически и морфологически униформны, не цвели. На вид – уродливы, очень много тератомоподобных образований, похожих на цветки.

Была осуществлена гибридизация 2-х родов пасленовых *Datura innoxia* + *Atropa belladonna*. Удалось регенерировать растения. Во всех случаях выявлены хромосомы обоих родительских видов. Амфиплоиды оказались неспособны к стеблевому морфогенезу, в линиях с полиплоидным и анеуплоидным наборами хромосом получали аномальные стебли. Регенерировавшие растения были стерильны, похожи на дурман, но содержали небольшое количество хромосом красавки.

В других экспериментах сливали протопласты красавки с каллусными клетками китайского табака. Получили 12 клонов. В клетках всех клонов обнаружили хромосомные типы обоих родителей, через год только у двух клонов происходила полная элиминация хромосом красавки.

Морковь + сныть: из образовавшейся каллусной ткани через полгода регенерировали аномальные растения. Одно из них цвело, но у цветка отсутствовали пыльники и пестик.

Интересные эксперименты были проведены в этой же лаборатории по гибридизации хлорофиллдефектного табака с красавкой. После слияния получили 40 фотосинтезирующих колоний, из них 4 клеточных линии дали нормальные растения красавки, 4 – аномальные по морфологии гибриды табак + красавка, остальные – зеленые, иногда пестролистные растения, идентичные табаку, которые цвели, давали семена. Они содержали хромосомы табака и пластиды красавки. Это были первые фертильные межтрибные гибриды.

Первые работы по получению **межсемейственных гибридов** проведены К. Као и В. Веттером в 1976-77 гг. (соя + табак). Позднее в лаборатории Ю.Ю.Глебы провели аналогичные эксперименты пасленовые + бобовые и лилейные (горошек + табак и лук +

табак). И.Ф. Каневскому удалось индуцировать морфогенез стеблеподобных тератом в культуре межсемейственных гибридов *N. tabacum* + *Vicia faba*.

Практически во всех случаях наблюдалась видоспецифичная элиминация хромосом одного из родителей. В культурах межсемейственных гибридов наблюдалось много многоядерных клеток, клеток с мини ядрами, в метафазах делений встречались гигантские хромосомы. Отмечена асинхронность в расхождении родительских хромосом в анафазе. Морфогенез у такого материала отмечен не был.

Для отдаленных гибридов характерно:

1. Относительная стабильность гибридного состояния, при котором не наблюдается полной элиминации генетического материала одного из родителей.

2. Генетические перестройки (реконструкция и частичная элиминация хромосом).

3. Генетическая разнокачественность клонов гибридных клеток.

4. Ограниченная морфогенетическая способность.

Изучение *межцарственных гибридов* клеток «животное + растение» показало, что на этапе слияния видоспецифичность не проявляется, поэтому можно слить даже животную и растительную клетки. На более поздних этапах онтогенеза эти различия сказываются, что было установлено в экспериментах по слиянию протопластов арабидопсиса и табака с лимфоцитами человека. При этом происходило слияние цитоплазмы, ядра не сливались. Эдвард Коккинг параллельно проводил изучение ультраструктуры таких гибридов, работая с клетками амфибий и протопластами моркови. После объединения клеток ядра амфибии были окружены тонким слоем собственной цитоплазмы, но уже через 48 часов отмечалось полное смешивание цитоплазмы и регенерация клеточной стенки вокруг гетерокариона.

15.6. Гибридная технология

В 1960 г. при совместном культивировании удалось слить две линии опухолевых клеток мыши и получить новый тип клеток. Эти клетки отличались от родительских по морфологическим характеристикам, особенностям роста, имели суммарное число хромосом и хромосомные маркеры родительских клеток. Частота слияния была очень низкой. Однако удалось увеличить эффективность слияния с помощью инактивированного вируса Сендай (син. вирус мышей гемагглютинирующий японский. Это парамиксовирус, патогенный для мышей; обладает способностью модифицировать мембраны зараженных клеток, что приводит к их слиянию. Вирусные частицы, инактивированные ультрафиолетом, широко используются для получения соматических клеточных гибридов), полиэтиленгликоля и др. Однако, если сливали клетки филогенетически удаленных организмов (мышь – человек, мышь – обезьяна), то хромосомы человека и обезьяны в основном утрачивались.

Постепенно возникло представление о том, что если гибридизировать какую-либо клетку с определенной линией лимфоцитов, то в принципе можно было бы получить химеру (в греческой мифологии – чудовище с головой и шеей льва, туловищем козы, хвостом в виде змеи; животные или растения, разные клетки которых содержат генетически разнородный материал), которая продуцировала лишь один тип антител – моноклональные антитела. В то время как обычно иммунный ответ организма на антиген сопровождается выработкой смеси антител, что не позволяет иметь набор специфических антител.

Позднее был создан метод получения однородных антител путем слияния злокачественных клеток костного мозга (миеломы) и лимфоцитов из селезенки мыши,

иммунизированной эритроцитами барана. Полученные путем слияния антителообразующих и опухолевых клеток, клетки-химеры назвали *гибридомами*. Они наследовали способность к неограниченному росту в культуре как опухолевые клетки и в то же время к продукции антител определенной специфичности (моноклональных антител).

В настоящее время получены моноклональные антитела (МКА), которые направлены против антигенов малого размера, белков (включая ферменты), углеводов и гликолипидов, вирусов и компонентов клеточной мембраны.

Схема гибридной технологии:

1. получение миеломных клеток, которые погибают при последующей селекции гибридных клеток;
2. получение из селезенки иммунизированных лимфоцитов – продуцентов антител к заданным антигенам;
3. слияние миеломных клеток с лимфоцитами (вирус Сендай, полиэтиленгликоль, лизолецитин, электрический импульс);
4. скрининг (от англ. *screening* – просеивание, отбор) гибридных клеток;
5. проверка гибридом на способность продуцировать МКА;
6. клонирование гибридных клеток, прошедших проверку на образование МКА;
7. получение массовых культур гибридных клеток.

Применение гибридом:

- диагностика – идентификация определенного гормона, вирусных или бактериальных антигенов, антигенов группы крови и тканевых антигенов);
- точное определение дозы лекарств;
- распознавание злокачественных опухолей разной локализации;
- выделение биологически активных веществ из сложных смесей (белков, гормонов, токсинов);
- очистка препаратов (интерферонов);
- изучение взаимодействия специализированных клеток (нейронов, клеточных мембран);
- изготовление высоко специфических вакцин (против определенных вирусных штаммов и различных паразитов);
- нейтрализация действия лимфоцитов, которые ответственны за отторжение трансплантата.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Слияние протопластов (парасексуальная гибридизация).
- 2) Возможности парасексуальной гибридизации.
- 3) Спонтанное и индуцированное слияние.
- 4) Методы маркирования протопластов.
- 5) Судьба геномов (ядерного и цитоплазматического) после слияния протопластов.
- 6) Соматический гибрид.
- 7) Цибрид.
- 8) Асимметричные гибриды.
- 9) Виды соматических гибридов.
- 10) Межвидовой гибрид.

- 11) Межродовой гибрид.
- 12) Межтрибные гибриды.
- 13) Межсемейственные гибриды.
- 14) Междарственные гибриды.
- 15) Гибридомная технология.
- 16) Схема гибридомной технологии.
- 17) Применение гибридом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
3. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2

Дополнительная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
2. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
3. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. <http://www.biotechnolog.ru>

Лекция 16

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ - I

16.1. Традиционные методы селекции. Методы селекции микроорганизмов

Селекция (от латинского *selectio* – выбор, отбор) – практические приемы и методы выведения новых и улучшения существующих сортов растений и пород животных и получения полезных видов микроорганизмов, дающих при определенных условиях наибольшее количество полезной для человека продукции. Селекционные объекты получают на основе двух свойств – изменчивости и наследственности. Теоретической основой селекции является генетика. В результате селекции получают мутанты, наследственность которых изменена.

Методы селекции

Метод спонтанных мутаций. Так были отобраны штаммы пивных, винных, пекарских дрожжей, уксуснокислых, пропионовокислых бактерий и др. Однако частота спонтанных мутаций невелика. Чтобы возникла мутация ген должен удвоиться 10^6 - 10^8 раз.

Индукцированный мутагенез. Для его проведения используются следующие подходы:

- в протоке лимитируется количество какого-либо субстрата. Так, если в среде культивирования *E. coli* уменьшается содержание лактозы, то это приводит к накоплению мутантов с более высокой активностью β -галактозидазы, вследствие амплификации генов лактозы;
- применяют физические мутагены, которые способны повреждать ДНК (ультрафиолетовое, рентгеновское или γ -излучение);
- используют химические мутагены: ингибиторы предшественников нуклеиновых кислот (азогуанин, азосерин, кофеин); аналоги азотистых оснований нуклеиновых кислот (5-бромурацил, 5-хлорурацил, 2-аминопурин); алкилирующие соединения (диметилсульфат, окись пропилена, фенол, формальдегид);
- используют биологические факторы (фаги).

После получения мутаций отбирают наиболее продуктивные клоны, которые вновь подвергают воздействию тех или других мутагенов и т.д., т.е. проводят ступенчатый отбор по интересующему признаку. Однако этот метод трудоемок и не позволяет достоверно судить о характере возникших изменений.

Метод отбора продуцентов по их устойчивости к структурным аналогам целевого продукта. Метод основан на регуляции активности ферментов по принципу обратной связи. Так, микроорганизмы синтезируют азотсодержащие соединения только из глюкозы и ионов аммония. При добавлении в среду культивирования, например, аминокислоты синтез аминокислот прекращается. У сверхпродуцентов фермент сохраняет свою активность и не реагирует на ингибирующее действие конечного продукта, или синтез фермента оказывается устойчивым к избытку продукта или его аналога. Так, мутантные клеточные клоны моркови устойчивые к этионину (аналог метионина) синтезировали в 20 раз больше метионина, а резистентные к 5-метилтрипрофану – в 30 раз больше триптофана.

При селекции микроорганизмов необходимо учитывать ряд их особенностей:

- каждая клетка при выращивании образует клон, т.е. совокупность генетически однородных особей. Однако, вследствие естественных мутаций, в клоне развивается гетерогенность и он превращается в популяцию (совокупность клеток с разными генотипами);

- у микроорганизмов нет скрытой изменчивости;
- для микроорганизмов не характерно половое размножение, поэтому селекцию клеток можно проводить только вегетативным путем;
- отбор положительных мутантов проводится быстрее и эффективнее благодаря быстрой смене поколений микроорганизмов.

Для селекции микроорганизмов используют музейные культуры, известные промышленные продуценты или выделяют микробы из природных субстратов.

Главные этапы селекции микроорганизмов: выбор объекта селекции; получение ценного продуцента; мутагенез; рекомбиногенез (скрещивание, слияние клеток, генная инженерия, конъюгация, трансформация, трансдукция); отбор (естественный, искусственный); стабилизация свойств штаммов, полученных в результате селекции; консервация.

16.2. Принципы селекции микроорганизмов

Мутационная изменчивость. Это естественный фактор эволюции. В популяции клеток в каждом поколении по каждому гену обнаруживается $10^5 - 10^7$ мутантных клеток. Благодаря спонтанным мутациям микроорганизмы легко приспосабливаются к новым условиям существования. Частота мутаций возрастает после действия мутагенных факторов. Индуцированные мутации позволяют получить биообъект с высокими полезными продуктивными свойствами.

Так, мутанты некоторых прототрофов становятся способными к синтезу необычных продуктов. Так, если *Streptomyces griseus* синтезирует хлортетрациклин, то мутант полученный на его основе – тетрациклин.

Мутационные изменения приводят к физиологическим и морфологическим изменениям клетки. Поэтому у мутанта становятся иными требования к питательной среде и к условиям культивирования. У суперпродуцентов положительные мутанты встречаются реже, т.к. их геном уже насыщен мутациями.

Отбор положительных мутантов. Для этого проверяют тысячи мутантных культур, используют скрининговые методы или естественный отбор. Например, хересные винные дрожжи (*Saccharomyces oviformis*), при переокислении спирта образуют продукты, которые придают вину хересный букет. Но такие дрожжи чувствительны к концентрациям спирта выше 15%. Так, при длительном повышении содержания спирта до 18% и пользуясь методом естественного отбора, удалось выделить штамм, который образует херес при повышенных концентрациях спирта.

Положительные мутанты можно выделять успешнее, если знать особенности их метаболизма. При этом можно увеличить частоту получения положительных мутантов путем использования химических или биохимических факторов: селективная детоксикация питательного субстрата; добавление в питательную среду ингибитора целевого продукта; увеличение проницаемости клеточной мембраны; усиление выведения продукта из клетки; использование ауксотрофных мутантов; применение катаболитной репрессии; перевод ферментов из категории индуцируемых в разряд конституционных и т.д.

Так, при селективной детоксикации питательного субстрата токсические вещества взаимодействуют с продуктом сверхсинтеза. В результате детоксицируется субстрат и сохраняется выживаемость мутанта. Так получают бета-лактамы антибиотики, которые комплексируются с ионами тяжелых металлов или с токсическими аналогами аминокислот.

Гибридизация микроорганизмов. Ранее этот метод селекции применялся редко, так как для микроорганизмов не свойственно скрещивание (половое размножение). Например, при гибридизации грибов используют вегетативную гибридизацию, которая аналогична половому процессу размножения. При этом генетический материал двух вегетативных клеток грибов обменивается при клеточном слиянии (парасексуальный цикл). Этот процесс можно оптимизировать методами клеточной инженерии.

Другой вид гибридизации – *слияние протопластов*. Протопласты – это клетки, лишенные клеточной стенки. Ее можно удалить следующими способами: выращивание клеток в присутствии антибиотиков, которые препятствуют образованию клеточной стенки; действие ферментом лизоцимом или комплексом ферментов микробного генеза (“дрожжелитин”).

Слиянию протопластов способствуют некоторые стимуляторы (полиэтиленгликоль). В гибридах затем легко образуется нормальная клеточная стенка.

Гибридизация микроорганизмов позволяет:

- интегрировать в одной клетке нужные свойства двух и более штаммов или видов. Так, дрожжи штамма *Saccharomyces cerevisiae* были скрещены с пивными дрожжами вида *Saccharomyces carlsbergensis*. Полученный гибрид полностью гидролизует раффинозу до моносахаридов. Это не было характерно для родительских видов дрожжей;

- отбирать рекомбинанты второго поколения, т.е. после рекомбинации хромосом. При этом появляются клетки с новыми свойствами. Так, пивные дрожжи, сбраживающие сахарозу и мальтозу скрестили с дикими штаммами дрожжей, которые не сбраживали оба дисахарида. Получили гибрид, который не сбраживал сахарозу, но ассимилировал мальтозу. Такие клоны гибридов применяют при изготовлении “бархатного” пива (с несброженной сахарозой) и кваса;

- ввести в геном микроорганизма мутации других штаммов. Это сокращает длительность ступенчатого отбора. Так был получен штамм *E. coli* для производства треонина;

- инокулировать в бактерию гены, которые не характерны для данного вида или увеличить число уже существующих генов. Это повышает продуктивность микроорганизма по данному гену. Например, в *E. coli* были введены гены, определяющие синтез амилазы, целлюлазы, сахаразы и т.д.

16.3. Селекция продуцентов антибиотиков, органических кислот и ферментов

Антибиотики – наиболее значительный класс фармацевтических препаратов, который синтезируется микроорганизмами. Образование антибиотиков представляет собой длинную цепь ферментативных реакций, кодируется 15-30 генами. Современные антибиотики получены благодаря многоступенчатому подбору и селекции продуцентов.

Например, биосинтетическая активность природных продуцентов пенициллина не

превышала сначала 5-20 мг антибиотика в 1 л питательного субстрата. Затем был обнаружен мутант *Penicillium chrysogenum*, который производил 60 мг/л пенициллина. Это позволило провести первые клинические испытания. Далее была разработана последовательность методов получения суперпродуцента: спонтанная мутация (150 мг/л), радиационная обработка (300 мг/л), действие ультрафиолетовых лучей (550 мг/л), комбинированное воздействие ультрафиолетового облучения и этиленimina (5-7 г/л) и т.д. В настоящее время используются продуценты, которые производят 20-25 г/л пенициллина. Это в 10-12 тысяч раз больше, чем продуктивность первых культур.

Для получения новых антибиотиков используют *мутасинтез*. При этом продуцент синтезирует только часть лекарства. Недостающий фрагмент получают химическим путем, затем вносят его в среду культивирования, а мутант завершает синтез антибиотика. Так получают полусинтетические антибиотики.

Путем воздействия нитрозаминами, ультрафиолетовыми лучами, ионизирующим излучением был получен высокопродуктивный штамм Р-3 *Aspergillus niger*. Он давал выход лимонной кислоты 98-99% от количества ассимилированной сахарозы. Аналогичным путем был получен штамм Л-3 *Lactobacillus delbrueckii*. Он стабилен, не нуждается в искусственном мутагенезе, выход молочной кислоты составляет 95-98 % от количества усвоенной сахарозы.

Селекция продуцентов ферментов – трудная задача. Это обусловлено сложностью строения ферментов, многообразием механизмов их регуляции, значительной термолабильностью и др. Обычно активность биосинтеза ферментов удается повысить лишь в 3-5 раз по сравнению с исходными культурами. Однако, повысить продуктивность биообъекта по выработке ферментов в десятки раз можно путем сочетания методов селекции микроорганизмов с методами генетической и клеточной инженерии. Так, была увеличена способность *E. coli* к биосинтезу α -амилазы в 200 раз.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Понятие «селекция».
- 2) Метод спонтанных мутаций.
- 3) Индуцированный мутагенез.
- 4) Метод отбора продуцентов по их устойчивости к структурным аналогам целевого продукта.
- 5) Главные этапы селекции микроорганизмов.
- 6) Мутационная изменчивость.
- 7) Отбор положительных мутантов.
- 8) Гибридизация микроорганизмов.
- 9) Основные принципы селекции продуцентов антибиотиков, органических кислот и ферментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.

3. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2

Дополнительная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
2. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
3. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. <http://www.biotechnolog.ru>

Лекция 17

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ - II

17.1. Генетическая инженерия, ее методы и задачи

Генетическая инженерия – это методы получения рекомбинантных ДНК (рДНК), которые объединяют последовательности нуклеотидов разного происхождения. Генетическую инженерию подразделяют на генную, геномную и хромосомную инженерию.

Генная инженерия – целенаправленное изменение естественных генетических характеристик известных вирусов и клеток. Таким методом осуществляют перестройку генома *in vivo* или *in vitro* для получения белковых продуктов (пептидных гормонов, ферментов и др.).

Геномная инженерия – целенаправленная глубокая перестройка генома акариот, прокариот и эукариот, в т.ч. вплоть до создания новых видов. Так, при слиянии половых гамет получают половые гибриды, а при слиянии неполовых клеток – соматические гибриды. В природе такая рекомбинация происходит постоянно. Например, это характерно для вируса гриппа А.

В лабораторных условиях можно совместить геномы разных клеток, например, клеток моркови и ячменя, кукурузы и сои, картофеля и томата, мыши и моркови, мыши и человека и т.д. Однако, чем дальше такие клетки отстоят друг от друга в эволюционном отношении, тем менее они жизнеспособны. Геномную инженерию используют для расширения рамок скрещивания, для переноса внеядерных генов (плазмиды) в генотип, для локализации генов в хромосомах. Геномная инженерия лежит в основе создания гибридом.

Хромосомная инженерия – перенос изолированных хромосом от клетки-донора одного организма в клетку-реципиент другого организма. Хромосомную инженерию используют для получения биологически активных веществ (БАВ), для лечения наследственных заболеваний, селекции пород домашних животных, а также растений.

Генетическая инженерия позволяет решать следующие задачи:

- модифицировать продуцент и улучшать его эффективность без введения новой генетической информации;
- выделять заданный ген и получать мутации, которые способствуют интенсификации биосинтеза продукта;
- расширять спектр дешевых субстратов (молочная сыворотка, целлюлозосодержащие отходы и пр.);
- создавать штаммы микроорганизмов, которые способны утилизировать ксенобиотики, продукты переработки нефти и другие загрязнители окружающей среды;
- вносить в микроорганизмы половые плазмиды, которые обеспечивают возможность скрещивания;
- вносить гены других групп организмов и получать продукты этих генов;
- конструировать новые гены и получать ранее неизвестные белки.

Для выполнения задач генетической инженерии необходимо создать рекомбинантные ДНК (рДНК). В этой технологии выделяют следующие этапы: получение чужеродной ДНК; разрезание полученной ДНК на фрагменты и их очистка; включение фрагмента чужеродной ДНК в векторную плазмиду и получение рДНК;

введение рДНК в компетентные клетки и клонирование генов; амплификация и экспрессия рДНК.

17.2. Получение фрагментов чужеродной ДНК и их очистка

Источники ДНК – геном животных и растительных клеток, плазмиды, вирусы, фаги и др.

Получить ген можно следующими способами:

- Расщепление геномной ДНК рестриktionными эндонуклеазами, или рестриктазами (от лат. *restrictio* – ограничение; группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих реакцию гидролиза нуклеиновых кислот). Эти ферменты разрезают ДНК в определенных местах (сайтах).
- Искусственный синтез генов. В основе его лежит способность триплета нуклеотидов кодировать синтез определенной аминокислоты. Зная последовательность аминокислот в каком-либо пептиде, можно сконструировать соответствующую последовательность нуклеотидов. Таким образом удается получить лишь небольшие гены, например, кодирующие биосинтез короткого полипептида – соматостатина.
- Использование мРНК. С этой целью из клетки эукариот выделяют мРНК и на ней, как на матрице, при помощи фермента обратной транскриптазы или ревертазы инициируют синтез комплементарной копийной ДНК (кДНК). После этого на кДНК синтезируют вторую полинуклеотидную цепь, создавая двуспиральную ДНК.

В любом случае сразу получить готовый ген практически не удастся. Необходимо удалять или досинтезировать определенные участки, приспособив ДНК к синтезу нужного продукта.

Для получения рекомбинантных ДНК используют ряд ферментов:

ДНК-полимеразы. Катализируют синтез дочерней нити ДНК на уже существующей матрице ДНК. Чаще всего используют ДНК-полимеразу I, изолированную из *E. coli*.

ДНК-лигазы. Соединяют фрагменты ДНК путем восстановления фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами. С помощью ДНК – лигазы, например, фага T4, соединяются фрагменты ДНК с любыми концами: «липкими» или «тупыми».

Нуклеазы. Осуществляют гидролиз молекул нуклеиновых кислот. Экзонуклеазы сокращают ДНК с обоих концов, а эндонуклеазы расщепляют связи внутри молекулы ДНК.

РНК-зависимая-ДНК-полимераза (ревертаза). Катализирует синтез ДНК на мРНК. При этом возникает кДНК. Она служит матрицей для синтеза второй нити ДНК с использованием ДНК-полимеразы или ревертазы.

Терминальная трансфераза. Досинтезирует пуриновые или пиримидиновые нуклеотиды к одной из нитей двойной спирали ДНК.

Эндонуклеаза фага. Отщепляет одностранные концы с 3'-конца двойной спирали ДНК.

Рестриktionные эндонуклеазы, или рестриктазы. Гидролизуют ДНК строго по определенным специфическим последовательностям, которые называются сайтами рестрикции. В настоящее время выделено более тысячи микробных рестриктаз. В генетической инженерии используется около 200 рестриктаз. Сначала рестриктазы разделяли на три группы в зависимости от длины узнаваемой последовательности нуклеотидов: 1 группа – размер сайта рестрикции равен четырем парам нуклеотидов; 2

группа – пяти и 3 группа – шести нуклеотидным парам.

Полученные с помощью рестриктаз фрагменты ДНК разделяют методом электрофореза в агарозном геле и полиакриламидном геле (ПААГ). Фрагменты ДНК окрашивают, например, бромистым этидием. Для этого их вырезают из геля и экстрагируют фенолом. Затем их концентрируют изобутанолом, переосаждают этанолом и проводят анализ выделенных и очищенных фрагментов. С помощью фрагментов ДНК с известными молекулярными массами определяют молекулярную массу фрагмента. В результате получают рестрикционные карты, т.е. последовательности ДНК с нанесенными на них сайтами разрезания для различных рестриктаз.

Затем проводят определение нуклеотидной последовательности фрагментов – **секвенирование**. Известно два принципа секвенирования: химический и ферментативный сиквенс.

Химический сиквенс основан на избирательной химической деградации нуклеотидов. Для этого одноцепочную молекулу ДНК, один конец которой имеет метку (^{32}P) разделяют на четыре части и каждую из них обрабатывают реагентом, разрушающим одно или два из четырех оснований. Так, 60% муравьиная кислота разрушает пуриновые основания (А+Г), диметилсульфат – гуанидиновые основания, чистый гидразин – пиримидиновые основания (Т+Ц), 1,5 М NaCl – цитозиновые основания. Если поврежденные молекулы обработать пиперидином, то в ДНК образуется разрыв в том месте, где находились разрушенные основания. С помощью электролиза и радиоавтографии (^{32}P) определяют положение разрушенного основания, а затем и нуклеотидную последовательность в фрагментах ДНК.

Ферментативный сиквенс, или секвенирование путем терминации (остановки синтеза) цепи. Терминирующими агентами являются 2',3'-дидезокситрифосфаты (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддУТФ), которые не могут образовывать фосфодиэфирную связь со следующим дезоксирибонуклеотидом. В результате элонгация цепи прекращается там, где в ДНК включился дидезоксирибонуклеотид. Полученные фрагменты разделяют в ПААГ, проводят радиоавтографию и по распределению фрагментов в четырех пробах устанавливают нуклеотидную последовательность ДНК.

С помощью этих методов расшифрованы нуклеотидные последовательности нескольких тысяч генов про- и эукариот. Так, секвенированы геномы дрожжей, дрозофилы, человека и др. Полученные результаты заносятся в базы данных – банки генов.

17.3. Конструирование рДНК и клонирование генов

Для того, чтобы полученный ген реализовал хранимую в нем информацию его нужно ввести в геном клетки-хозяина. Перенос генов осуществляют векторы.

Векторы – это кольцевые молекулы, которые способны к самостоятельной репликации. Ген вместе с вектором образует рекомбинантную ДНК. Векторами могут быть плазмиды, бактериофаги, мобильные элементы, вирусы.

Типы векторов:

- *векторы для клонирования* – они позволяют амплифицировать (увеличение копий ДНК) фрагмент ДНК, встроенного в вектор, посредством репликации. Здесь наиболее часто используются плазмиды и фаги. Для клонирования больших фрагментов в качестве векторов используют искусственные бактериальные и дрожжевые хромосомы;

- *экспрессионные векторы* – используются для анализа конкретных последовательностей генов и их белковых продуцентов, а также в наработке конкретного белка;
- *векторы для трансформации* – используются для введения чужеродного фрагмента ДНК в геном реципиента.

Требования, предъявляемые к векторам: легко накапливаться и выделяться в достаточном количестве; содержать генетические маркеры для отбора последующих трансформантов; иметь несколько сайтов узнавания различными рестриктазами для получения при клонировании разных молекул ДНК; не abortировать встроенный фрагмент; реплицироваться в определенных клетках за счет имеющейся последовательности точки начала репликации.

Общая схема конструирования рДНК

Конструирование осуществляется *in vitro*. Кольцевая молекула вектора разрезается рестриктазой. Полученная линейная молекула ДНК должна содержать липкие концы, комплементарные концам вводимой ДНК. Эти концы вектора и концы вводимого гена сшивают ДНК-лигазой. Этот же фермент замыкает линейную молекулу ДНК в единую кольцевую структуру.

Введение рДНК в клетку осуществляют следующими способами: 1) *Трансдукция* – если рекомбинантные векторы упакованы в инфекционной фаговой частице, то их можно вводить в бактериальную клетку путем естественного проникновения фага в клетку; 2) *Трансформация* – введение в клетку фрагментов нативной ДНК; 3) *Трансфекция* – введение голей фаговой ДНК.

Клетки должны быть компетентными к вводимой рДНК. Это достигается обработкой клетки хлористым кальцием, тепловым ударом или лизоцимом. Эффективность трансформации увеличивают диэтиламиноэтилдекстран и полиэтиленгликоль. Дрожжи становятся компетентными под влиянием литиевых солей и электроимпульсов. В клетки высших организмов ДНК вводят микроинъекцией.

Обычно частота трансформации невысока – одна клетка на несколько тысяч или десятков тысяч клеток. Кроме того, не все клетки содержат клонируемый ген.

Так, сконструированы векторы для прямого отбора рекомбинантных трансформированных клеток. Эти векторы содержат летальный ген для реципиентной, но не трансформированной клетки. В такой ситуации колонии способны образовывать только те клетки, в которых находятся клонируемые гены. Нуклеотидные последовательности таких клеток можно идентифицировать с помощью специфических полинуклеотидных зондов, меченых радиоактивными изотопами.

Трансформированные с экспрессирующим вектором клоны можно отбирать также по продукту введенного гена. Так, внесение генов амилаз в клетки, не растущие на крахмале, обеспечивают рост на этом субстрате только тех клеток, которые были подвергнуты трансформации.

Важным этапом клонирования генов является ***сохранение рекомбинантных ДНК***.

В клетках, например, в *E. coli*, всегда присутствуют эндонуклеазы, которые расщепляют введенные молекулы рДНК. Для предотвращения этого используют мутантные клетки *E. coli*, на которые эндонуклеазы не действуют.

Часто продукты, которые синтезированы по информации введенных генов, разрушаются протеазами. Поэтому используют мутанты со сниженной активностью протеаз.

Меньше разрушаются длинные полипептидные молекулы. Так, к вектору β -галактозидазы присоединяют ген какого-либо полипептида, который удаляют после синтеза нужного продукта.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Генетическая инженерия.
- 2) Генная инженерия.
- 3) Геномная инженерия.
- 4) Хромосомная инженерия.
- 5) Какие задачи можно решить с помощью генетической инженерии?
- 6) Что такое рекомбинантная ДНК (рДНК)?
- 7) Источники ДНК.
- 8) Способы получения гена.
- 9) Ферменты для получения рекомбинантных ДНК.
- 10) Секвенирование. Принципы секвенирования.
- 11) Векторы. Типы векторов.
- 12) Общая схема конструирования рДНК.
- 13) Способы введения рДНК в клетку.
- 14) Сохранение рекомбинантных ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
3. *нак.* – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
- Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастер
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2

Дополнительная

1. Генетически модифицированные растения и продукты питания: реальность и безопасность. Аналитический обзор. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2005. – 200 с. – ISBN: 5-7367-0543-5
2. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах: учебно-методическое пособие / сост.: Блинов В.А. – Саратов: 410005, Саратов, Пугачевская, 161, офис 320, 2008. – 102 с.
4. **Пшеничникова, А.Б.** Основы биотехнологии: учебное пособие / А.Б. Пшеничникова. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 92 с.
5. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.

6. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
7. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Институт биохимии им. Н.А. Баха РАН. – М., 2011. – 323 с.
8. <http://www.biotechnolog.ru>
9. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)
10. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
11. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 18

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ - III

18.1. Амплификация

Амплификация (от англ. *amplification* – увеличение) – это образование дополнительных копий хромосомных последовательностей. Благодаря этому можно повысить эффективность биообъектов, используемых в производстве. Множественные копии определенных фрагментов ДНК получают *in vitro* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР является высоко чувствительной и специфичной, она позволяет обнаружить и исследовать даже единичную копию гена.

Для ПЦР необходимо: два синтетических олигонуклеотидных праймера (короткий фрагмент нуклеиновой кислоты, который служит стартовой точкой при репликации ДНК) длиной ~20 нуклеотидов; ДНК-мишень; термостабильная ДНК-полимераза, которая не теряет активность при температуре 95°C и выше; четыре дезоксирибонуклеотида.

ПЦР-амплификация – это многократное повторение трех реакций:

1. Денатурация – образец ДНК выдерживают при температуре 95°C в течение 1 минуты. В среде должны находиться 2 праймера, ДНК-полимераза, 4 дезоксирибонуклеотида.

2. Ренатурация. Температуру смеси медленно понижают до 55°C, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК.

3. Синтез. Температуру смеси повышают до 75°C, при этом начинается полуконсервативный синтез комплементарной цепи ДНК. Каждый из этих циклов длится 3-5 минут.

Полученные новые нити ДНК являются шаблонами (матрицами) для других праймеров. Это вызывает экспоненциальное увеличение нужных участков ДНК. Процесс носит цепной характер. ПЦР применяют для идентификации патогенных микроорганизмов, возбудителей заболеваний человека, животных и растений, спонтанных мутаций, а также сборки генов.

18.2. Экспрессия генов

Экспрессия генов – проявление функциональной активности генов во время транскрипции и трансляции. Так были получены и внедрены в производство штаммы бактерий и дрожжей, которые способны продуцировать инсулин, соматотропин, интерферон, интерлейкины и другие биологически активные вещества. Созданы растения с повышенной кормовой и питательной ценностью, более значительным фотосинтезом и азотфиксацией, устойчивые к различным фитопатогенам. Большую перспективу открывает технология трансгенных животных. Создано стадо овец с геном человека, который контролирует выработку факторов свертываемости крови, используемых для лечения людей. Сконструированы бактерии, которые очищают каменный уголь от серы и превращают его в жидкое и газообразное топливо.

Технологическая схема клонирования и экспрессии генов следующая:

1. сортировка хромосом и получение ДНК;
2. введение ДНК в вектор;

3. трансформация, трансфекция, трансдукция и др.;
4. обнаружение и накопление клона клеток;
5. выделение рДНК (плазмиды);
6. определение нуклеотидной последовательности в клонированном фрагменте ДНК;
7. конструирование и построение плазмиды для экспрессии ее функций;
8. обнаружение и накопление клона;
9. выделение плазмиды и проверка нуклеотидной последовательности в рДНК;
10. трансформация;
11. выращивание культуры для получения экспрессируемого белка;
12. выделение белка.

18.3. Геномная библиотека

Геномная библиотека (банк генов) – это клонированный в составе векторов полный набор последовательностей ДНК данного организма. Такая фрагментация генома облегчает все генно-инженерные манипуляции, позволяет анализировать отдельные последовательности, выделять и работать с индивидуальными генами. Фрагменты геномной ДНК получают при помощи рестриктаз. Фрагменты ДНК связывают с плечами фага и упаковывают в головки фаговых частиц. Получается геномная библиотека, которая может храниться десятки лет под хлороформом, при температур – 70 °С Поиск нужного гена проводят, заражая фаговой библиотекой бактериальные клетки и, высевая их на чашки Петри с агаризованной средой.

Кроме геномных библиотек создают **библиотеки кДНК**, которые представляют не все последовательности генома и не все гены, а только ту их часть, которая экспрессируется в данном организме. Можно получить библиотеки кДНК отдельных органов и тканей, характерных для различных стадий онтогенеза.

При скрининге кДНК, геномных библиотек и для анализа геномной ДНК используют **метод блот-гибридизации**. С помощью этого метода определяют чужеродный ген в геноме трансгенных растений, копийность гена, изменения в нуклеотидной последовательности гена и т.д.

Метод блот-гибридизации включает следующие этапы: рестрикция ДНК; перенос рестрицированных фрагментов из геля на нейлоновый фильтр и их иммобилизация; гибридизация с меченым зондом.

Для выполнения этого метода фрагменты разрезанной рестриктазами ДНК разделяет электрофоретически в агарозном геле. Затем гель денатурируют 0,4 М раствором NaOH и покрывают его листом нейлонового фильтра. Фильтр покрывают слоями фильтровальной бумаги. Под действием капиллярных сил ДНК-фрагменты перпендикулярно переносятся на фильтр и связываются с ним, т.е. иммобилизуются. Такой перенос называется **блоттинг** (от англ. *blot* – промокать). При этом на фильтре получается реплика с геля. Фильтр помещают в раствор с радиоактивно меченым одноцепочным зондом и гибридизуют с находящимися на фильтре фрагментами ДНК. Зонд гибридизуется только с теми фрагментами, которые содержат комплементарную ему последовательность ДНК. Затем фрагменты, с которыми связался меченый зонд, выявляют радиоавтографией. По радиоавтографу судят о присутствии нужного фрагмента в геноме, изменениях нуклеотидной последовательности, о числе копий гена в геноме.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Амплификация.
- 2) ПЦР-амплификация.
- 3) Экспрессия генов.
- 4) Технологическая схема клонирования и экспрессии генов.
- 5) Геномная библиотека.
- 6) Библиотеки кДНК.
- 7) Метод блот-гибридизации.
- 8) Блоттинг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
3. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2

Дополнительная

1. Генетически модифицированные растения и продукты питания: реальность и безопасность. Аналитический обзор. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2005. – 200 с. – ISBN: 5-7367-0543-5
2. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах: учебно-методическое пособие / сост.: Блинов В.А. – Саратов: 410005, Саратов, Пугачевская, 161, офис 320, 2008. – 102 с.
4. **Пшеничникова, А.Б.** Основы биотехнологии: учебное пособие / А.Б. Пшеничникова. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 92 с.
5. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
6. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
7. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Институт биохимии им. Н.А. Баха РАН. – М., 2011. – 323 с.
8. <http://www.biotechnolog.ru>
9. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)
10. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
11. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 19

ОРГАНИЗАЦИЯ, КОНТРОЛЬ И УПРАВЛЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ

19.1. Системы GMP, GAP, GLP

GMP – (Good Manufacturing Practice) – хорошая производственная практика – правила организации производства и контроля качества лекарственных средств, это единая система требований к производству и контролю.

Правила GMP – это руководящий, нормативный документ, которому и производство и фирма обязаны подчиняться.

Правила GMP обязательны для всех предприятий, выпускающих готовые лекарственные формы, продукцию медицинского назначения, а также субстанции.

Самые жесткие требования предъявляются к инъекционным лекарственным препаратам.

В 1969 г. около 100 государств в мире заключили многостороннее соглашения между собой. «Система удостоверения качества фармацевтических препаратов в международной торговле». Система была введена под эгидой Всемирной Организации Здравоохранения. Эта система была введена для оказания помощи органам здравоохранения импортирующих стран в оценке технического уровня производства и качества закупаемых ими лекарственных препаратов. В последующие годы эта система многократно пересматривалась.

Система дает выгоды импортерам. Эта система дает преимущества и экспортерам (высокоразвитые страны), когда препараты идут на экспорт без лишних препятствий. К экспортерам лекарственных средств предъявляются следующие требования:

- в стране должна быть государственная регистрация лекарственных средств;
- в стране должно быть государственное инспектирование фармацевтических предприятий;
- в стране должны быть приняты правила GMP.

Подобно Фармакопеям правила GMP неоднородны. Имеются:

- Международные правила GMP – принимает и разрабатывает Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ).
- Региональные правила GMP – принимают и разрабатывают страны европейского экономического сообщества (ЕЭС).
- Правила GMP ассоциации стран Юго-Восточной Азии.
- Национальные правила GMP – приняты в 30 странах мира.

Международные правила GMP по строгости требований усреднены, в ряде стран правила более либеральные (в соответствии с техническим уровнем производства). В Японии национальные правила GMP строже международных.

Правила GMP имеют 8 разделов: I – Терминология; II – Обеспечение качества; III – Персонал; IV – Здания и помещения; V – Оборудование; VI – Процесс производства; VII – Отдел технического контроля; VIII – Валидация (утверждение).

I раздел «Терминология» состоит из 25 пунктов (определений): фармацевтическое предприятие, лекарственное вещество, лекарственное средство, карантин на сырье, определение чистоты помещений, асептических условий и т.д.

II раздел «Обеспечение качества». Гарантию качества дает руководитель и квалифицированный персонал. Условия обеспечения качества продукции на производстве:

четкая регламентация всех производственных процессов; квалифицированный персонал; чистые помещения; современное оборудование; регистрация всех этапов производства и всех проводимых анализов.

III раздел «Персонал»:

- руководящий персонал должен иметь профильное образование и практический опыт по производству лекарственных средств;
- каждый специалист и руководящий работник на предприятии должен иметь строго определенные функции;
- неруководящий персонал должен иметь график подготовки и переподготовки и график должен быть зарегистрирован;
- требования соблюдения личной гигиены, гигиена и поведение регламентируются.

IV раздел «Здания и помещения»:

- производство должно располагаться вне жилых зон;
- требуется исключить пересечение технологических линий;
- производство бета-лактамовых антибиотиков должно осуществляться в отдельном помещении (для исключения аллергических реакций);
- классификация помещений по степени загрязненности механическими и микробными частицами;
- помещения должны быть сухими;
- помещения для производства и контроля качества должны иметь гладкие поверхности, доступные для мытья и дезинфекции;
- должны быть ультрафиолетовые установки (стационарные и переносные);
- для производства стерильных лекарственных средств соединения между стенами и потолками должны быть закругленными;
- давление внутри помещений должно быть выше, чем снаружи на несколько мм ртутного столба;
- должен быть минимум открытых коммуникаций;
- не должно быть скользящих дверей, двери должны быть загерметизированы;
- помещения для хранения сырья должны быть отделены от цехов производства.

V раздел «Оборудование»:

- оборудование должно быть адекватно технологическому процессу;
- оборудование должно размещаться так, чтобы его можно было легко эксплуатировать;
- все регистрирующие приборы должны быть откалиброваны;
- поверхность оборудования должна быть гладкой, не корродирующей, не должна реагировать с веществами, задействованными в производстве;
- должно быть рациональное и продуманное размещение оборудования – у персонала не должно быть лишних переходов в процессе работы;
- оборудование должно регулярно проходить профилактический осмотр, что регистрируется в журналах;
- оборудование для производства бета-лактамовых антибиотиков должно быть отдельным.

VI раздел «Процесс производства»:

- должен быть сертификат качества на сырье;
- перед отправлением на производство партия сырья проверяется;
- выдача сырья регистрируется;
- сырье подвергается проверке на микробную контаминацию или стерильность;

- производственный процесс должен быть так построен, чтобы все было согласовано и безаварийно;
- постадийный контроль процесса производства и его регистрация в журналах (сырье – полупродукты – рабочее место – операции – технологический режим и т.д.). Порядок регистрации регламентируется, все записи делаются сразу после контроля и результаты хранят не менее 1 года.

VII раздел «Отдел контроля качества» (ОТК) – обязательный для фармацевтических предприятий. ОТК руководствуется государственными и отраслевыми документами, регламентирующими его деятельность

Задачи ОТК: не допускать выпуска брака; укреплять производственную дисциплину. ОТК контролирует сырье и полупродукты, участвует в планировании и проведении постадийного контроля и хранит образцы каждой серии продукции не менее 3-х лет.

VIII раздел «Валидация»:

Валидация – это оценка и документальное подтверждение соответствия производственного процесса и качества продукции установленным требованиям.

Директор предприятия специальным приказом назначает руководящего сотрудника или специалиста со стороны для проверки качества работы какого-либо цеха, технологической линии и т.д.

Валидация может быть периодическая (проводится постоянно) и внеплановая (при чрезвычайных происшествиях, при изменении технологии).

Валидация позволяет установить:

- соответствует ли технологический процесс регламенту;
- соответствует ли качество готовой продукции требованиям нормативной технологической документации;
- соответствует ли оборудование производственным целям;
- каков предел возможности производственного процесса.

Валидация оценивает сам процесс и предел возможных отклонений. При этом составляется отчет, если имеются какие-либо не соответствия или нарушения – то производственный процесс прерывается.

На биотехнологическом производстве внеплановая валидация проводится, если производство меняет штамм продуцента; изменена питательная среда (так как изменяется метаболизм продуцента и он может давать примеси).

GCP – (Good Clinical Practice) – хорошая клиническая практика – правила организации клинических испытаний.

GCP – правила организации клинических испытаний.

Лекарственное средство допускается к клиническим испытаниям только после проведения лабораторных испытаний.

В правилах GCP изложены права больных и добровольцев:

- испытуемые должны быть информированы о том, что им вводится новый лекарственный препарат и о его свойствах;
- больные имеют право на финансовое вознаграждение;
- должен быть контроль за ходом испытаний со стороны медиков.

В Европе, Соединенных Штатах Америки (США) и России введены общественные комитеты по контролю за клиническими испытаниями лекарственных препаратов. В эти комитеты входят священники, представители милиции и прокуратуры, медицинской общественности, которые наблюдают за испытаниями лекарственных препаратов.

Цель клинических испытаний – получение достоверных результатов: лекарство ле-

чит, оно безвредно и т.д.

Надлежащая клиническая практика (Good Clinical Practice; GCP) представляет собой международный этический и научный стандарт планирования и проведения исследований с участием человека в качестве субъекта, а также документального оформления и представления результатов таких исследований.

Соблюдение указанного стандарта служит для общества гарантией того, что права, безопасность и благополучие субъектов исследования защищены, согласуются с принципами, заложенными Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (ВМА), и что данные клинического исследования достоверны.

Целью настоящего национального стандарта является установление единых со странами Европейского Союза, Соединенными Штатами Америки и Японией правил, что должно способствовать взаимному признанию данных клинических исследований уполномоченными органами названных стран.

GLP – (Good Laboratory Practice) – хорошая лабораторная практика – правила организации лабораторных направлений.

GLP – правила организации лабораторных исследований.

Новое лекарственное средство необходимо подвергнуть лабораторным испытаниям, прежде чем приступить к проведению клинических испытаний.

Лабораторные испытания (*in vitro*, *in vivo*) проводятся на клетках, бесклеточных системах и животных.

При испытании на животных можно получить различные результаты, поэтому важна правильная организация исследований.

Животные должны быть гетерогенны (разные), корм должен быть постоянным, одинаковым; требуется определенная планировка вивария, чтобы исключить стресс у животных; животные должны быть жизнеспособны

В целях организации качественного проведения доклинических испытаний лекарственных и других биологически активных веществ в промышленно развитых странах (Англия, Германия, США, Франция, Япония и др.) утверждены единые правила «добротной лабораторной практики» (Good Laboratory Practice, GLP).

GLP представляет собой международный стандарт при доклинической разработке новых лекарственных средств. До проведения клинических исследований безопасность медицинских средств проверяется на животных. В международной практике испытания безопасности лекарственных препаратов, производимых в разных странах и в разных производственных условиях биотехнологической или фармацевтической фирм, осуществляются в соответствии с требованиями GLP. Существует группа GLP в Европейском Центре по экологии и токсикологии химической промышленности; в США система GLP действует с 1979 г. В настоящее время стандарты GLP вводятся и в России. Так, в частности государственная регистрация, сертификация и контроль за обеспечением надлежащих условий производства, транспортировки, хранения и применения медицинских иммунологических препаратов осуществляется Государственным институтом стандартизации и контроля им. Л.А. Тарасевича. В РФ в настоящее время действуют только три сертифицированных по GLP функционирующих испытательных лабораторий или центров. На базе Пушкинского филиала ИБХ РАН с 1995 г. действует Российский национальный центр доклинических испытаний медицинских препаратов по международному стандарту GLP, созданный на инвестиционные средства Международного научно-технического центра (МНТЦ). Площадки и технологические модули в режиме GLP имеются также в Институте молекулярной биологии и вирусологии

(Центр «Вектор») в п. Кольцово Новосибирской обл. и в Институте прикладной микробиологии и биотехнологии в п. Оболенск Московской обл.

Главными в системе GLP для Российского национального центра являются следующие основные действия и инфраструктурные компоненты инженерного обеспечения работы испытательного комплекса:

- заблаговременная разработка стандартной методики проведения испытаний (Standard Operating Procedure, SOP) применительно ко всем ее этапам;
- назначение руководителя и ответственных за каждый вид испытаний;
- ведение специального протокола с результатами выполнения операций;
- проведение внутренней инспекции службой качественной оценки испытаний (Quality Assurance Unit, QAU);
- обеспечение работы подразделения – Биоцентра;
- обеспечение работы подразделения – Главного питомника;
- обеспечение работы подразделения – Лабораторного корпуса.

Биоцентр включает в себя два барьерных питомника лабораторных животных (общая площадь 2700 м² и 640 м², производительность – 70 тысяч животных в год) и лабораторный корпус биомедицинских исследований (общая площадь 2450 м²). Все здания и помещения спроектированы и построены в соответствии с рекомендациями GLP. Питомники барьерного типа предназначены для разведения и массового размножения линейных лабораторных животных (мыши, крысы, кролики, морские свинки) категорированного генетического и гигиенического качества (Specific Pathogens Free, SPF; Virus Antybody Free, VAF).

Главный питомник имеет две независимые, полностью изолированные барьерные зоны, расположенные в разных уровнях на противоположных сторонах здания. Это позволяет избегать перекрестных загрязнений. В барьерной зоне первого этажа имеются 11 комнат содержания животных по 18 м² каждая для мелких грызунов, 4 комнаты по 36 м² барьерной зоны второго этажа используются для разведения и содержания морских свинок и кроликов. На первом этаже имеется полностью изолированная зона карантинирования вновь поступающих животных. Персонал по уходу за животными попадает в чистую зону через шлюз после санитарно-гигиенической обработки и одевания в стерильную спецодежду.

Клетки, поилки, стеллажи, корма, материал подстилки и прочие принадлежности подвергаются стерилизации и передаются в чистую зону через проходные автоклавы. Кондиционированный воздух, прошедший три ступени очистки (99,95 %), попадает в комнату содержания сверху, а выводится через низ.

Соотношение подаваемого системой вентиляции воздуха и выходящего – 15:10 объемов в час, что обеспечивает во всех комнатах содержания животных избыточное давление по сравнению с коридором чистой зоны. Микропроцессорная система контролирует в комнатах содержания давление, температуру, относительную влажность воздуха, а также освещенность. Для аварийных ситуаций системы вентиляции и фильтрации продублированы. В конвенциональной зоне находятся моечно-стерилизационный блок и лаборатория патоморфологического мониторинга.

Лабораторный корпус имеет две изолированные зоны: конвенциональная (лабораторная) общей площадью 1910 м² и зона гигиенического барьера для содержания экспериментальных животных общей площадью 640 м². В конвенциональной зоне расположены лабораторные боксы бактериологического и вирусологического анализа, бокс для клеточных работ, лабораторные комнаты токсикологической биохимии. В чистой зоне находятся 14 комнат содержания экспериментальных животных, лаборатории пи-

рогенности и для физиологических и фармакологических исследований.

Технологическое оборудование обеспечивает поддержание барьерных условий в чистой зоне на том же уровне, что и в главном питомнике.

Персонал Биоцентра наряду с технологией разведения (размножения) лабораторных животных статуса SPF и VAF способен проводить следующие исследования и анализы:

- общая токсичность (острая, подострая и хроническая);
- иммунотоксичность и аллергенность;
- эмбриотоксичность и тератогенность;
- цитотоксичность и мутагенность;
- канцерогенность;
- биохимическая токсикология;
- пирогенность;
- фармакокинетика и фармакодинамика.

Специфическая биологическая активность новых препаратов изучается по их воздействию на следующие системы организма и процессы:

- иммунная система;
- сердечно-сосудистая система;
- нервная система;
- общий метаболизм;
- водно-солевой метаболизм;
- противовоспалительное действие;
- противоопухолевое действие.

Во время пуска всего комплекса (Центра) в эксплуатацию в качестве тестового объекта были проведены доклинические испытания нового пептидного препарата С-1-6 – синтетического аналога фрагмента человеческого интерлейкина-2 (IL-2). Создан полный комплект документации практического регламента GLP применительно к принятым условиям. Создана электронная система слежения и безопасности главного питомника и корпуса биомедицинских исследований.

Одобренный препарат после лабораторных доклинических испытаний по системе GLP и последующей клинической проверки может быть разрешен к выпуску в условиях промышленного производства. Для обеспечения изготовления высокого качества биопродукта последний должен пройти стадию производства, удовлетворяющей следующему системному международному стандарту – «добротной производственной практике» (Good Manufacturing Practice, GMP).

19.2. Социальные аспекты биотехнологии и биоинженерии.

Контроль применения биотехнологических методов

В настоящее время приняты законы и другие государственные акты, создающие нормативно-правовую базу для современной биотехнологии и биоинженерии. Так, в России Федеральный Закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» принят 5 июня 1996 г. (№ 86 – ФЗ). В этом законе установлены четыре уровня риска возможного потенциально вредного воздействия генно-инженерной деятельности на здоровье человека:

- уровень риска соответствует работам, которые представляют опасность для здоровья и сопоставимы с риском при работе с непатогенными микроорганизмами;
- уровень риска соответствует работам, которые представляют незначитель-

- ную опасность для здоровья человека и сопоставимы с опасностью при работах с условно-патогенными микроорганизмами;
- риск работ, которые представляют умеренную опасность для здоровья человека и сопоставимы с опасностью при работах с микроорганизмами, потенциально способными к передаче инфекции;
 - уровень риска соответствует работам, которые представляют опасность при работах с возбудителями особо опасных инфекций.

В законе определены требования к лицам, осуществляющим генно-инженерную деятельность; требования по стандартизации и сертификации генно-инженерной продукции (услуг); закон определяет ответственность юридических и физических лиц, осуществляющих генно-инженерную деятельность и пр. С 2001 г. в России установлена система обязательной маркировки пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников. Это обеспечивает условия выбора гражданами продовольственной и другой продукции с учетом ее генетической природы и личного отношения каждого к такой продукции.

Для производства и реализации всех товаров, в т.ч. полученным из ГМО, обязательным является их стандартизация. Госстандарт России предложил создать Федеральную программу «Проблемы производства и реализации продуктов питания, полученных из генно-модифицированных источников пищи». Главная задача этой программы – нормативное и нормативно-методическое обеспечение качества и генетической безопасности генно-инженерно-модифицированных продуктов питания и продовольственного сырья. Приоритетным направлением в области нормативного обеспечения является разработка «Концепции стандартизации генно-модифицированных продуктов», внесение изменений в действующую нормативную документацию на пищевую продукцию, продовольственное сырье и методы испытания, в частности включение дополнительных требований по генетической чистоте, идентификации и маркировке генно-модифицированных продуктов питания; на пороговые уровни потребления для человека ГМ-продуктов питания. Необходимо разработать правила и порядок оценки соответствия ГМ-продуктов питания требованиям генетической безопасности; нормативных документов по государственному контролю и надзору за производством, хранением, реализации и обращением ГМ-продуктов питания.

19.3. Понятие о биоэтике и биобезопасности

Биологическая технология коренным образом изменяет фундаментальные свойства организмов: наследственность, изменчивость, энерго- и массообмен, адаптацию и устойчивость, продуктивность и качество.

Такое искусственное вмешательство в строго запрограммированные генетические структуры не позволяют всегда точно прогнозировать возможные последствия. Это, естественно, вызывает большое беспокойство людей во многих странах, что может серьезно затормозить развитие биотехнологии и особенно биоинженерии.

Однако оснований для этого нет, о чем, в частности, свидетельствует развитие новейшей биотехнологии уже на протяжении пятидесяти лет. На человека и среду его обитания постоянно действуют природные, техногенные и другие факторы. Если они действуют отрицательно, то наука, общество и государство должны им эффективно противодействовать, т.е. обеспечить безопасность человека – состояние защищенности жизненно важных интересов личности и самой жизни. Безопасность человека не может быть обеспечена без защиты среды его обитания и жизнедеятельности. Безопасность

может быть биологической, экологической, экономической, продовольственной, военной и т.д.

Важнейшей составной частью безопасности является биобезопасность. Биобезопасность – это защищенность человека и окружающей среды от вредного воздействия различных биологических соединений, содержащихся в природных или генно-инженерно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктов. Биобезопасность важна не только для человека, но и для растений, животных и полезных микроорганизмов. В самом деле, биологически опасные организмы и продукты их жизнедеятельности могут лишить человека продовольственных и других источников и возможностей существования. Поэтому разработаны различные методы контроля за технологическими процессами и качеством биологических веществ, вновь вовлекаемых в сферу использования человеком. Особую опасность для здоровья и жизни людей представляет алкогольная интоксикация, наркомания и ядовитые грибы.

Манипуляции с растительными и животными клетками и их органеллами основаны на фундаментальных свойствах клеток и тканей, тотипотентности, соматической гибридизации, дифференциации и дедифференциации. В клеточных технологиях постоянно используется спонтанный и направленный мутагенез. Это приводит к генетической гетерогенности клеток. Исходя из этого, в клеточных биотехнологиях должен быть построенный мониторинг полученных мутантов. Они должны иметь устойчивые генотипы, ибо распространение неустойчивых мутантов может привести, например, в сельском хозяйстве к большим потерям урожая.

Биотехнологические процессы нужно непрерывно контролировать и своевременно выявлять возможные отклонения от нормы основных параметров и качества продукции. Показано, что при работе с животными тканями и клетками возможно накопление токсических веществ, необычных продуктов метаболизма, в т.ч. при их хранении. Считают, что клеточная биотехнология растений (селекция сортов, получение продуктов для фармацевтической и пищевой промышленности) более безопасна, чем использование клеточных и тканевых технологий в животноводстве, где нужен более жесткий контроль и управление.

При проведении рДНК–биотехнологии важной проблемой является возможность получения мутантов с содержанием токсичных или аллергенных для человека белков или других опасных соединений. Не исключено, что при трансгенозе могут активироваться «молчащие» гены, поэтому вероятно появление генотипов, опасных для здоровья и жизни человека. Возможность появления таких мутантов значительно возрастает при использовании искусственных, синтетических генов для трансгенных растений, животных и микроорганизмов с улучшенными и принципиально новыми свойствами. Не исключено также взаимодействие полученных модифицированных генов с генами третьих генотипов, что может привести к становлению новых генотипов с опасными свойствами для людей и окружающей среды.

Однако 40 лет интенсивных работ в области новейшей биотехнологии – генетической инженерии – показывают их безопасность. Это объясняется исходя из следующих основных положений:

1. В биоинженерных работах используются природные гены, которые за все время эволюции подвергались отбору, элиминации, рекомбинации и т.д. В результате этого выработались механизмы, которые обеспечивают устойчивый характер репарации биосинтеза белков и их качества.

2. В биоинженерных лабораториях постоянно проводится мониторинг за качеством получаемых трансгенных организмов. Это позволяет заблаговременно, на этапе созда-

ния генетически-модифицированных объектов (ГМО) в лаборатории, выявить опасные генотипы и не допускать их в производство.

3. Для создания ГМО используются проверенные гены и их регуляторные генетические структуры, что позволяет получать трансгенные организмы с заданными свойствами.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Общие представления о системе GMP.
- 2) Правила системы GMP. Характеристика разделов.
- 3) Общие представления о системе GSP.
- 4) Общие представления о системе GLP.
- 5) Принцип организации проведения доклинических испытаний лекарственных и других БАВ на примере Российского национального центра доклинических испытаний медицинских препаратов по международному стандарту GLP.
- 6) Социальные аспекты биотехнологии и биоинженерии.
- 7) Контроль применения биотехнологических методов.
- 8) Уровни риска возможного потенциально вредного воздействия генно-инженерной деятельности на здоровье человека.
- 9) Понятие о биоэтике и биобезопасности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Генетически модифицированные растения и продукты питания: реальность и безопасность. Аналитический обзор. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2005. – 200 с. – ISBN: 5-7367-0543-5
2. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
3. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
4. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.

Дополнительная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
3. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
4. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
5. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года / утверждено председателем правительства Российской Федерации В. Путиным 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8. – М., 2012. – 76 с.
6. Рабочие материалы к стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности до 2020 года / Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Союз предприятий биотехнологической отрасли. – М., 2009. – 85 с.

7. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
8. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Институт биохимии им. Н.А. Баха РАН. – М., 2011. – 323 с.
9. <http://www.biotechnolog.ru>
10. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)
11. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
12. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. **Безбородов, А.М.** Микробиологический синтез / А.М. Безбородов, Г.И. Квеситадзе. – СПб: Проспект Науки, 2011. – 144 с. – ISBN 978-5-903090-52-5
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
4. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
5. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
6. Генетически модифицированные растения и продукты питания: реальность и безопасность. Аналитический обзор. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2005. – 200 с. – ISBN: 5-7367-0543-5
7. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
8. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
9. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
10. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года / утверждено председателем правительства Российской Федерации В. Путиным 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8. – М., 2012. – 76 с.
11. **Никитина Е.В.** Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
12. Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах: учебно-методическое пособие / сост.: Блинов В.А. – Саратов: 410005, Саратов, Пугачевская, 161, офис 320, 2008. – 102 с.
13. Общая и фармацевтическая биотехнология: учебное пособие. – Самара: НОУ ВПО СМИ «РЕАВИЗ», 2012. – 118 с.
14. Основы биотехнологических процессов: Учебно-методическое пособие по биотехнологии. Часть III. Концентрирование и высушивание биопрепаратов / И.В. Тихонов и др. – М.: МГАВМиБ, 2001. – 49 с.
15. Основы биотехнологических процессов: Учебно-методическое пособие по биотехнологии. Часть II. Способы культивирования микроорганизмов / И.В. Тихонов. – М.: МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2001. – 58 с.
16. Основы биотехнологических процессов: Учебно-методическое пособие по биотехнологии. Часть I. Способы поддержания асептических условий при культивировании / И.В. Тихонов. – М.: МГАВМиБ, 2001. – 31 с.
17. **Пшеничникова, А.Б.** Основы биотехнологии: учебное пособие / А.Б. Пшеничникова. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 92 с.
18. Рабочие материалы к стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности до 2020 года / Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Союз предприятий биотехнологической отрасли. – М., 2009. – 85 с.
19. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
20. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т.Г. Володиной. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
21. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. –

936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

22. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Институт биохимии им. Н.А. Баха РАН. – М., 2011. – 323 с.
23. Журналы: Биотехнология, Вестник СГАУ, Прикладная биохимия и микробиология, Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии, Фармацевтическая промышленность, Кондитерское и хлебопекарное производство, Масложировая промышленность, Молочная промышленность, Переработка молока, Мясные технологии, Сыроделие и маслоделие, Пиво и напитки, Пищевая технология.
24. <http://www.biotechnolog.ru>
25. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)
26. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
27. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Лекция 1. Технология ферментационных процессов – I	4
1.1. Устройство и основные конструкторские детали ферментеров и биореакторов.....	4
1.2. Обеспечение тепло- и массообмена.....	4
1.3. Системы аэрирования и перемешивания.....	6
1.4. Системы пеногашения, асептики и стерилизации.....	7
Вопросы для самоконтроля.....	8
Список литературы.....	8
Лекция 2. Технология ферментационных процессов – II	10
2.1. Твердофазная, жидкофазная и газофазная ферментация.....	10
2.2. Периодический способ культивирования.....	10
2.3. Промежуточные способы культивирования.....	11
2.4. Непрерывный способ культивирования.....	12
2.5. Принцип масштабирования технологических процессов.....	13
Вопросы для самоконтроля.....	14
Список литературы.....	14
Лекция 3. Типовые приемы и особенности культивирования микроорганизмов - I	16
3.1. Роль кислорода в жизни микроорганизмов.....	16
3.2. Типы размножения микроорганизмов.....	17
3.3. Фазы роста культуры микроорганизмов.....	17
3.4. Периодический метод культивирования микроорганизмов.....	19
3.5. Непрерывный метод культивирования микроорганизмов.....	19
Вопросы для самоконтроля.....	21
Список литературы.....	21
Лекция 4. Типовые приемы и особенности культивирования микроорганизмов - II	23
4.1. Получение чистой культуры.....	23
4.2. Выращивание микроорганизмов глубинным методом и методом поверхностных культур.....	26
Вопросы для самоконтроля.....	26
Список литературы.....	27
Лекция 5. Основные типы биотехнологических процессов – I	28
5.1. Производство биомассы.....	28
5.2. Производство спиртов и полиолов.....	30
Вопросы для самоконтроля.....	32
Список литературы.....	32
Лекция 6. Основные типы биотехнологических процессов – II	34
6.1. Производство вторичных метаболитов.....	34
6.2. Биотрансформация.....	35
6.3. Производство ферментов.....	36
Вопросы для самоконтроля.....	38
Список литературы.....	38
Лекция 7. Основные типы биотехнологических процессов – III	40
7.1. Производство аминокислот.....	40

7.2. Производство органических кислот.....	42
7.3. Производство витаминов.....	47
Вопросы для самоконтроля.....	49
Список литературы.....	49
Лекция 8. Критерии оценки эффективности биотехнологических процессов..	51
8.1. Скорость роста биомассы и время генерации.....	51
8.2. Общая продуктивность процесса.....	53
8.3. Скорость потребления субстрата.....	54
8.4. Скорость биосинтеза продукта.....	54
8.5. Экономические коэффициенты (коэффициенты выхода) и метаболические (трофические) коэффициенты.....	55
Вопросы для самоконтроля.....	56
Список литературы.....	57
Лекция 9. Имобилизованные клетки и ферменты - I.....	58
9.1. Источники ферментов. Преимущества иммобилизованных ферментов.....	58
9.2. Характеристика носителей для иммобилизации ферментов.....	59
9.3. Физическая иммобилизация ферментов.....	61
Вопросы для самоконтроля.....	63
Список литературы.....	63
Лекция 10. Имобилизованные клетки и ферменты - II.....	64
10.1. Химическая иммобилизация ферментов.....	64
10.2. Сохранение стабильности иммобилизованных ферментов.....	66
10.3. Соиммобилизация.....	66
Вопросы для самоконтроля.....	67
Список литературы.....	67
Лекция 11. Типовые приемы и особенности культивирования клеток животных – I.....	68
11.1. История применения культур клеток животных.....	68
11.2. Основные характеристики клеток животных.....	68
11.3. Этапы культивирования клеток животных.....	69
Вопросы для самоконтроля.....	71
Список литературы.....	72
Лекция 12. Типовые приемы и особенности культивирования клеток животных - II.....	73
12.1. Глубинное выращивание клеток в монослое.....	73
12.2. Глубинное выращивание клеток в суспензированных культурах.....	73
12.3. Среды для выращивания клеток.....	74
Вопросы для самоконтроля.....	76
Список литературы.....	76
Лекция 13. Типовые приемы и особенности культивирования растительных клеток - I.....	78
13.1. Вегетативное размножение растений методом культур тканей.....	78
13.2. Поверхностное культивирование клеток растений.....	79
13.3. Культивирование клеток растений в глубинных условиях.....	79
Вопросы для самоконтроля.....	80
Список литературы.....	80
Лекция 14. Типовые приемы и особенности культивирования растительных	

клеток - II	82
14.1. Иммунизация растительных клеток.....	82
14.2. Сохранение культур клеток растений.....	82
14.3. Использование методов генетической инженерии в фитобиотехнологии... Вопросы для самоконтроля.....	83 84
Список литературы.....	84
Лекция 15. Основы клеточной инженерии	86
15.1. Протопласты: определение, применение.....	86
15.2. Способы выделения протопластов.....	86
15.3. Способы культивирования протопластов.....	88
15.4. Слияние протопластов (парасексуальная гибридизация)	88
15.5. Виды соматических гибридов.....	90
15.6. Гибридная технология.....	92
Вопросы для самоконтроля.....	93
Список литературы.....	94
Лекция 16. Основы молекулярной биотехнологии - I	95
16.1. Традиционные методы селекции. Методы селекции микроорганизмов.....	95
16.2. Принципы селекции микроорганизмов.....	96
16.3. Селекция продуцентов антибиотиков, органических кислот и ферментов.. Вопросы для самоконтроля.....	97 98
Список литерату- ры.....	98
Лекция 17. Основы молекулярной биотехнологии - II	100
17.1. Генетическая инженерия, ее методы и задачи.....	100
17.2. Получение фрагментов чужеродной ДНК и их очистка.....	101
17.3. Конструирование рДНК и клонирование генов.....	102
Вопросы для самоконтроля.....	104
Список литературы.....	104
Лекция 18. Основы молекулярной биотехнологии - III	106
18.1. Амплификация	106
18.2. Экспрессия генов.....	106
18.3. Геномная библиотека.....	107
Вопросы для самоконтроля.....	108
Список литературы.....	108
Лекция 19. Организация, контроль и управление биотехнологическими процессами	109
19.1. Системы GMP, GAP, GLP	109
19.2. Социальные аспекты биотехнологии и биоинженерии. Контроль применения биотехнологических методов.....	114
19.3. Понятие о биоэтике и биобезопасности.....	115
Вопросы для самоконтроля.....	117
Список литературы.....	117
Библиографический список	119
Содержание	121