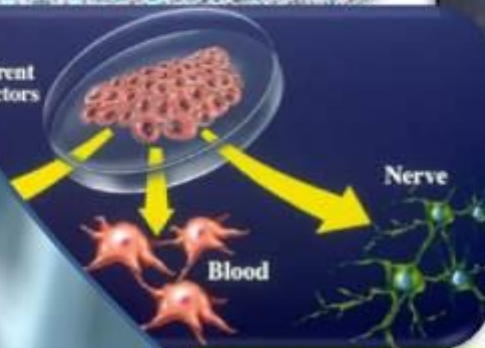


Папуша Н.В., Рахметуллина А.К.

Учебное пособие

# ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

and different  
with factors



Г.Костанай, 2019

УДК 573.6.086.83+577.21

ББК 26.0

П 17

**Составители:**

Папуша Наталья Владимировна – кандидат с.-х. наук, доцент кафедры технологии производства продуктов животноводства

Рахметуллина Айжан Казиевна – магистр технических наук, преподаватель кафедры технологии производства продуктов животноводства

**Рецензенты:**

Бари А. – доктор PhD, ст.преподаватель ЕНУ им.Гумилева

Шайкамал Г.И. – кандидат с.-х.наук, зав. кафедрой «Технология производства продуктов животноводства» КГУ им.А.Байтурсынова

Брель-Киселева И.М. - кандидат с.-х.наук, доцент кафедры «Технология производства продуктов животноводства» КГУ им.А.Байтурсынова

Учебное пособие «Основы биотехнологии», Костанай, 2019, 185 с.

Учебное пособие предназначено для систематизации, закрепления и расширения теоретических знаний и практических навыков по специальности Биотехнология; формирования умения ведения самостоятельной научной работы. В учебном пособии представлены вопросы общей биотехнологии, касающиеся производства различных биологически активных соединений, а также рассматриваются биотехнологические процессы и аппаратура для их осуществления.

Рекомендовано к опубликованию методическим советом факультета Ветеринарии и технологии животноводства КГУ им. А. Байтурсынова, протокол №6 от 13.06.2018 г.

Утверждено и рекомендовано к использованию УМС КГУ им.А.Байтурсынова, протокол № 2 от 27.02.2019 г.

ISBN 978-601-7597-31-3

© Папуша Н.В., Рахметуллина А.К., 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	5
1. НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ .....	6
1.1 Понятие о биотехнологии .....	6
1.2 Возникновение, становление и развитие биотехнологии .....	8
1.3 Биотехнология как межотраслевая область научно-технического прогресса и раздел практических знаний .....	16
1.4 Основные разделы биотехнологии .....	19
1.5 Современное состояние и области применения биотехнологии .....	28
1.6 Состояние и перспективы развития биотехнологии Казахстана .....	31
1.6.1 Мировые тенденции в биотехнологии .....	31
1.6.2 Приоритетные направления фундаментальных и прикладных научных исследований.....	32
1.6.3 Проблемы, задачи и возможности биотехнологии Казахстана .....	34
2. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ.....	40
2.1 Элементы, слагающие биотехнологические процессы .....	40
2.1.1. Биологические агенты.....	42
2.1.2 Смешанные микробные культуры и их природные ассоциации .....	48
2.2. Биотехнология производства метаболитов.....	51
2.2.1 Биотехнология получения первичных метаболитов. Получение аминокислот. ....	52
2.2.2. Растения как источник биологически активных веществ (БАВ).....	56
2.3 Классификация биотехнологических процессов .....	70
2.4 Стадии биотехнологического процесса .....	76
2.4.1 Питательные среды и микробиологическое исследование.....	84
2.4.2 Изучение выделенных культур.....	99
3. АППАРАТУРА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ .....	105
3.1 Аппаратура для реализации биотехнологических процессов и получения конечного продукта. ....	105
3.2 Аппаратура для конечной стадии биотехнологических производств и получения готового продукта.....	113
3.3. Совокупность методов для контроля и управления биотехнологическими процессами.....	116
3.4. Критерии оценки эффективности биотехнологических процессов ...	120
4. ПРОМЫШЛЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ.....	124
4.1 Промышленный биосинтез белковых веществ.....	124
4.2 Субстраты для получения белково-витаминных концентратов. ....	127
5.3 Микробиологическое получение целевых продуктов.....	137
4.4 Органические кислоты.....	148
4.5 Промышленный синтез антибиотиков.....	156
5. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ .....	163
5.1. Конструирование штаммов с повышенной способностью к трансформации.....	163

5.2	Рекомбинантная ДНК.....	165
5.3	Получение моноклональных антител (гибридомная технология).....	171
6.	КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЖИВОТНЫХ .....	174
6.1	Клонирование животных .....	174
6.2	Получение химерных животных .....	176
6.3	Получение трансгенных животных.....	177

## ВВЕДЕНИЕ

Вторая половина 20 века ознаменовалась невиданным расцветом биологических наук. Значительные успехи, достигнутые в фундаментальных исследованиях в области биохимии, вирусологии, бактериологии, молекулярной биологии и генетики создали предпосылки для управления элементарными механизмами жизнедеятельности клетки, что явилось мощным импульсом для развития биотехнологии. Выяснение роли нуклеиновых кислот в передаче наследственной информации, расшифровка генетического кода, углубленное изучение бактериофагов и плазмид, совершенствование технологии культивирования микроорганизмов, клеток и тканей растений и животных позволили разработать методы генетической и клеточной инженерии, с помощью которых стало возможным искусственно создавать новые формы высокопродуктивных организмов.

Сегодня биотехнология стремительно выдвигается на передний край научно-технического прогресса. Бурное развитие молекулярной биологии и генетики позволило использовать потенциал живых организмов в интересах хозяйственной деятельности человека. Острая практическая потребность в новых технологиях, призванных ликвидировать нехватку продовольствия, энергии, минеральных ресурсов, улучшить состояние здравоохранения и охрану окружающей среды определяет решающий вклад биотехнологии в решение этих глобальных проблем человечества. Биотехнология, в сущности, не что иное, как использование культур клеток микроорганизмов, животных и растений, метаболизм и биосинтетические возможности которых обеспечивают выработку специфических веществ.

Человек во все времена, так или иначе, умел использовать живую материю для поддержания собственной жизнедеятельности. Сначала в простых, потом во все более сложных формах. Еще ничего не ведая о существовании микроорганизмов, он заставил «работать» на себя бактерии и дрожжи в процессах хлебопечения, сыроварения, виноделия или при силосовании кормов; создавал путем отбора и скрещивания новые сорта растений и породы животных.

Биотехнология - это именно та дисциплина, которая, как физика в середине прошлого века, определяет сегодня научно-технический прогресс. Во всем мире на рубеже веков она бурно развивается, в нее вкладываются огромные средства. Полученные с помощью генной инженерии лекарства и продукты питания - эти достижения биотехнологии уже вошли в нашу жизнь, а завтра их число может возрасти в геометрической прогрессии. Биотехнология - единственная дисциплина, объединяющая фундаментальную и прикладную науку, а также производство. Результаты ее развития крайне необходимы для повышения качества жизни людей.

# 1. НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

## 1.1 Понятие о биотехнологии

Термин «биотехнология» был введен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки при описании процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению Эреки, биотехнология – это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты».

Однако этот термин в те годы не получил широкого распространения. Только в 1961 г. к нему вновь вернулись после того как шведский микробиолог Карл Герен Хеден порекомендовал изменить название научного журнала "Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology" (Журнал микробиологической и химической инженерии и технологии), специализирующегося на публикации работ по прикладной микробиологии и промышленной ферментации, на "Biotechnology and Bioengineering" (Биотехнология и биоинженерия). С этого момента биотехнология оказалась четко и необратимо связана с исследованиями в области «промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов».

**Биотехнология** (от греч. bios - жизнь, techne - искусство, мастерство и logos - слово, учение) - это получение полезных для человека продуктов, в процессе которого используется биохимическая деятельность микроорганизмов, изолированных клеток или их компонентов.

Понятие биотехнология может быть представлено многими определениями:

- использование биологических объектов, систем или процессов для производства необходимых продуктов или для нужд сервисной индустрии;
- комплексное применение биохимических, микробиологических и инженерных знаний с целью промышленного использования потенциальных возможностей микроорганизмов, культур клеток и отдельных их компонентов или систем;
- технологическое использование биологических явлений для воспроизводства и получения (изготовления) различных типов полезных продуктов;
- приложение научных и инженерных принципов для обработки материалов биологическими агентами с целью получения необходимых продуктов или создания сервисных технологий.

Биотехнология на самом деле не что иное, как название, данное набору технических приемов (подходов) и процессов, основанных на использовании для этих целей биологических объектов.

Таким образом, как это явствует из приведенных определений, биотехнология по существу сводится к использованию микроорганизмов,

животных и растительных клеток или же их ферментов для синтеза, разрушения или трансформации (превращения) различных материалов с целью получения полезных продуктов для различных нужд человека.

**Современное понятие биотехнологии:** Наука и отрасль производства о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически модифицированных растений, животных и микроорганизмов в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения.

Под биотехнологией понимают отрасль биологической науки, которая включает в себя технологические процессы, направленные на использование клеточных культур, метаболизм и биосинтетические возможности которых обеспечивают выработку ценных продуктов. Таким образом, биотехнология создаёт возможность получения с помощью легкодоступных и возобновляемых ресурсов тех веществ и соединений, которые важны для жизни и благосостояния людей.

**Основной задачей биотехнологии** является разработка процессов, в которых микроорганизмы культур растительных и животных клеток, выделенные из них ферменты, мембраны и клеточные органеллы в свободном или иммобилизованном состоянии используются для получения нужных для человека веществ. Кроме того биотехнология решает задачи, стоящие перед наукой о способах улучшения продуцентов и задачи, стоящие перед производством об интенсификации технологических процессов.

***Практические задачи биотехнологии:***

- получение новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов, используемых в здравоохранении для диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний;
- биологических средств защиты сельскохозяйственных растений от возбудителей заболеваний и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений и животных; новых сортов растений, устойчивых к разного рода неблагоприятным воздействиям (факторам внешней среды); новых пород животных с полезными свойствами (трансгенные животные);
- ценных кормовых добавок для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных (кормового белка, аминокислот, витаминов, ферментов, способствующих повышению усвояемости кормов, и т. п.);
- новых биоинженерных методов для получения высокоэффективных препаратов различного назначения, используемых в сельском хозяйстве и ветеринарии;
- новых технологий создания и получения хозяйственно ценных продуктов для пищевой, химической и микробиологической промышленности;
- эффективных технологий переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов для получения продуктов, которые могут использоваться в других отраслях хозяйственной деятельности человека (например, биогаза, удобрений, топлива для автомобилей и т. п.).

- получение биогаза и биотоплива

## 1.2 Возникновение, становление и развитие биотехнологии

Сами того не подозревая, люди применяли биотехнологические методы с древнейших времен.

Древнейшим биотехнологическим процессом было сбраживание с помощью микроорганизмов. В пользу этого свидетельствует описание процесса приготовления вина, обнаруженное в 1981 году при раскопках Вавилона (6-е тысячелетие до н.э.). Шумеры изготовили до двух десятков видов вина. Египтяне стали применять дрожжи для выпечки хлеба в четвертом тысячелетии до н.э.



*Рисунок 1 – Процесс приготовления пива в Египте*

Человечество познакомилось с микроорганизмами косвенным путем, даже не догадываясь об их существовании. С незапамятных времен наблюдали брожение теста, готовили спиртные напитки, сквашивали молоко, делали сыры. Занимаясь хлебопечением, виноделием, пивоварением, получением кисломолочных продуктов, сыров, пищевого уксуса, они использовали деятельность микроорганизмов.



*Рисунок 2 – Процесс потребления пива шумерами*

От египтян пиво сделало первую попытку «экспортироваться» в сторону Европы (рисунок 1). Одними из первых, кто варил пиво из ячменя, были жители **Шумера, или Месопотамии**, или Междуречья, как древнегреческие географы называли равнину между Тигром и Евфратом, расположенную в их нижнем и среднем течении (рисунок 2). Научно доказано, что уже 6000 лет назад в Месопотамии умели варить напиток из ячменя и ячменного солода. Кстати, первое письменное упоминание о пиве относится именно к временам шумеров. Их пиво называлось «сикару», и уже в тот момент основным продуктом для его производства служил соложенный ячмень.



Первыми пивоварами были, видимо, женщины, домохозяйки (рисунок 3). Они варили пиво из спельты – злака от которого произошла пшеница. Правда, женщинам не удалось сохранить свою монополию, ибо довольно быстро выяснилось, что пиво является очень выгодным товаром. А поскольку торговля в те времена было занятие сугубо мужским, пивоварение вскоре прочно и надолго перешло в мужские руки.

Самым же первым пивоваром, упоминание о котором ученые нашли в клинописных табличках, тоже оказалась женщина, живущая в **Междуречьи за тысячи лет до новой эры**. Немецкий археолог Е. Хубер нашел в храмовом клинописном архиве этого же времени рецепты не менее пятнадцати разновидностей пива. Из найденных им изображений была составлена последовательность сцен, полностью описывающих весь процесс древнего пивоварения.



*Рисунок 3 – Фигурка из крашеного известняка (около 2350 года до н.э.)*

**Основные этапы развития биотехнологии.** Биотехнология как наука формировалась и эволюционировала по мере развития человеческого общества. Видимо правомерно отнести, возникновение современной биотехнологии, начавшей свое формирование на базе существующих отраслей микробиологической промышленности, к началу 50-х годов прошлого века, а весь предшествующий данному периоду этап, назвать предисторией формирования биотехнологии, восходящей к древним цивилизациям. В этой связи третий съезд Европейской ассоциации биотехнологов в Мюнхене (1984 г.) доброжелательно воспринял предложение голландца Е. Хаувинка о выделении 5 периодов (эр) в развитии биотехнологии:

1 Допастеровская эра (до 1865 г.) – Использование спиртового и молочнокислого брожения для изготовления вина, пива, хлеба. Получение кисломолочных продуктов и уксуса.

2 Послепастеровская эра (1866-1940 гг.) – Производство этанола, бутанола, ацетона, органических кислот и бактериальных вакцин. Аэробная очистка канализационных вод. Производство кормовых дрожжей.

3 Эра антибиотиков (1941-1960 гг.) – Производство пенициллина и других антибиотиков путем глубоинной ферментации. Культивирование

растительных клеток и получение вирусных вакцин. Микробиологическая трансформация стероидов.

4 Эра управляемого биосинтеза (1961-1972 гг.) – Производство аминокислот с помощью микробных мутантов. Получение чистых ферментов. Промышленное использование иммобилизованных ферментов и клеток. Анаэробная очистка канализационных вод и получение биогаза. Производство бактериальных полисахаридов.

5 Эра современной биотехнологии (после 1972 г.) – Использование генной и клеточной инженерии в целях получения агентов биосинтеза. Получение моноклональных антител, гибридов из протопластов и мерисистемных культур. Трансплантация эмбрионов.

Если говорить об этапах развития биотехнологии, то до последней трети 19 века длился первый эмпирический этап, при котором главную роль играл многовековой опыт биотехнологического производства.

Огромную роль в разработке научных основ биотехнологии сыграли работы одного, из величайших естествоиспытателей 19-го века - француза Луи Пастера (1822-1895). Начав свою научную карьеру с чисто химических работ, наиболее известной из которых является исследование винных кислот, послужившее толчком к развитию стереохимии, в 50-х годах 19-го века Пастер занялся изучением брожения. Луи Пастер впервые установил огромную роль микроорганизмов, как первопричину разнообразных химических превращений и заболеваний живых существ, также он доказал, что спиртовое брожение вызывается дрожжами, а молочнокислое брожение – молочнокислыми бактериями.

В 1857 г. появляется его работа, в которой Пастер доказывает, что спиртовое брожение сахара есть процесс, тесно связанный с жизнедеятельностью дрожжевых грибков, которые питаются и размножаются за счет бродящей жидкости, при этом часть сахара тратится на постройку дрожжевых клеток и образование побочных продуктов - глицерина и янтарной кислоты. Пастер опроверг господствовавшие тогда взгляды Либиха на брожение как на механико-химический акт. Изучение масляного брожения привело к открытию важного факта: было показано, что микробы масляного брожения могут развиваться только в отсутствие воздуха. Были установлены *два типа бактерий* - аэробные, требующие для своей жизни воздух, и анаэробные, развивающиеся без него. Позже Пастер опроверг теорию самозарождения микроорганизмов. Его работы по вопросу самозарождения имели очень большое значение для развития и применения антисептических методов в хирургии. Пастер всегда переходил от теории к практике. Изучив спиртовое, масляное и молочное брожение и сделав важное обобщение о брожении как жизни в отсутствие воздуха, он занялся вопросами, имеющими важное промышленное значение - изучением болезней вина и условий образования уксуса. Он выработал оптимальные правила для образования уксуса и выяснил причины вредных изменений, которым подвергается вино. Для предохранения вина от вредных изменений

Пастер предложил его повторно нагревать. Позже такое нагревание стали использовать для увеличения сроков хранения пива и молока - этот процесс получил название "пастеризации". Велика роль Пастера в разработке вакцин против многих инфекционных болезней, в частности, сибирской язвы и бешенства. В 1888 г. Пастер создал и возглавил научно-исследовательский институт микробиологии (Пастеровский институт). Работы Пастера оказали, настолько большое влияние на развитие микробиологии (термина "биотехнология" тогда не существовало), что почти столетний период с 60-х годов 19-го века до 40-х годов 20-го века часто называют пастеровской эрой. Пастер установил, что микробы играют основную роль в процессах брожения и показал, что в образовании отдельных продуктов участвуют их конкретные виды. На основе работ Пастера и его учеников в это время были созданы производства этанола, бутанола, ацетона, глицерина, лимонной кислоты, многих вакцин, организованы процессы биологической очистки сточных вод.

В конце XIX века, благодаря трудам Пастера, были созданы предпосылки для развития микробиологии, что также сказалось и на прогрессе биотехнологии. Были предприняты первые попытки наладить производство пищевых концентратов из дрожжей.

Важным достижением этого же периода является приготовление жидких и твердых питательных сред для культивирования микроорганизмов (Р. Кох), поскольку удалось доказать индивидуальность микробов и получать их в чистых культурах. В этот же период было начато изготовление прессованных пищевых дрожжей, а также продуктов метаболизма бактерий – ацетона, бутанола, лимонной и молочной кислот. Во Франции приступили к микробиологической очистке сточных вод.

В 19 веке было также установлено, что вместо живых организмов можно использовать продукты их жизнедеятельности – ферменты. Еще в 1814 году петербургский академик К. С. Кирхгоф открыл явление биологического катализа и пытался биокаталитическим путём получить сахар из доступного отечественного сырья (до середины XIX века сахар получали только из сахарного тростника). В 1891 году японский биохимик Такамина получил первый патент в США на использование ферментных препаратов в промышленных целях: учёный предложил применить диастазу для осахаривания растительных отходов. Такой важный раздел как разработка и производство вакцин и сывороток для предупреждения инфекционных заболеваний человека и животных начал развиваться после эпохальных открытий Пастера, Коха и Беринга, сделанных в конце 19 века.

Во время первой мировой войны в Германии в промышленных масштабах выращивали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые добавляли в колбасу и супы, компенсируя 60% довоенного импорта пищевых продуктов.

Начало следующему этапу развития той отрасли знаний, которую сейчас называют биотехнологией, положила работа английского микробиолога А. Флеминга (1928), отметившего способность нитчатого

гриба зеленой плесени (*Penicillium notatum*) вызывать гибель стафилококков. Дальнейшая работа привела к выделению в чистом виде первого антибиотика пенициллина, открывшего эру антибиотиков (1940-1960 гг.). Открытие Флеминга было подкреплено работами Флори и Чейна по промышленному получению пенициллина (1940 г). За пенициллином последовало получение стрептомицина, тетрациклинов, эритромицина и других антибиотиков, начала развиваться микробиологическая промышленность. Особенно мощный толчок в развитии промышленного биотехнологического оборудования был отмечен в период производства антибиотиков.

Нельзя не сказать об использовании микроорганизмов для минерализации различных отходов. Процесс минерализации органических отходов, основанный на использовании активного ила был разработан в 1914 г. С тех пор он был существенно модернизирован и используется во всём мире для переработки стоков. При современной переработке стоков в анаэробных условиях смешенной микрофлоры, попутно получают биогаз (состоит, в основном, из метана и углекислого газа). Такая переработка энергетически эффективна, так как позволяет сохранить и концентрировать энергию, содержащуюся в различных отходах. При этом регенерируется более 80 % свободной энергии. С помощью этого процесса можно получать значительную часть необходимой энергии.

После второй мировой войны появились новые направления в биотехнологии. В сельском хозяйстве – новые методы селекции растений и животных (включая клонирование). В химическом производстве – получение органических кислот (например, лимонной), ферментов для моющих средств. В энергетике – крупномасштабное производство этанола как жидкого топлива. В пищевой промышленности – создание новых методов переработки и хранения пищевых продуктов, получение пищевых добавок, аминокислот, использование белка, синтезированного одноклеточными организмами и ферментов при переработке пищевого сырья. В мире с помощью микробиологического синтеза производится более 150 тыс. тонн глутамата натрия и 15 тыс. тонн лизина. Микроорганизмы стали использоваться в получении металлов, путем выщелачивания руд. В медицине – стали применять лечебные ферменты, стероиды, новые антибиотики.

Биотехнология – наукоемкая отрасль. Целью биотехнологических исследований является максимальное повышение эффективности каждого из этапов биотехнологического производства и поиск микроорганизмов, с помощью которых можно получить нужные вещества. В 60-70е гг. прошлого века все эти исследования касались только исходной обработки сырья, устройства биореакторов и получения конечного продукта. Благодаря этому был усовершенствован инструментальный контроль процесса ферментации и значительно расширены возможности крупномасштабного культивирования, что позволило повысить эффективность производства.

В 1953 г. в качестве самостоятельной науки о себе заявила молекулярная биология. Это было связано с открытием Д. Уотсоном и Ф. Криком знаменитой двойной спирали дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и постулированием матричного механизма ее синтеза. В течение постантибиотической эры (1960-1975 гг.) были созданы технологии получения аминокислот, витаминов В<sub>2</sub> и В<sub>12</sub>, биогаза, микробиологического белка на парафинах, иммобилизованных ферментов. В 70-х годах 20-го века появился термин "биотехнология". Начало современного этапа развития биотехнологии было положено в 1972 г. публикацией американского биохимика Пола Берга с сотрудниками.

До 70-х годов традиционная биотехнология, как научная дисциплина, была не слишком известна и представлялась скорее, как инженерная химия с микробиологическим уклоном. Т.е. в то время биотехнология занималась производством коммерческих продуктов, образуемых микроорганизмами в результате их жизнедеятельности. Тогда же было дано формальное определение биотехнологии, как «Наука о научных и инженерных принципах переработки материалов живыми организмами с целью создания товаров и услуг» или еще более точное определение: «биотехнология – наука о промышленном производстве товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов».

В настоящее время идет этап молекулярно-биотехнологической революции. Формально началом можно считать 15 октября 1980 г.



*Рисунок 4 - Genentech, Inc. (полное название Genetic Engineering Technology, Inc.), биотехнологическая корпорация, основанная в 1976 году в венчурным капиталистом Робертом Суонсоном и биохимиком доктором Гербертом Бойером.*

15 октября 1980 г. на Нью-Йорской фондовой бирже произошло знаменательно событие: уже через 20 минут после начала торгов стоимость 1 акции биотехнологической компании Genentech поднялась с 35 до 89 \$ (рисунок 4). Это был рекордный для того времени скачек цен на акции коммерческого предприятия. К моменту закрытия торгов в этот день, цена одной акции Genentech составляла 71,25 \$ , а стоимость всех 528 000 акций была столь баснословно высока, что мелкие инвесторы, собиравшиеся приобрести небольшой пакет акций, не имели никаких шансов. По-видимому, это был 1-й случай в истории, когда о начале революции возвестил биржевой колокол.

В 1980 г., когда фирма Genentech впервые предложила обществу свои акции, это была не большая компания в Калифорнии, в течение 4 лет успешно работавшая над проблемой получения рекомбинантных ДНК. Ученым компании удалось выделить фрагменты гена (последовательности ДНК), кодирующие человеческий инсулин, и перенести их в генетические элементы (клонированные векторы), способные реплицироваться в клетках обычной кишечной палочки (*E. coli*). Эти бактериальные клетки работали как биологические фабрики по производству человеческого инсулина, который после соответствующей очистки мог использоваться как лекарственный препарат для больных диабетом, дающих аллергическую реакцию на свиной инсулин. Еще 10 лет назад такое развитие событий представлялось нереальным, но сегодня это стало вполне привычным. Головокружительный взлет стоимости акций компании Genentech предопределялся как реальной оценкой потенциала технологии рекомбинантных ДНК, так и мечтами о будущих возможностях. Многие думали, что новая технология станет тем рогом изобилия 20 в., который напоит и накормит всех желающих. Эти мечты подпитывались энтузиазмом газетных и журнальных публикаций и телевизионных репортажей. Воображение будоражили полчища удивительных микробов, растения и животные, созданные человеком. Энтузиасты предрекали, что генно-инженерные микробы вытеснят химические удобрения, будут уничтожать разливы нефти; появятся растения с передающимися по наследству устойчивостью к вредителям и исключительно высокой питательной ценностью; будут созданы сельскохозяйственные животные, более эффективно усваивающие пищу, быстро прибавляющие в весе и дающие не жирное мясо. Казалось, что скоро конкретные биологические свойства обуславливаются одним или несколькими генами (единицами наследственности), создание организмов с новым генетическим устройством не составит труда. И в самом деле, хотя шумиха, поднятая вокруг новой технологии, была не совсем адекватной, увлечение этой идеей имело основания. Прошло немногим более 15 лет, и многие наиболее разумные проекты стали реальностью.

#### **Основные достижения биотехнологии:**

1917 г. Карл Реки ввел термин «биотехнология»

1943 г. произведен пенициллин в промышленном масштабе

1944 г. Эвери, МакЛеод и МакКарти показали, что генетический материал представляет собой ДНК

В 1950 г. Ж. Моно разработал теоретические основы управляемого культивирования микробов, которое доработали М. Иерусалимский, М. Стефенсон и др.

1953 г. Уотсон и Крик определили структуру молекулы ДНК

В 60-е годы были сформулированы основные принципы конструирования биореакторов для массового культивирования микроорганизмов в промышленных целях – ферментера.

1961 г. учрежден журнал «Biotechnology and Bioengineering»

1961-1966 гг. расшифрован генетический код.

1970 г. выделена первая рестрицирующая эндонуклеаза.

1972г. в США П. Берг создал первую рекомбинантную молекулу ДНК. Коррама и др. синтезировали полноразмерный ген тРНК.

1973 г. Бойер и Коэн положили начало технологии рекомбинантных ДНК.

1975 г. Колер и Мильштейн описали получение моноклональных антител. Впервые, путём гибридизации соматических клеток, получены гибридомы, секретирующие моноклональные антитела.

1976 г. Изданы первые руководства, регламентирующие работы с рекомбинантными ДНК.

1976 г. Разработаны методы определения нуклеотидной последовательности ДНК.

1978 г. Фирма Genentech выпустила человеческий инсулин, полученный с помощью E. coli. Впервые продемонстрирована экспрессия генов гормоном мозга человека – соматотропина и поджелудочной железы – инсулина в бактериальных клетках; инсулин стал первым созданным генно-инженерными методами продуктом, который поступил в продажу и используется людьми, страдающими сахарным диабетом.

1980 г. Верховный суд США слушал дело Даймонд против Чакрабари, вынес вердикт, что микроорганизмы, полученные генно-инженерными методами могут быть запатентованы

1981 г. Поступили в продажу первые автоматические синтезаторы ДНК

1982 год – разрешена к использованию первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК. Поступил в продажу человеческий инсулин, продуцируемый клетками кишечной палочки. Также разработаны генно-инженерные препараты: интерфероны, интерлейкин, соматотропный гормон.

1983 год – показана впервые экспрессия гена растений в растениях других видов. Для трансформации растений применены гибридные Ti-плазмиды.

1986 год – прошло полевое испытание в США и Франции первое трансгенное растение – устойчивый к гербициду табак.

1988 г. Выдан патент США на линию мышей с повышенной частотой возникновения опухолей, полученную генно-инженерными методами. Создан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1990 г. В США утвержден план испытания генной терапии с использованием соматических клеток человека.

1990 г. Официально начаты работы над проектом «геном человека»

1994-1995 гг. Опубликованы подробные генетические и физические карты хромосом человека.

1996 г. Ежегодный объем продаж первого рекомбинантного белка (эритропоэтина) превысил 1 млрд. \$

1996 г. Определена нуклеотидная последовательность всех хромосом эукариотического микроорганизма (*Saccharomyces cerevisiae*).

1997 год – продемонстрирована возможность получения потомства млекопитающих путём оплодотворения яйцеклеток, лишённых ядер, ядрами соматических клеток; этот способ получил название «клонирование» и первым клонированным млекопитающим была овца «Долли».

Развитие и преобразование биотехнологии обусловлено глубокими переменами, происшедшими в биологии в течение последних 25–30 лет. Основу этих событий составили новые представления в области наследственности и методические усовершенствования, которые приблизили человечество к познанию превращений ее материального субстрата и проложили дорогу новейшим промышленным процессам. Помимо этого, ряд важнейших открытий в других областях также повлиял на развитие биотехнологии.

### **1.3 Биотехнология как межотраслевая область научно-технического прогресса и раздел практических знаний**

Биотехнология – стремительно развивающаяся и интегрирующая наука, пронизывающая все биологические науки и направления исследований. Современная биотехнология – это междисциплинарная наука и отрасль производства, которая базируется на использовании биологических объектов и систем при получении пищевых продуктов, энергии, медицинских препаратов; при очистке сточных вод, переработке отходов и др.

Как уже отмечалось выше, биотехнология возникла на стыке многих наук. Для данной науки свойственна трансдисциплинарность. Фундамент биотехнологии составили такие науки, как микробиология, вирусология, физиология, биохимия, генетика, селекция, цитология, молекулярная биология, генетическая инженерия, клеточная инженерия, энзимология, иммунология, биофизика, экология, медицина, сельскохозяйственные науки, химия, физика, математика, кибернетика и др.





Рисунок 5 – Междисциплинарная природа биотехнологии. Связь биотехнологии с другими науками.

Междисциплинарная природа биотехнологии выражается в ее связи с такими науками, как генетика, микробиология, биохимическая и химическая технология и др. (рисунок 5). На развитие биотехнологии существенное влияние оказывают открытия в области генетической инженерии, иммунологии, технологии ферментации.

Можно выделить, по крайней мере, четыре направления, определивших развитие биотехнологии (рисунок 6). Прежде всего, это наиболее «старая» область - *микробиология*.

*Микробиология* – наука о микроорганизмах. Микроорганизмы – это мельчайшие организмы, различимые только под микроскопом. *Основные преимущества промышленного культивирования микроорганизмов*: простота их организации, высокая скорость роста и размножения, большое разнообразие физиологических и биохимических свойств, способность развиваться в условиях непригодных для жизни других организмов, способность разлагать сложные органические соединения (белки, углеводы, в том числе целлюлозу и т.п.), вещества, токсичные для человека и животных (например, метанол, сероводород и т.п.), ксенобиотики (вещества неприродного происхождения).

На настоящем этапе именно микробиологические процессы в наибольшей степени развиты до уровня промышленного использования. Это, прежде всего, крупнотоннажное производство микробной биомассы, антибиотиков и других лекарственных веществ, аминокислот.

Второе направление биотехнологии – *инженерная энзимология*.

*Инженерная энзимология* – это отрасль биотехнологии, базирующаяся на использовании каталитических функций ферментов (или ферментных

систем) в изолированном состоянии или в составе живых клеток для получения соответствующих целевых продуктов. Биообъект (в данном случае) – фермент (или комплекс ферментов), на практике обычно используются иммобилизованные ферменты (иммобилизованные клетки), благодаря чему стабилизируется и пролонгируется их ферментативная активность.

Иногда инженерную энзимологию отождествляют с биотехнологией. В этом содержится большая доля истины, так как все реакции в клетках катализируются ферментами. Однако термин «инженерная» привносит свою специфику, заключающуюся в акценте на создание конструкции, в данном случае – на конструирование биокатализаторов с заданными свойствами с последующим их использованием в биотехнологическом процессе.



Рисунок 6 - Элементы, слагающие биотехнологию

Два других направления биотехнологии – *генная инженерия* и *клеточная инженерия* – самые молодые, но очень перспективные области биотехнологии.

Первое состоит в искусственном конструировании молекул ДНК, несущих всю генетическую информацию о данном организме, т.е. заключающих в себе всю программу его роста и развития. Таким образом, можно направленно влиять на наследственность и получать новые виды с необходимыми свойствами.

В основе *клеточной инженерии* лежит культивирование клеток и тканей высших организмов – растений и животных.

*Клеточная инженерия* – это метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции, базирующийся на использовании методов культуры клеток и тканей.

Биотехнология рождена усилиями многих наук, познающих живую материю, и отвечает социальному заказу развивающегося человеческого общества. Осваивая все новые сферы применения, биотехнология несет в себе огромный практический потенциал улучшения материальных условий существования людей.

В широком смысле биотехнология представляет собой пограничную между биологией и техникой научную дисциплину и сферу практики, изучающую пути и методы изменения окружающей человека природной среды в соответствии с его потребностями.

В узком смысле биотехнология - совокупность методов и приемов получения полезных для человека продуктов и явлений с помощью биологических агентов. В состав биотехнологии входят генная, клеточная и экологическая инженерии.

Современный этап научно-технического прогресса характеризуется революционными изменениями в биологии, которая становится лидером естествознания. Биология вышла на молекулярный и субклеточный уровень, в ней интенсивно применяются методы смежных наук (физики, химии, математики, кибернетики и др.), системные подходы. Бурное развитие комплекса наук биологического профиля с расширением практической сферы их применения обусловлено также социально-экономическими потребностями общества. Такие актуальные проблемы, стоящие перед человечеством второй половины XX века, как дефицит чистой воды и пищевых веществ (в особенности белковых), загрязнение окружающей среды, недостаток сырьевых и энергетических ресурсов, необходимость развития новых средств диагностики и лечения, не могут быть решены традиционными методами. Поэтому возникла острая необходимость в разработке и внедрение принципиально новых методов и технологий. Большая роль в решение комплекса этих проблем отводится биотехнологии, в рамках которой осуществляется целевое применение биологических систем и процессов в различных сферах человеческой деятельности.

#### **1.4 Основные разделы биотехнологии**

Биотехнология как самостоятельная наука начала развиваться в начале XX века, когда были сделаны первые шаги в выращивании изолированных клеток и тканей растений и животных.

В настоящее время биотехнология представляет собой уже биоиндустрию. Последняя включает в себя промышленную биотехнологию (производство белка, аминокислот, витаминов, ферментов, органических кислот), пищевую биотехнологию (производство алкогольных напитков, соков, кисломолочных напитков, хлебопекарных изделий), сельскохозяйственную биотехнологию (получение гербицидов, биоинсектицидов, производство профилактических и терапевтических препаратов для ветеринарии), экологическую биотехнологию (очистка

сточных вод, переработка производственных и хозяйственных отходов), биоэнергетику (получение биогаза, этанола, водорода) и т.д. Объединяет все эти отрасли биотехнологии одно общее свойство – все вышеупомянутые процессы основаны на использовании не искусственных, а природных систем, а именно различных прокариотических и эукариотических организмов.

В современной биотехнологии в соответствии со спецификой сфер ее применения целесообразно выделить в качестве самостоятельных разделов следующие:

- Промышленная микробиология.
- Медицинская биотехнология.
- Технологическая биоэнергетика.
- Сельскохозяйственная биотехнология.
- Биогидрометаллургия.
- Инженерная энзимология.
- Клеточная и генетическая инженерия.
- Экологическая биотехнология.

*Генетическая инженерия:* это создание искусственных генетических программ, с помощью которых направленно конструируются молекулярные генетические системы вне организма с последующим их введением в живой организм.

Генетическая инженерия существует немногим более 20 лет. Она блестяще раскрыла свои возможности в области прокариотических организмов. Однако новые технологии, применяемые к высшим растениям и животным, пока не столь значительны. Попытки применения приемов генетической инженерии к высшим растениям и животным сталкиваются с огромными трудностями, обусловленными как несовершенством наших знаний по генетике эукариот, так и сложностью организации высших организмов.

*Генетическая инженерия* – один из важнейших методов биотехнологии, предполагающий целенаправленное искусственное создание определенных комбинаций генетического материала, способных нормально функционировать в клетке, т.е. размножаться и контролировать синтез конечных продуктов.

Таким образом, генетическая инженерия включает выделение из клеток отдельных генов или синтез генов вне клеток, направленную перестройку, копирование и размножение выделенных или синтезированных генов, а также их перенос и включение в подлежащий изменению геном и таким путем можно добиться включения в клетки бактерий «чужих» генов и синтеза бактериями важных для человека соединений.

Развитие генетической инженерии стало возможным благодаря открытию двух ферментов: *рестриктаз*, разрезающих молекулу ДНК в строго определенных участках и *лигаз*, сшивающих определенные участки различных молекул ДНК друг с другом. Кроме того, в основе генетической

инженерии лежит открытие *векторов*, которые представляют собой короткие, самостоятельно размножающиеся в клетках бактерий кольцевые молекулы ДНК. С помощью рестриктаз и лигаз в векторы встраивают необходимый ген, добиваясь в последствии его включения в геном клетки-хозяина.

Различают следующие виды генетической инженерии:

1. *Генная инженерия*: её сущность состоит в целенаправленном использовании перестроек естественного генома, осуществляемых *in vivo* и *in vitro*, для изменения генетических характеристик известных вирусов и клеток, прямое манипулирование рДНК, включающими отдельные гены.

2. *Геномная инженерия*: её сущность заключается в целенаправленной глубокой перестройке генома акариот, прокариот и эукариот, вплоть до создания новых видов, т.е. перенос всего или большей части генетического материала от одной клетки к другой. При геномной инженерии возможно получение *половых* (слиянием гамет) и *соматических* (слиянием неполовых клеток) *гибридов*.

3. *Хромосомная инженерия* связана с переносом изолированных хромосом от клетки-донора одного организма в клетку-реципиент другого организма.

- *Клеточная инженерия*: это технологии, основанные на возможности выращивания тканей и клеток *in vitro*; на слиянии соматических (неполовых) клеток или их протопластов.

- *Биологическая инженерия*: технологии, основанные на изучении биологических особенностей клеток и внедрении компьютерных методов контроля технологических режимов, позволяющих максимально реализовать полезные свойства клеток.

*Клеточная инженерия животных*. Первые научные эксперименты по культивированию клеток животных были проведены в 1907 году Р. Гаррисоном. Предложенный им метод культивирования клеток в сгустке лимфы с добавлением *эмбриональных экстрактов* используется и в настоящее время.

Выделяют два направления развития клеточной инженерии:

1. использование клеток, переведенных в культуру, для синтеза различных соединений;

2. применение культивируемых клеток для получения из них растений-регенератов.

Растительные клетки в культуре – это важный источник ценнейших природных веществ, т.к. они сохраняют способность синтезировать свойственные им соединения: алкалоиды, эфирные масла, смолы, биологически активные вещества и т.п. Например, клетки женьшеня, переведенные в культуру, продолжают синтезировать, как и в составе целостного растения, ценное лекарственное сырье. Причем в культуре с клетками легче проводить любые манипуляции, используя индуцированный мутагенез, можно повышать продуктивность штаммов культивируемых

клеток и проводить их гибридизацию гораздо проще, чем на уровне целостного организма. Кроме того, с ними, как и с прокариотическими клетками, можно проводить генно-инженерные работы.

Таким образом, клеточная инженерия позволяет конструировать клетки нового типа, комбинировать отдельные фрагменты клеток (ядра, митохондрии, пластиды, цитоплазму и хромосомы и т.п.), соединять клетки различных видов, относящиеся не только к разным родам, семействам, но и царствам.

Клеточная инженерия широко используется в *селекции растений*. Выделены гибриды томата и картофеля, яблони и вишни. Регенерированные из таких клеток растения с измененной наследственностью позволяют синтезировать новые формы, сорта, обладающие новыми свойствами и устойчивые к неблагоприятным условиям среды и болезням. Этот метод широко используется и для «спасения» ценных сортов, пораженных вирусными болезнями.

Основа современного биотехнологического производства – биотехнология микробного синтеза, т.е. синтез различных веществ с помощью микроорганизмов. В крупнотоннажных производствах – производство дрожжей и напитков, этанола, большинства органических кислот и аминокислот, растворителей, ферментов, полисахаридов и т.д. Культуры микроорганизмов применяют также при тонком биосинтезе антибиотиков, витаминов, гормонов. Широкие перспективы открывает возможность микробиологического синтеза белков человека (инсулина, соматотропина, интерферона), создание генно-инженерных вакцин.

Важным разделом современной биотехнологии является также клеточная инженерия. Важнейшие задачи, в решении которых могут помочь клеточные технологии в растениеводстве – создание растений с множественной толерантностью к ряду болезней и неблагоприятным факторам среды, а также увеличение количества белка и обогащение его незаменимыми аминокислотами у зерновых культур. Большие возможности для успешного развития животноводства открыли технология трансплантации эмбрионов, клонирование, гибридная технология и т.д.

К медицинской биотехнологии относят такие производственные процессы, которые завершаются созданием с помощью биообъектов средств или веществ медицинского назначения. Это антибиотики, витамины, ферменты, отдельные микробные полисахариды, которые могут применяться как самостоятельные средства или как вспомогательные вещества при создании различных лекарственных форм, аминокислоты и др.

Иммунобиотехнология объединяет производство вакцин, иммуноглобулинов крови, иммуномодуляторов, моноклональных антител и др. На основе иммунобиотехнологических процессов создаются также профилактические и лечебные средства, объединенные под эгидой медицинской биотехнологии. Вместе с тем, иммунобиотехнологические процессы по целевым продуктам вышли за пределы медицинского

назначения, например, большинство ферментов, аминокислот и др. производятся не только для целей здравоохранения. Поэтому вычленение иммунобиотехнологии в качестве самостоятельной научной субдисциплины является обоснованным, и производственные процессы здесь четко ограничены использованием иммунной системы того или иного микроорганизма или её отдельных компонентов (макрофаги, лимфоциты, различные иммуноглобулины).

Достижения приведенных выше направлений биотехнологии, медицинской биотехнологии и иммунобиотехнологии, позволяют говорить о *биотехнологии лекарственных средств*. Действительно, если взять за основу анализа номенклатуру лекарственных средств Межведомственного экспертного совета (1990 г.), включающую 33 фармакотерапевтических группы препаратов, то, как минимум треть из них производится с использованием современных методов биотехнологии. В дальнейшем это направление исследований и разработок будет иметь тенденцию к неуклонному росту.

В ряде случаев только биотехнология позволяет решать те задачи, которые ставит перед фармацией практическая медицина. К примеру, только биотехнология открывает перед фармацевтической промышленностью возможность производить антибиотики, ряд незаменимых аминокислот, некоторые витамины, ферменты, гормоны, большую часть кровезаменителей и др.

В других случаях биотехнология используется как этап производства лекарственного средства. Обычно в таких ситуациях биотехнологическая стадия начинает технологический процесс (например, получение необходимой биомассы путем культивирования клеток меристемы лекарственных растений) как это имеет место при производстве диосгенина, аймалина и др.

Известны такие производства, в которых биотехнологический этап выступает в качестве промежуточного (перевод сорбита в сорбозу при получении витамина С в среде культивирования уксуснокислых бактерий).

При использовании биотехнологий в фармации их реализуют выращиванием культур тканей высших растений в виде каллуса, суспензионным культивированием клеток животных и растений, культивированием химерных клеток, в геном которых встроены опероны, ответственные за биосинтез лекарственной субстанции. Кроме того, биотехнологии могут успешно конкурировать с тонкими химическими технологиями на отдельных этапах изготовления лекарственного средства, а в ряде случаев (например, синтез витамина В<sub>12</sub>) в состоянии обеспечить всю последовательность сложных химических реакций, необходимых для превращения исходного предшественника (5,6-диметилбензимидазола) в конечный продукт (цианкобаламин).

Микроорганизмы, обитающие в недрах Земли, широко используются в *биогеотехнологии* – при добыче, превращении и переработке природных

ископаемых, нефти и газа. Биогеотехнология получения металлов эксплуатирует способности отдельных микроорганизмов переводить металлы в растворимые соединения (выщелачивание металлов из руд). Рассмотрим некоторые примеры практического применения биогеотехнологии: сульфиды металлов окисляются микроорганизмами и переходят в раствор, из которых их извлекают обычными методами. Микробы очень избирательны по отношению к металлам, и это используют на практике. Например, никаким механическим путем нельзя разделить сульфиды цинка и меди в медно-цинковых концентратах. В настоящее время после пирометаллургической обработки остается сплав, для извлечения из него компонентов применяют дорогостоящую технологию. Бактерии же сначала окисляют цинк, переводя его в раствор, а затем принимаются за окисление меди. Если остановить процесс на стадии, когда цинк уже в растворе, а медь еще в твердом концентрате, то останется разделить твердую и жидкую фазы и выплавить из первой медь.

Как известно, золото расплавляется в царской водке. В незначительных количествах золото присутствует во многих полезных ископаемых, но добыть его трудно. Методы биотехнологии позволяют решить и эту проблему.

Промышленное использование бедных руд с помощью биотехнологии основано на том, что в массив полезного ископаемого через специальные скважины нагнетается биологически активный раствор, а после того как он насытится, вобрав в себя полезный компонент, его откачивают через другую систему скважин.

Методы биогеотехнологии также широко используют для повышения нефтеотдачи нефтяных пластов, для окисления метана в угольных шахтах и пр.

*Биоэнерготехнология* включает биотехнологические процессы, связанные с получением источников энергии – углеводов и биогаза. Биогаз, образующийся в процессе метанового брожения биомассы (навоз, солома, водоросли и т.п.) представляет собой смесь, главные компоненты которой метан (65 %), углекислый газ (30 %) и сероводород (1 %). Другим энергоносителем является этанол, используемый в последнее время в двигателях внутреннего сгорания. Для его производства наиболее пригодны злаки (особенно кукуруза), картофель, сахарная свекла, используемые для сбраживания с помощью дрожжей.

Топливом будущего считают водород. Сейчас предложено несколько вариантов биотехнологических систем для производства водорода, включающих хемотрофные бактерии, цианобактерии, некоторые водоросли и простейшие, которые продуцируют водород. Однако пока ни одна из них неприемлема для практических целей.

Биоэнерготехнологии предстоит ответить на вопросы, связанные с созданием биотопливных элементов, способных превращать химическую



энергию субстратов в другие виды энергии, главным образом в электрическую.

*Экологическая биотехнология* связана с использованием биологических методов борьбы с загрязнением окружающей среды (биологическая очистка сточных вод, загрязненного воздуха, твердых отходов). Наиболее развитым направлением экологической биотехнологии в настоящее время является биологическая очистка сточных вод, как промышленных, так и бытовых.

Биологическая очистка вод – метод очистки бытовых и промышленных сточных вод, основанный на способности организмов (главным образом, бактерий) к разрушению (минерализации) загрязнений органического происхождения. Различают 2 вида биологической очистки: аэробная и анаэробная.

*Космическая биотехнология* делает первые шаги в космосе, осваивая специфические неземные условия. Очевидно, что космос создает для биотехнологических процессов не только большие трудности, но и большие преимущества. Они обусловлены, главным образом, невесомостью, существенно изменяющей течение физико-химических процессов, на которых основаны многие биотехнологии.

Невесомость создает особые условия, важные для осуществления биотехнологических процессов:

- Редуцирует конвекции, вызванные плавучестью, и исключает седиментацию (осаждение под действием гравитационных сил);
- Делает силы поверхностного натяжения выше гравитационных сил;
- Обеспечивает протекание процессов вне емкостей.

В земных условиях температурные различия между жидкостями после их смешивания быстро выравниваются в результате конвекционных перемещений, вызванных различными плотностями теплых и холодных слоев жидкости. В условиях невесомости этого не происходит, что крайне важно для процессов разделения систем – сохраняется гетерогенность фаз, что качественно улучшает разрешающую способность методов разделения, повышает выход и чистоту получаемых продуктов.

Кроме того, невесомость способствует созданию благоприятных условий для процессов кристаллизации белков – важного для многих биотехнологий процесса получения высококачественных белковых продуктов.

Другая из вышеупомянутых особенностей космических условий состоит в отсутствии стенок сосудов, что важно, поскольку исключаются возмущающие нормальное течение процесса пристеночные явления, меняющие физико-химические свойства жидкости и оказывающие воздействие на поведение находящихся в ней компонентов. К тому же и сами стенки, какими бы они не были нейтральными, являются источниками загрязнений и дополнительных электрических, химических сил, могут избирательно сорбировать вещества.

Условия невесомости более благоприятны также для такого процесса, как инкапсулирование клеток в полупроницаемые мембраны, например, клетки поджелудочной железы животных, которые затем можно имплантировать в тело больных сахарным диабетом, где они могут продуцировать инсулин. Инкапсулированные клетки печени можно использовать для создания искусственных органов с целью очистки крови.

Поскольку биотехнология используется в различных отраслях промышленности и затрагивает многие сферы жизни человека, в мире принята следующая "цветовая" классификация биотехнологии:

❖ **"красная" биотехнология** – биотехнология, связанная с обеспечением здоровья человека и потенциальной коррекцией его генома, а также с производством биофармацевтических препаратов (протеинов, ферментов, антител);

❖ **"зеленая" биотехнология** - направлена на разработку и создание генетически модифицированных (ГМ) растений, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам, определяет современные методы ведения сельского и лесного хозяйства;

❖ **"белая"** - промышленная биотехнология, объединяющая производство биотоплива, биотехнологии в пищевой, химической и нефтеперерабатывающей промышленности;

❖ **"серая"** - связана с природоохранной деятельностью, биоремедиацией;

❖ **"синяя" биотехнология** – связана с использованием морских организмов и сырьевых ресурсов.

Термины предложены в 2003 г. на Всемирном форуме по биологическим наукам (рисунки 7, 8).

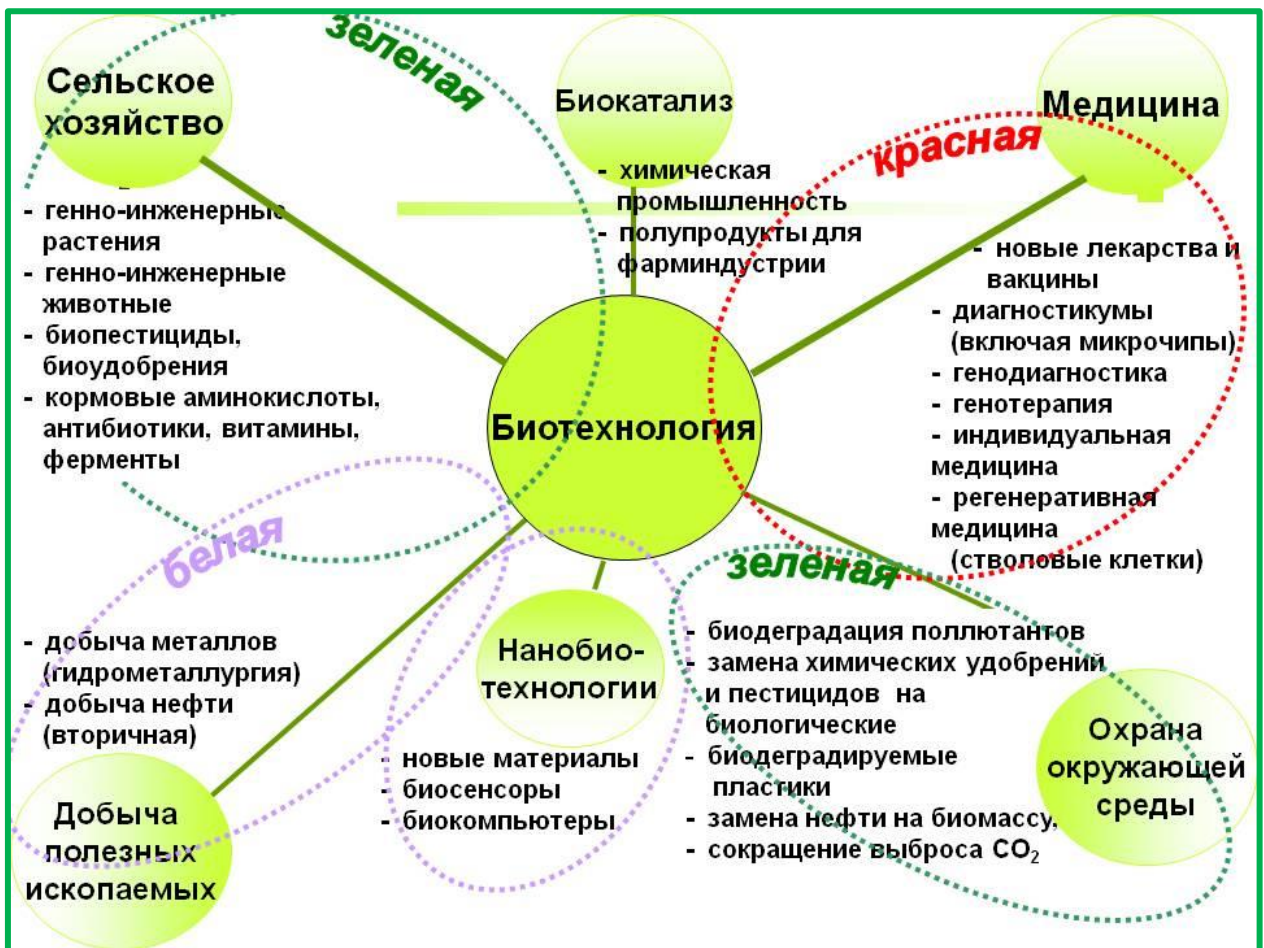


Рисунок 7 – Направления биотехнологии



Рисунок 8 - Сегменты мировой биотехнологической индустрии

## 1.5 Современное состояние и области применения биотехнологии

Области применения биотехнологии представлены в таблице 1. В настоящее время разработаны способы получения более 1000 наименований продуктов биотехнологическими способами. В США совокупная стоимость этих продуктов в 2000 г. оценивается в десятки миллиардов долларов. Все отрасли, в которых может быть использована биотехнология, перечислить практически невозможно.

Таблица 1 - Области использования биотехнологии

Область применения	Примеры
Медицина, здравоохранение, фармакология	Антибиотики, ферменты, аминокислоты, кровезаменители, алкалоиды, нуклеотиды, иммунорегуляторы, противораковые и противовирусные препараты, новые вакцины, гормональные препараты (инсулин, гормон роста и др.), моноклональные АТ для диагностики и лечения, пробы ДНК для диагностики и генотерапии, продукты диетического питания
Получение химических веществ	Этилен, пропилен, бутилен, окисленные углеводороды, органические кислоты, терпены, фенолы, акрилаты, полимеры, ферменты, продукты тонкого органического синтеза, полисахариды
Животноводство	Усовершенствование кормовых рационов (производство белка, аминокислот, витаминов, кормовых антибиотиков, ферментов, заквасок для силосования), ветеринарных препаратов (антибиотики, вакцины и т.д.), гормонов роста, создание высокопродуктивных пород, пересадка оплодотворённых клеток, эмбрионов, манипуляции с чужеродными генами
Растениеводство	Биорациональные пестициды, бактериальные удобрения, гибберелины, производство безвирусного посадочного материала, создание высокопродуктивных гибридов, введение генов устойчивости к болезням, засухе, заморозкам, засолённости почв
Рыбное хозяйство	Кормовой белок, ферменты, антибиотики, создание генетически модифицированных пород с усиленным ростом, устойчивых к заболеваниям
Пищевая	Белок, аминокислоты, заменители сахара (аспартам,

промышленность	глюкозофруктовый сироп), полисахариды, органические кислоты, нуклеотиды, липиды, переработка пищевых продуктов
Энергетика и добыча полезных ископаемых	Спирты, биогаз, жирные кислоты, алифатические углеводороды, водород, уран, интенсификация добычи нефти, газа, угля, искусственный фотосинтез, биометаллургия, добыча серы
Тяжёлая промышленность	Улучшение технических характеристик каучука, бетонных, цементных, гипсовых растворов, моторных топлив; антикоррозийные присадки, смазки для проката чёрных и цветных металлов, технический белок и липиды
Лёгкая промышленность	Улучшение технологии переработки кож, производства текстильного сырья, шерсти, бумаги, парфюмерно-косметических изделий, получение биополимеров, искусственных кожи и шерсти и т.д.
Биоэлектроника	Биосенсоры, биочипы
Космонавтика	Создание замкнутых систем жизнеобеспечения в космосе
Экология	Утилизация сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, биодegradация трудноразлагаемых и токсических веществ (пестицидов, гербицидов, нефти), создание замкнутых технологических циклов, производство безвредных пестицидов, легкоразрушаемых полимеров
Научные исследования	Генно-инженерные и молекулярно-биологические исследования (ферменты рестрикции ДНК, ДНК- и РНК-полимеразы, ДНК- и РНК-лигазы, нуклеиновые кислоты, нуклеотиды и т.д.), медицинские исследования (средства диагностики, реактивы и пр.), химия (реактивы, сенсоры)

Возможностей использования биологических технологий в современном мире гораздо больше, чем в древности. Сегодня биотехнологии используются:

- в пищевой промышленности;
- в получении лекарственных препаратов;
- в сохранении генофонда растений и животных с помощью высушивания и замораживания биологических объектов в жидком азоте.

Важнейший раздел современной биотехнологии – изучение генофонда методами генной и клеточной инженерии.

Методы биотехнологии нашли широкое применение в *сельском хозяйстве*. Они позволяют очищать окружающую среду от отходов различных производств, токсических веществ с использованием фильтров из

корней растений, очищающих сточные воды от тяжелых металлов. Получить клонированные бактериальные гены, которые уже используются для создания трансгенных растений, устойчивых к ряду болезней, а также получение в Беларуси первых трансгенных козлят от разных конструкций по лактоферину человека и т. д.

Современная биотехнология, базируясь на методах клеточной и генной инженерии, путём конструирования нужных генов позволяет управлять наследственностью и жизнедеятельностью микроорганизмов, растений и животных и создавать организмы с новыми полезными свойствами, ранее не наблюдавшимися в природе; а именно позволяет создавать организмы с повышенной устойчивостью к стрессовым факторам среды, высокой продуктивностью и качеством продукции, решать задачи по оздоровлению экологической обстановки в природе и во всех отраслях промышленности.

Сегодня успешно развиваются такие отрасли биотехнологии, как: - биотехнология пищевых продуктов - биотехнология улучшения продуктивности сельского хозяйства - биотехнология препаратов для сельского хозяйства - биотехнология лекарственных препаратов и средств диагностики - биотехнология препаратов и продуктов для промышленного использования - биотехнология утилизации отходов и, тем самым, уменьшение загрязнения окружающей среды.

Использование научных достижений и практические успехи биотехнологии обеспечиваются фундаментальными исследованиями и реализуется на самом высоком уровне современной науки. В этом плане нельзя не отметить удивительную научную многоликость биотехнологии: ее развитие и достижения теснейшим образом связаны и зависят от комплекса знаний не только наук биологического профиля, но также и многих других.

Биологические технологии (биотехнологии) обеспечивают управляемое получение полезных продуктов для различных сфер человеческой деятельности. Эти технологии базируются на использовании каталитического потенциала различных биологических агентов и систем – микроорганизмов, вирусов, растительных и животных клеток и тканей, а также внеклеточных веществ и компонентов клеток. В настоящее время разработка и освоение биотехнологии занимают важное место в деятельности практически всех стран. Достижение превосходства в биотехнологии является одной из центральных задач в экономической политике развитых стран. Лидерами биотехнологии считаются сегодня США и Япония, накопившие многолетний опыт биотехнологий для сельского хозяйства, фармацевтической, пищевой и химической промышленности. Прочное положение в производстве ферментных препаратов, аминокислот, белка, медикаментов занимают страны Западной Европы (ФРГ, Франция, Великобритания), а также Россия. Эти страны характеризуются мощным потенциалом новой техники и технологии, интенсивными фундаментальными и прикладными исследованиями в различных областях

биотехнологии. Определить сегодня, что же такое биотехнология, весьма не просто.

Вместе с тем, само появление этого термина в нашем словаре глубоко символично. Оно отражает мнение, что применение биотехнологических материалов и принципов в ближайшие годы радикально изменит многие отрасли промышленности и само человеческое общество. Интерес к этой науке и темпы ее развития в последние годы растут очень быстро.

Человек использовал биотехнологию многие тысячи лет: люди занимались пивоварением, пекли хлеб, получали кисломолочные продукты, применяли ферментации для получения лекарственных веществ и переработки отходов. Но только новейшие методы биотехнологии, включая методы генетической инженерии, основанные на работе с рекомбинантными ДНК, привели к «биотехнологическому буму», свидетелями которого являемся мы в настоящее время. Новейшие технологии генетической инженерии позволяют существенно усовершенствовать традиционные биотехнологические процессы, а также получать принципиально новыми, ранее недоступными способами разнообразные ценные продукты.

#### **Трёхкомпонентный состав современной биотехнологии**

1. Генетическая инженерия
2. Промышленная биотехнология
3. Клеточная инженерия

### **1.6 Состояние и перспективы развития биотехнологии Казахстана**

#### **1.6.1 Мировые тенденции в биотехнологии**

К сегодняшнему дню биотехнология превратилась в одно из направлений промышленности, имеющих макроэкономическое значение. Развитые страны уделяют ее развитию огромное значение, и поэтому во всех ведущих странах мира разработаны и действуют национальные и международные программы по биотехнологии, финансируемые государственным и частным капиталом. Так, показателем высоко роста мирового рынка биотехнологий является его ежегодный прирост на 7%.

Годовой объем продаж биотехнологических препаратов в мире составил:

- пищевой промышленности и сельского хозяйства – \$46 млрд;
- семенной материал генно-модифицированных растений - \$30 млрд.;
- фармацевтических препаратов - \$27 млрд.;
- ферментов для производства моющих средств - \$21 млрд.;
- лечебно-косметических средств, полученных из растительного и животного сырья – около \$40 млрд.

А к 2010 году прогнозируется рост общего объема рынка биотехнологий свыше \$2 трлн. Больше половины оборота современной мировой биоиндустрии приходится на долю США, объем финансирования

биотехнологии в США составляет около \$100 млрд. В Казахстане на 2008 год в бюджете республики на целевые исследования и разработки в области биотехнологии запланирована сумма порядка \$28 млн. (3,5 млрд тенге).

В настоящее время биотехнология стремительно выдвинулась на передовые позиции научно-технического прогресса и это обусловлено рядом ее особенностей:

во-первых, биотехнологическое производство является в высшей степени наукоемким производством, а это значит, что его развитие влечет за собой существенное повышение эффективности экономики;

во-вторых, в сфере биотехнологии, как ни в одном из других разделов современной науки бывает трудно разграничить фундаментальные исследования, с одной стороны, и прикладные – с другой. Это находит свое выражение в том, что в биотехнологии практически отсутствует временной разрыв между получением фундаментального результата и разработкой технологий, позволяющих осуществить его практическое освоение;

в-третьих, технологии, основанные на использовании клеток и биологических молекул, предоставляют нам большие возможности в использовании природного разнообразия, результаты фундаментальных биотехнологических исследований обладают относительно хорошей программируемостью и потенциальной практической важностью;

в-четвертых, дает возможность замены не возобновляемых ресурсов возобновляемыми, она расценивается как средство разрешения проблем, связанных с дефицитом не возобновляемых природных ресурсов.

Практическое использование результатов научных исследований превращается в средство рыночной политики.

### **1.6.2 Приоритетные направления фундаментальных и прикладных научных исследований**

Для Республики Казахстан развитие биотехнологии является одним из приоритетов научно-технической политики. В соответствии с Стратегией индустриально-инновационного развития Республики Казахстан на 2003-2015 годы биотехнология определена как приоритетная область развития экономики государства.

Важнейшим условием успешной реализации государственной научно-технической политики является концентрация научного потенциала на приоритетных направлениях науки и техники, реализация которых должна внести значительный вклад в социально-экономическое и научно-техническое развитие страны, обеспечить отечественную промышленность передовыми конкурентоспособными технологиями.

Процесс отбора приоритетов сложен и требует всестороннего и целенаправленного подхода. В мировой практике существуют достаточно формализованные критерии отбора приоритетов. Одним из основных являются:



1 Перспективы реализуемости (внедрения), зависящие от темпов внедрения передовых технологий, масштабов использования новейших научно-технических достижений, относительной ограниченности опыта трансформации имеющегося технологического потенциала, промышленный и коммерческий успех.

2 Наличие достаточного научного задела для освоения тех или иных базовых технологий. Без этого выбранные приоритеты будут рассчитаны на внешние заимствования.

3 Экономическая целесообразность развития того или иного направления с точки зрения долгосрочных экономических перспектив, конкурентоспособности проблем занятости. Тщательный отбор и адаптация новых элементов в науке и технологиях, применение которых будет наиболее эффективным для экономики.

В фундаментальной сфере – это функциональная геномика и протеомика, новейшие клеточные технологии медицины, биоразнообразие, экология и геохимическая деятельность микроорганизмов в биосфере, решение проблем генотерапии, нанобиотехнологии, разработка научных основ инженерной энзимологии.

В числе прикладных приоритетов – генно-инженерные и компьютерные технологии конструирования вакцин и лекарственных препаратов нового поколения, функциональных пищевых продуктов, разработка диагностических ДНК-чипов, технология создания антибиотиков нового поколения, получения ДНК-маркеров в селекции животных и растений, освоение высоких биотехнологий в растениеводстве.

*Публикации в международных экспертных изданиях, национальные и международные патенты*

Количество национальных патентов, полученных в 2005-2006 годах, составило 49, при этом патентов USPTO, Западной Европы, Японии всего лишь 1. Патентами, зарегистрированными за рубежом, обладает только АО «Научно-производственный центр «Фитохимия». Отсутствие патентов СНГ и зарубежных патентов, а также реализованных лицензий свидетельствует о низком уровне готовности разработок к коммерциализации. В анализ показал, что в динамике последних семи лет значительных изменений в сторону прорыва в науке в работе научных организаций не наблюдалось.

Для развития биотехнологии инициирован ряд реформ, которые поддержаны Министерством образования и науки Республики Казахстан и утверждены постановлениями Правительства Республики Казахстан. В рамках государственной программы развития науки в Республике Казахстан на 2007-2012 гг. планируется на базе РГП «Национальный центр биотехнологии Республики Казахстан» по научному приоритету «Биотехнологии» создать национальную научную лабораторию открытого типа.

### 1.6.3 Проблемы, задачи и возможности биотехнологии Казахстана

1. Применение биотехнологий регулируется многочисленными национальными и международными правилами, которые создают для этой отрасли, как определенные возможности, так и трудности. Население Казахстана находится в абсолютном неведении относительно биотехнологии. При этом уровень квалификации отечественных экспертов в вопросах вредности-безвредности биотехнологической продукции сомнителен. Вне зависимости от того, будет Казахстан или не будет развивать собственные биотехнологии, в условиях глобализации республика будет втянута в потребление продукции мировой биоиндустрии. Казахстан не должен стать опытной лабораторией развитых стран мира.

Для недопущения негативных последствий необходимо поставить надежную защиту, для чего Казахстану надо иметь высококвалифицированные службы контроля и мониторинга использования импортных и отечественных продуктов биотехнологий.

2. В Казахстане отсутствуют или не выполняются нормы, регулирующие внедрение последних достижений биотехнологии. В этой связи происходит бесконтрольное внедрение новейших биотехнологических методов и продуктов (генномодифицированные источники, клонирование, стволовые клетки). Необходимо принять соответствующие законодательные документы, способствующие развитию генноинженерных исследований, в частности присоединение Казахстана к Картахенскому протоколу по биобезопасности.

3. Важным условием для обеспечения конкурентоспособности отечественных разработок в биотехнологий, является создание условий для коммерциализации всего процесса от науки до производства продукции.

Зарубежные специалисты, пытающиеся работать в Казахстане в области высокотехнологичного бизнеса и коммерциализации технологий, обращают внимание в первую очередь на такие препятствия, как:

- нехватку квалифицированных менеджеров;
- коррупцию, и как следствие – непрозрачность казахстанских компаний;
- не стимулирующий налоговый режим для развития инновационной деятельности и инвестиций в несырьевые сектора экономики;
- отсутствие технической инфраструктуры в узком (технологической) и широком (неудовлетворительное состояние дорог, аэропортов, коммуникаций, визового режима) смыслах слова.

4. Во всех промышленно развитых странах функционирование биологической промышленности происходит в рамках государственных исследовательских программ с последующей коммерциализацией результатов частным сектором.

По результатам такой политики в экономически развитых странах сформировалась система государственно-частного инновационного

партнерства, при котором государственная власть и бизнес выступают как равноправные партнеры, взаимно дополняя друг друга. Государство, поддерживая проведение научно-исследовательских работ и систему образования, являющихся источниками инноваций, создает благоприятные условия и среду стимулирования предпринимательства, а бизнес берет на себя весь коммерческий риск работы на рынке инновационной продукции. Государство получает свою выгоду от сбора налогов и решения социальных проблем, а бизнес – свою прибыль.

5. Биотехнологические производства – это производства наукоемкие. Без научной разработки новых технологических приемов, новых штаммов-продуцентов предприятия быстро утрачивают конкурентоспособность. Сейчас для предприятий затруднен доступ к научным разработкам, сделанным за счет государственных средств и находящихся в государственной собственности. Необходим более ясный и четкий правовой механизм вовлечения таких разработок в производство вплоть до предоставления инновационным компаниям и промышленным предприятиям права бесплатно использовать в своем производстве запатентованные разработки, сделанные за счет бюджетных средств. По мере создания соответствующих предпосылок от этого порядка можно будет отказаться.

6. Другой сложностью является практическое отсутствие в стране биотехнологических инновационных компаний. В условиях Казахстана пока нет государственной инфраструктуры в сфере биотехнологий, которая могла бы на своей базе дать возможность зародиться и развиваться отечественному бизнесу. Необходима система государственных мер по их образованию и поддержке.

Создание производственных помещений общего пользования с наличием широкомасштабного оборудования для пользования учеными и предпринимателями (напр. оптимизация повышения ферментации, синтез ДНК, электронная микроскопия и т.д.).

В связи с вышесказанным, наиболее эффективной моделью организации научно-исследовательской деятельности в Республике Казахстан будет создание специализированных подразделений, которые будут заниматься фундаментальными, прикладными исследованиями и опытно-конструкторскими разработками, затем созданием опытных образцов, их испытаниями и доведением до «товарной» стадии и далее по циклу. Проблематика исследования будет определяться потребностями мирового рынка с одной стороны, с другой стороны фундаментальные исследования позволят прогнозировать пути развития и потребности общества, что станет залогом востребованности разработок прикладного характера в будущем. Результатом деятельности таких подразделений будет продукция, готовая к массовому производству в соответствии со спросом.

7. Государство должно иметь активную позицию в вопросе становления и развития отечественной биотехнологии, потому что «рыночные силы» здесь не работают. Рынок сам по себе не сможет заставить

инвесторов уйти из наиболее прибыльных на сегодня сырьевых секторов и переместить свободные капиталы в сектора с очень высокими рисками и гораздо более длительными сроками окупаемости.

Существует многообразие механизмов, с помощью которых в развитых странах мира государство участвует в создании благоприятного инвестиционного климата и содействует коммерциализации результатов исследовательской деятельности. В обобщенном виде применяемые инструменты можно разделить на несколько больших групп:

- прямое финансовое участие государства в виде финансирования определенных проектов (например, в программу развития Национального центра биотехнологии или участие в венчурном финансировании) или организаций (например, малых научно-производственных фирм);

- поддержка связей между государственным и частным сектором в научно-исследовательской сфере (государственно-частные партнерства);

- финансирование создания элементов производственно-технологической инфраструктуры (научно-исследовательских центров, технопарков, инкубаторов, офисов по продвижению технологий).

- создание ощутимых преференций для частного капитала путем разделения рисков, уменьшение налоговой нагрузки, устранение различного рода барьеров.

8 Важное значение отводится сектору малого инновационного предпринимательства (МИП), выполняющего ведущую роль в апробации и освоении новейших и наиболее рискованных биотехнологий. Во всем мире сектор МИП является движущей силой инновационного развития высокотехнологичных отраслей промышленности.

Государство должно помогать предприятиям, желающим применить современные технологии, базирующиеся на применении биотехнологических продуктов, в проведении соответствующих преобразований. Целесообразной является, на наш взгляд, на современном этапе, и поддержка предприятий, приобретающих биотехнологическую продукцию отечественного производства. Такой порядок, например, может действовать в отношении сельхозпредприятий, приобретающих отечественные минеральные удобрения и средства защиты растений.

9. Финансовая инфраструктура должна обеспечивать эффективный доступ субъектов инновационной деятельности к государственным и частным финансовым ресурсам. Биотехнологические предприятия страны требуют сейчас значительных инвестиций для замены устаревших и изношенных основных фондов, приобретения современных штаммов-продуцентов и технологий. Использование кредитов, проценты по которым в 2-3 раза выше, чем за рубежом, ставит предприятие в заведомо невыгодные условия по сравнению с зарубежными конкурентами.

Государство должно уточнить налоговую политику в отношении высокотехнологичных предприятий, в частности в отношении био-

технологических предприятий – снизить налоговую нагрузку, предоставить налоговые льготы.

#### 10. Защита прав интеллектуальной собственности.

В связи с подготовкой Казахстана к вступлению во Всемирную Торговую Организацию (ВТО), одним из важных вопросов является приведение национального законодательства в сфере интеллектуальной собственности в соответствие с Соглашением о торговых аспектах прав интеллектуальной собственности (TRIPS).

В первую очередь необходимо разработать четкие процедуры закрепления и передачи прав на интеллектуальную собственность, созданную за счет средств фондов, а также возможность оценки и выставления в залог таких нематериальных активов, как права на интеллектуальную собственность и других.

Лицензирование технологий – создать департаменты лицензирования и коммерциализации технологий в главных институтах и производствах страны под руководством квалифицированных специалистов в области разработки патентов и производства в целом.

11. Опыт работы казахстанских институтов развития в регионах может стать катализатором развертывания инициатив на местном уровне и способствовать привлечению средств региональных бюджетов в сферу биотехнологии. Финансирование объектов может происходить на долевой основе с участием местных органов власти, других фондов и частных инвестиций. Это позволит сконцентрировать средства, достаточные для апробации экспериментального и быстрого запуска промышленного производств в сфере биотехнологии, в первую очередь в регионах с высоким инновационным потенциалом.

12. Внедрение международных стандартов в системе образования и формирования кадрового потенциала

Для осуществления биотехнологических проектов необходимо привлечение высоко профессионального менеджмента. В Казахстане образование в области технологического менеджмента является развивающейся областью. Финансирование подготовки кадров в области технологического менеджмента является либо бюджетным, либо смешанным (слушатели курсов оплачивают обучение). Это отличает ситуацию в Казахстане от той, которая существует в развитых странах мира. Так, в США, Великобритании и Израиле государство не берет на себя расходы по подготовке технологических менеджеров. Обычно подготовка таких кадров ведется в составе частных бизнес-школ, либо в структурах, которые связаны с инкубаторами. В связи с тем, что в нашей стране вся инновационная система является новшеством, меры государственной поддержки необходимы.

13. Стимулирование образования кластеров (территориальных комплексов) биотехнологической промышленности путем создания в отдельных регионах «критической массы» исследовательских организаций,

промышленной базы и учебных центров, способных самостоятельно развиваться в рыночных условиях.

Успешным примером реализации и развития биотехнологического кластера является опыт Института фитохимии в г. Караганда, вокруг которого сосредоточены фармзавод, вуз, экспериментальное хозяйство. На этой базе необходимо формировать и развивать фармацевтический кластер для обеспечения казахстанского рынка конкурентоспособным лекарственным препаратом и создания модели индустриально-инновационного развития биотехнологии в стране.

**Контрольные вопросы:**

1. Что означает термин «биотехнология»?
2. Что изучает биотехнология?
3. Определение биотехнологии, ее объекты.
4. На какой период приходится начало интенсивного развития биотехнологии?
5. История биотехнологии, её зарождение и этапы развития.
6. Биотехнология как наука. История развития.
7. Связь с фундаментальными науками XX века.
8. Основные разделы биотехнологии.
9. Биотехнология как научная дисциплина. Определения. Генетическая связь с другими науками.
10. Этапы становления биотехнологии.
11. Цели и задачи биотехнологии.
12. Предпосылки возникновения и развития биотехнологии как науки и сферы производства.
13. Классификация продуктов биотехнологии. Характеристика.

Примеры.

14. Основные направления и разделы биотехнологии: фармацевтическая (биотехнология лекарственных средств), геологическая, энергетическая, сельскохозяйственная, пищевая, экологическая и космическая биотехнология. Характеристика. Направления и перспективы развития.

15. Виды биологических объектов, применяемых в биотехнологии, их классификация и характеристика.

16. Биологические объекты животного происхождения. Характеристика. Примеры их практического применения.

17. Биологические объекты растительного происхождения. Классификация. Характеристика. Примеры их практического применения.

18. Микроорганизмы как объекты биотехнологического производства. Классификация. Характеристика. Преимущества культивирования объектов микробного происхождения в сравнении с растительными и животными биологическими объектами. Сферы практического применения продуктов микробиологического синтеза.

19. Ферменты как биологические объекты. Классификация. Характеристика. Сферы практического применения.

20. Перспективные направления развития биотехнологии как науки и сферы производства. Примеры.

21. Клеточная инженерия: предмет, исторические этапы становления, перспективные направления развития. Области практического применения достижений клеточной инженерии.

22. Инженерная энзимология. Цели. Задачи. Перспективы развития.

## 2. BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

### 2.1 Элементы, слагающие биотехнологические процессы

Основными элементами, слагающими биотехнологические процессы, являются: биологический агент, субстрат, аппаратура и продукт.

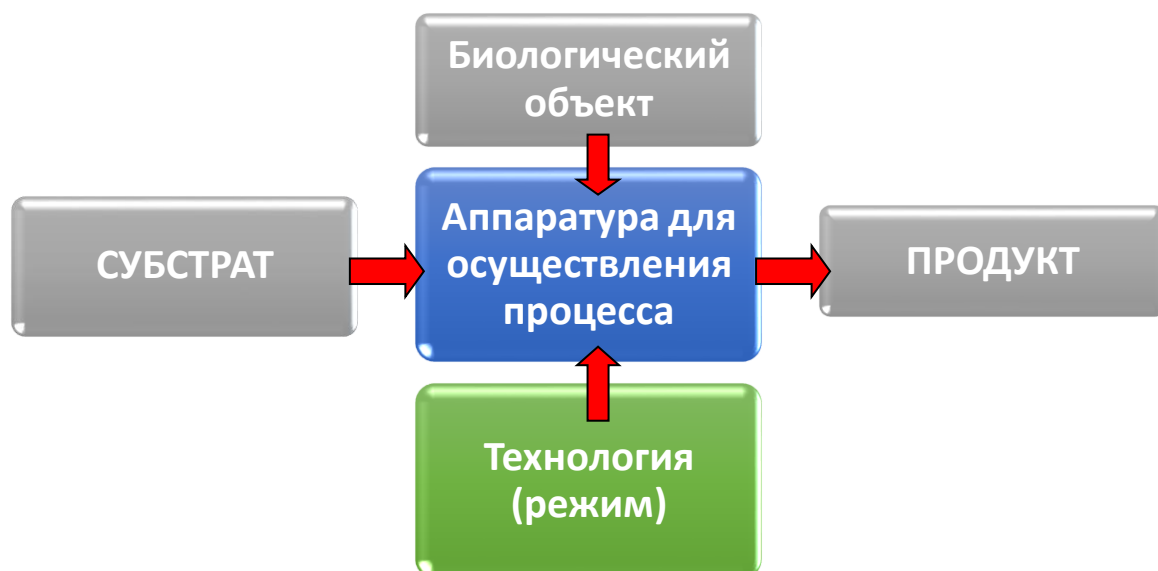


Рисунок 9 – Основные компоненты биотехнологической системы

Структура и особенности биотехнологии могут охватывать отдельные операции или процесс в целом. Совершенствование биотехнологического процесса может привести к созданию новых структурных единиц и к ликвидации устаревших.

Определяющими факторами в данном случае являются:

- используемый биологический агент;
- субстрат и его биохимические и биофизические характеристики;
- аппаратное оформление, включая системы контроля и управления;
- технологический режим или способ реализации;
- соответствие технологических процессов, оборудования, помещений,

качества продукции и ее упаковки международным требованиям GMP.

Состав любой биотехнологической системы может быть представлен схемой (рисунок 9).

Основные компоненты биотехнологической системы:

*Биологическим агентом* биотехнологической системы может быть клетка (прокариот, эукариот) или вирусная частица.

*Субстратом* является питательная среда для культивирования клеток, продуктом биомасса клеток, вирусов или синтезируемое клетками вещество, которому при соответствующей обработке придается товарный вид.

Одним из основных элементов *аппаратурного обеспечения* биотехнологического процесса является биореактор (аппарат-культиватор,



ферментер). При определенных параметрах и режимах культивирования в биореакторах можно выращивать практически любые клетки.

Ассортимент продуктов, получаемых в биотехнологических процессах, чрезвычайно широк (таблица 2). По разнообразию и объемам производства на первом месте стоят *продукты, получаемые в процессах, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов*. Эти продукты подразделяются на три основные группы:

1-я группа – биомасса, которая является целевым продуктом (белок одноклеточных) или используется в качестве биологического агента (биометаногенез, бактериальное выщелачивание металлов);

2-я группа – первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микроорганизмов в качестве строительных блоков макромолекул, коферментов (аминокислоты, витамины, органические кислоты);

3-я группа – вторичные метаболиты (идиолиты) – это соединения, не требующиеся для роста микроорганизмов и не связанные с их ростом (антибиотики, алкалоиды, гормоны роста и токсины).

Среди продуктов микробиологического синтеза – огромное количество различных биологически активных соединений, в том числе белковых и лекарственных веществ, ферментов, а также энергоносители (биогаз, спирты) и минеральные ресурсы (металлы), средства для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур (биоинсектициды) и биоудобрения. В связи с развитием новейших методов биотехнологии (инженерной энзимологии, клеточной и геной инженерии) спектр целевых продуктов непрерывно дополняется. Среди них все большее место занимают средства диагностики и лечения (гибридомы, моноклональные антитела, вакцины и сыворотки, гормоны, модифицированные антибиотики).

Таблица 2 - Продукты биотехнологии

Направление биотехнологии	Область применения	Характеристика процесса	Продукты
Red	Медицина	Продукты тонкого биосинтеза (0,1-1000 т/ год). Дорогая очистка	Антибиотики, БАВ, рекомбинантные антитела, вакцины, витамины, лекарства для животных, диагностикумы
Green	Сельское хозяйство	Продукты маломасштабного биосинтеза (< 20000 т/ год)	Органические аминокислоты, белковая масса, ферменты, дрожжи, производство лекарств растениями,

			ферментированные продукты питания и напитки, генетически модифицированные семена, биопестициды, биоудобрения; Биотопливо, биоразложение,
White	Промышленность	Крупномасштабный биосинтез (> 20000 т/год). Основное условие – дешевизна	Использование микроорганизмов и ферментов в промышленном производстве химических веществ, еды, кормов, текстиля, детергентов, бумаги, биополимеры для отдельных отраслей промышленности (полисахариды для извлечения остатков нефти, выщелачивания Me из руд), сточные воды после биоочистки
Blue	Моря и воды	-	-

### 2.1.1. Биологические агенты

**Биологический агент.** Биологический агент является активным началом в биологических процессах и одним из наиболее важных из элементов. Номенклатура биологических агентов бурно расширяется, но до настоящего времени важнейшее место занимает традиционный объект - микробная клетка. Микробные клетки могут быть выделены из природных источников и далее существенно модифицированы и улучшены с помощью традиционных (селекции, отбора) и новейших (клеточной и генетической инженерии) методов.

При выборе биологического агента и постановке его на производство, прежде всего, следует соблюдать принцип технологичности штаммов. Это значит, что микробная клетка, популяция или сообщество особей должны сохранять свои основные физиолого-биохимические свойства в процессе длительного ведения ферментации.

До получения биологического агента, который соответствует принципу технологичности, ни один целевой продукт не может быть рекомендован для крупномасштабных разработок, требующих затраты значительных средств.

**Штамм** – культура микроорганизма, наследственная однородность которой поддерживается отбором по специфическим фенотипическим признакам, ему принадлежит ключевая роль в производстве.

Штамм – «продуцент» - штамм микроорганизмов, биологический объект, предназначенный для осуществления биотехнологического производства, его природа и физиолого-биохимические свойства определяют все другие качественные характеристики процесса.

Продуценты могут быть получены различными способами. Если природный микроорганизм обладает каким-либо ферментом для осуществления биотехнологического процесса (например, гидролиза), то отбор ведут по наивысшей активности данного фермента, либо по повышенной его концентрации в клетке. Обычно это достигается отбором мутантных форм. Все культуры, используемые в промышленности, подвергают селекции. Отобранные мутантные штаммы хранятся при соответствующих условиях, стабилизирующих полезные свойства микроорганизмов

Большое внимание уделяется целенаправленному созданию новых, не существующих в природе биологических агентов. Например, создание новых биологических агентов – клеток микроорганизмов, живых растений методами генетической инженерии и биотехнологии.

Наиболее перспективные биологические агенты - **рекомбинанты**, то есть организмы, полученные методами генетической инженерии:

- Растительные и животные тканевые клетки.
- Анаэробные организмы.
- Ассоциации для превращения сложных субстратов.
- Термофильные микроорганизмы и ферменты.
- Имобильные биологические агенты.

Процесс искусственного создания биологических агентов (микроорганизма или тканевой клетки) состоит в его генетической информации с целью исключения нежелательных и усиления нужных свойств или придание ему совершенно новых качеств. Наиболее целенаправленное изменение можно получить путем рекомбинации – перераспределяя гены или части генов и объединяя в одном организме генетическую информацию от двух и более организмов. Получение рекомбинантных организмов можно осуществить методом слияния протопластов, путем переноса природных плазмид и методами генной инженерии.

**Плазмиды** – внехромосомные факторы наследственности, генетические элементы способны существовать в клетке в автономном, не связанным с хромосомным состоянием.

Многие плазмиды представляют кольцевые 2-цепочные молекулы ДНК с молекулярной массой  $10^6 - 10^8$ . Они широко распространены в живых клетках.

К нетрадиционным биологическим агентам относятся растительные и животные клетки (например - гибридомы, трансплантаты).

**Гибридома** – клеточный гибрид, получаемый путем слияния лимфоцита и опухолевой клетки. Она обладает способностью к синтезу моноклональных (однородных) антител желаемой специфичности и неограниченному росту в искусственной среде (свойство опухолевой клетки), что обеспечивает гибридной клетке своеобразное «бессмертие».

**Антитела** – глобулярные клетки, обладающие способностью специфически связываться с антигенами.

**Антигены** - вещества, которые воспринимаются организмом как чужеродные и вызывают специфический иммунный ответ.

Идентификация, выделение и синтез защитных антигенов – главная задача при разработке вакцин и сывороток. Культуры клеток млекопитающих являются продуктами интерферона, вирусных вакцин.

Промышленные продуценты также должны обладать устойчивостью к мутационным воздействиям, фагам, заражению посторонней микрофлорой, характеризоваться безвредностью для людей и окружающей среды, не иметь при выращивании побочных токсичных продуктов обмена и отходов, иметь высокие выходы продукта и приемлемые технико-экономические показатели (таблица 3).

В настоящее время многие промышленные микробные технологии базируются на использовании гетеротрофных организмов, а в будущем решающее место среди продуцентов займут автотрофные микроорганизмы, не нуждающиеся для роста в дефицитных органических средах, а также экстремофилы - организмы, развивающиеся в экстремальных условиях (термофильные, алкало- и ацидофильные).

Таблица 3 - Микроорганизмы (биологические агенты), применяемые в биотехнологии, и их продукты

Название	Тип	Продукт
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Пекарские дрожжи, вино, эль, саке
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Бактерии	Йогурт
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Бактерии	Швейцарский сыр
<i>Gluconobacterium suboxidans</i>	Бактерии	Уксус
<i>Penicillium roquefortii</i>	Плесень	Сыры типа рокфора
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Саке
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Этанол
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Бактерии	Ацетон

<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерии	Полисахариды
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Бактерии	L-Лизин
<i>Candida utilis</i>	Дрожжи	Микробный белок
<i>Propionibacterium</i>	Бактерии	Витамин В12
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Амилаза
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Дрожжи	Лактаза
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Дрожжи	Липаза
<i>Bacillus</i>	Бактерии	Протеазы
<i>Endothia parasitica</i>	Плесень	Сычужный фермент
<i>Leocanostoc mesenteroides</i>	Бактерии	Декстран
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерии	Ксантан
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Плесень	Пенициллины
<i>Chehalosporium acremonium</i>	Плесень	Цефалоспорины
<i>Rhizopus nigricans</i>	Плесень	Трансформация
Гибридомы	Гибридные клетки (раковые/ лимфоциты)	Иммуноглобулины и моноклональные антитела
Клеточные линии млекопитающих	Клеточные культуры	Интерферон
<i>E. coli</i> (рекомбинантные штаммы)	Бактерии	Инсулин, гормон роста, интерферон
<i>Blakeslea trispora</i>	Плесень	$\beta$ -Каротин
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Дрожжи	Астаксантин
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Бактерии	Биоинсектициды
<i>Bacillus popilliae</i>	Бактерии	Биоинсектициды

В природе существует огромное число микроорганизмов, которые способны синтезировать продукты или осуществлять реакции, которые могут быть полезны для биотехнологии. Однако практическое применение нашли не более 100 видов микроорганизмов (бактерии, грибы, дрожжи, вирусы, водоросли).

Дрожжи широко используют в хлебопечении, пивоварении, виноделии, получении соков, кормового белка, питательных сред для выращивания бактерий и культур животных клеток. Из 500 известных видов дрожжей используется только несколько видов – *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces uvarum*.

Среди бактерий чаще всего применяют в биотехнологии представителей следующих родов: *Acetobacter*, которые превращают этанол в уксусную кислоту и уксусную кислоту в углекислый газ и воду; *Bacillus* – для получения ферментов (*B. subtilis*), средств защиты растений (*B. thuringiensis*); *Clostridium* – для сбраживания сахаров в ацетон, этанол,

бутанол; псевдомонады – например, *P. Denitrificans* – для получения витамина В<sub>12</sub>, *Corynebacterium glutamatum* – для получения аминокислот и др.

Для получения разнообразных антибиотиков в биотехнологии применяют актиномицеты (род *Streptomyces*), грибы рода *Penicillium* и др.

Многие микроорганизмы – бактерии, дрожжи, вирусы – используются в качестве *реципиентов чужеродного генетического материала* с целью получения рекомбинантных штаммов–продуцентов биотехнологической продукции. Получены рекомбинантные штаммы *E. coli*, продуцирующие интерфероны, инсулин, гормон роста, антигены вируса СПИДа; штаммы *B. subtilis*, вырабатывающие интерферон; штаммы дрожжей, продуцирующие интерлейкин–2, антиген вируса гепатита В; рекомбинантные вирусы осповакцины, синтезирующие антигены гепатита В, вируса бешенства, клещевого энцефалита и др.

Для получения вакцин и диагностических препаратов используют также патогенные микроорганизмы (брюшного тифа, коклюша, дифтерии, столбняка и др.).

Широкое применение в биотехнологии нашли *культуры животных и растительных клеток*. Известно, что строение, физиология и биотехнология животных и растительных клеток более сложные, чем у бактериальных клеток. Из культур животных и растительных клеток можно извлечь более широкий ассортимент продуктов сложной, цепной реакции, но процесс культивирования *растительных и животных клеток* более трудоемкий и дорогостоящий. Из культур тканей растений можно получать разнообразные соединения, используемые в медицине (алкалоиды, противовоспалительные вещества, противолейкозные и противоопухолевые, противобактериальные, сердечные и почечные средства, ферменты, витамины, опиаты и др.), сельском хозяйстве, химической и других отраслях промышленности. *Животные клетки* используют как для получения продукции, так и для выращивания в клетках вирусов с целью получения из них вакцин и диагностических препаратов.

Таким образом, в современном биотехнологическом производстве используют весьма широкий ассортимент биообъектов, классификация которых весьма сложна и наиболее рационально может быть выполнена на основе *принципа их соразмерности* (рисунок 10).

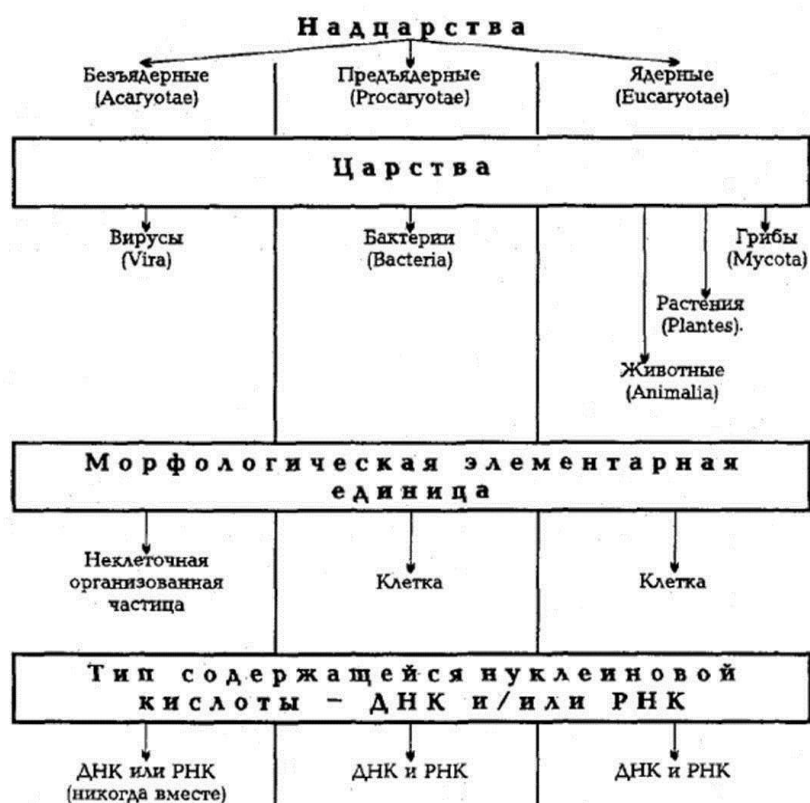


Рисунок 10 – Классификация биообъектов

В таблице 4 приведены биологические объекты, объединенные в 5 групп, причем, соразмерность в первых четырех имеет кратность в три порядка и только в пятой группе собраны биообъекты, отличающиеся по размерам от предшествующей (четвертой) группы всего на один порядок.

Таблица 4 - Биообъекты, используемые при биотехнологических способах производства лекарственных (диагностических, лечебных и профилактических) средств:

1	<b>Размер от 10 м до 1 см:</b> человек, животные, растения-бионакопители сапонинов, алкалоидов и т.п.
2	<b>Размер от 1 см до 1 мм:</b> гигантские водоросли, каллусные культуры меристемы, культуры тканей, культуры клеток.
3	<b>Размер от 1 мм до 1 мкм:</b> клетки эукариот и прокариот в культуре, биопродуценты и биотрансформаторы.
4	<b>Размер от 1 мкм до 1 нм:</b> бактериофаги, вирусы, липосомы.
5	<b>Размер менее 1 нм:</b> ДНК, ферменты, макромолекулы-носители.

Требования, предъявляемые к биообъектам для реализации биотехнологических процессов: чистота, высокая скорость размножения клеток и репродукции вирусных частиц, активность и стабильность биомолекул или биосистем.

В настоящее время многие промышленные микробные технологии базируются на использовании гетеротрофных организмов, а в будущем решающее место среди продуцентов займут автотрофные микроорганизмы, не нуждающиеся для роста в дефицитных органических средах, а также экстремофилы – организмы, развивающиеся в экстремальных условиях среды (термофильные, алкало- и ацидофильные).

Преимуществами использования термофильных микроорганизмов является то, что они менее подвержены вытеснению и обладают стойкой ферментативной системой; не требуют жесткой стерильности процесса ферментации; уменьшают затраты на охлаждение среды.

Биотехнологический процесс при увеличении температуры с использованием термофильных микроорганизмов обладает рядом преимуществ: увеличивается скорость, увеличивается продуктивность, уменьшается возможность микробного заражения реагирующей среды.

Применение экстремально термофильных культур открывает новые перспективы в получении биогаза. Экстремально термофильные микроорганизмы с высокой скоростью метаболизируют S, Fe, Mn и поэтому пригодны для микробного выщелачивания метаболитов и удаления S из угля. Негативные их стороны: ингибируются при низких концентрациях субстратов и продуктов, подвержены перерождению.

Привлекают внимание в связи с недостатком энергии анаэробные микроорганизмы. Анаэробное сбраживание отходов имеет ряд достоинств перед аэробным, достигается значительная минерализация органических веществ, меньше осаждающегося ила.

Особая группа биологических агентов в биотехнологии – ферменты, так называемые катализаторы биологического происхождения. Ферменты находят все большее применение в различных биотехнологических процессах и отраслях хозяйствования, но до 60-х годов это направление сдерживалось трудностями их получения, неустойчивостью, высокой стоимостью. Как отдельную отрасль в создании и использовании новых биологических агентов следует выделить иммобилизованные ферменты, представляющие собой гармонично функционирующую систему, действие которой определяется правильным выбором фермента, носителя и способа иммобилизации.

### **2.1.2 Смешанные микробные культуры и их природные ассоциации**

В последние годы расширяется применение смешанных микробных культур и их природных ассоциаций. В такого рода смешанных культурах между микроорганизмами устанавливаются определенные взаимоотношения, основанные на экологических принципах взаимодействия в смешанных популяциях.

Возможны различные типы такого взаимодействия:



- нейтрализм - практическое отсутствие взаимодействия между видами. Пример нейтрализма - рост штаммов *Streptococcus* и *Lactobacillus* (входящих в состав закваски при производстве йогурта). При скорости разведения 0,4 час<sup>-1</sup> оба вида микроорганизмов растут с одинаковой скоростью, такой же, как в чистых культурах;

- мутуализм - оба штамма быстрее растут в смешанной культуре, чем в соответствующих чистых культурах. Пример: совместное культивирование штамма *Lactobacillus*, нуждающегося в фенилаланине, и штамма *Streptococcus*, нуждающегося в фолиевой кислоте. На среде, не содержащей ни одного из этих компонентов, чистые культуры обоих штаммов практически не растут. Смешанная культура растет на этой среде хорошо. В данном случае мутуализм представляет собой взаимный обмен ростовыми факторами.

- Резко выраженный мутуализм, когда один микроорганизм совершенно не может существовать без другого называют симбиозом. Пример: в свое время была описана «бактерия» *Metanobacillus omelianskii*, которая при ближайшем рассмотрении оказалась смесью двух видов. Один из них окисляет этанол до ацетата с образованием водорода, но его рост подавляется продуцируемым им же водородом. Второй вид не способен расти на этаноле, но утилизирует водород, превращая его в метан.

- Если один вид продуцирует вещества, ускоряющие рост другого вида, говорят, что во взаимоотношениях между этими видами имеет место комменсализм.

- Противоположен комменсализму аменсализм, когда один вид продуцирует вещество, подавляющее рост второго вида.

В природных условиях микроорганизмы, как правило, находятся в ассоциативных взаимоотношениях, часть из которых несомненно может быть привнесена в производство в виде самостоятельных биотехнологических процессов. Сегодня такие процессы немногочисленны, так как природные ассоциации изучены крайне недостаточно с точки зрения биологической технологии. К тому же такие ассоциации складываются не только между микробами - **микробоценозы**, но и другими организмами — микробами и растениями, микробами и животными, между растениями, и т. д.; в таких случаях говорят о **биоценозах** (от греч. *bios* — жизнь, *coinos* - община). Если организмы выживают, но не размножаются в данных конкретных условиях, то под этим подразумевают их нахождение в состоянии **анабиоза** (от греч. *ana* — назад, обратное действие, подобно, соответственно). Если же организмы растут, развиваются и размножаются в среде обитания, то под этим понимают их нахождение в состоянии **метабиоза** (от греч. *meta* — между, посредине, изменение, следование в пространстве и времени). Наконец, гибель организма(-ов) в ассоциации или вне ее можно охарактеризовать понятием **абиоз** (от греч. *ap* — нет, *bios*- жизнь). В биотехнологии приходится постоянно встречаться с такими явлениями как метабиоз, абиоз и анабиоз. Имеются и такие ассоциации организмов, когда

один (или более) из ассоциантов может расцениваться **хищником**. Например, гриб *Arthrobotrys oligospora* формирует сеть из мицелиальных петель — ловушек нематод, в частности, относящихся к числу вредителей растений (лука, клевера и др.). Такой нематодой является *Ditylenchus dipsaci* — стеблевая нематода. В сельском хозяйстве заметен вред от картофельной нематоды — *Heterodera rostochiensis*. Поэтому грибы-хищники оказываются союзниками человека в борьбе за урожаи ряда ценных культур растений, повреждающихся нематодами.

Растением-хищником является росянка (насекомоядное растение). У нее на листьях имеются железистые волоски, выделяющие ферментативно активную липкую жидкость, с помощью которой схваченные насекомые прочнее адгезируются и перевариваются.

Среди микробов хищником является миксомицет *Dictyostelium discoideum*, а его жертвой — кишечная палочка.

При хищничестве, присутствии только эукариотическим организмам, жизнь партнера-жертвы ограничена во времени, то есть здесь ассоциация организмов кратковременная.

Таким образом, анабиоз, метабиоз, абиоз и хищничество относятся к разряду понятий об **уровнях жизнедеятельности организмов**. При метабиозе всегда предполагается наличие организмов - партнеров, вступающих или вступивших во взаимоотношения. Каковы же эти взаимоотношения? — Фактически их два — **симбиоз** и **антибиоз** (таблица 5).

Таблица 5 - Виды взаимоотношений при метабиозе между организмами в природных условиях

Взаимоотношения		
Вид	Подвид	Краткая характеристика
Симбиоз	Комменсализм (от лат. commensalis - сотрапезник)	Один вид из ассоциантов живет за счет другого, не причиняя ему вреда
	Мутуализм (от лат. mutualismus - взаимосвязь, сожительство)	Оба ассоцианта помогают друг другу
	Нейтрализм (!?)	Ассоцианты не влияют друг на друга
	Паразитизм	Один из ассоциантов живет за счет другого, нанося ему вред
Антибиоз	Собственно антибиоз и антагонизм	Один вид ингибирует развитие другого (других) или убивает его (их) своими метаболитами
	1) односторонний (моно- и полинаправленный)	
	а) спонтанный (от лат. spontaneus - самопроизвольный, без постороннего вмешательства)	В природных условиях
	б) направленный (насильственный)	В искусственных условиях
	2) двусторонний	Оба ассоцианта ингибируют или убивают друг друга за счет своих метаболитов

	Аутоантибиоз	Один вид или ассоциация видов образует метаболиты, которые ингибируют или убивают их процент (ы)
--	--------------	--

## 2.2. Биотехнология производства метаболитов

### Классификация продуктов биотехнологических производств

#### I. В зависимости от количества.

1. Продукты тонкого биологического синтеза – от 100 кг до 1000 т в год – вакцины, витамины, антибиотики для медицины. Основная стоимость связана с очисткой и анализом.

2. Продукты маломасштабного биосинтеза – до 20 тыс. тонн в год – аминокислоты для пищевой промышленности, напитки, продукты получаемые ферментацией, антибиотики для сельского хозяйства.

3. Крупномасштабный биологический синтез – сточные воды после биологической очистки, биополимеры для отдельных отраслей промышленности – полисахариды для извлечения остатков нефти, выщелачивания металлов из руд. Основное условие - дешевизна. Более 20 тыс. тонн в год.

#### II. По товарным формам.

1. Биопрепараты – основной компонент – жизнеспособные клетки м/о или др. организмы закваски, бактериальные удобрения.

2. Инактивированная биомасса м/о – белок одноклеточных организмов.

3. Биопрепараты на основе очищенных метаболитов – ферменты, витамины, гормоны, антибиотики.

III. Образование биотехнологических продуктов в зависимости от стадии роста биологических объектов.

1. Первичные метаболиты.

2. Вторичные метаболиты.

**Метаболиты** (от греч. μεταβολίτης, *metabolites*) —продукты метаболизма каких-либо соединений.

Метаболиты бывают первичными, вторичными, промежуточными (подвергающимися дальнейшим биотрансформациям) и конечными, не подвергающимися дальнейшей биотрансформации и экскретируемыми из организма с мочой, калом, потом, выдыхаемым воздухом и др.

**Первичными метаболитами** называют молекулы, присутствующие во всех клетках организма и необходимые для жизнедеятельности. Это структурные единицы биополимеров – нуклеотиды, моносахариды, витамины, органические кислоты и др. соединения

Они делятся на четыре категории:

- Углеводы
- Белки

➤ **Липиды**

➤ **Нуклеиновые кислоты**

*Пример:* глюкоза — первичный метаболит, основной и наиболее универсальный источник энергии в организме человека и животных

**Вторичные метаболиты** — молекулы, встречающиеся не во всех клетках и не у всех видов живых организмов. (низкомолекулярные соединения, не требующиеся для выживания клеток и образующиеся по завершении фазы роста. Это антибиотики, пигменты, токсины)

**Вторичные метаболиты** — органические вещества, синтезируемые организмом, но не участвующие в росте, развитии или репродукции.

Биотехнология наиболее развита в Японии (аминокислоты), США (1-я крупная биотехнологическая компания). В XXI в. около 20% продуктов станут продукцией биотехнологии.

### **2.2.1 Биотехнология получения первичных метаболитов. Получение аминокислот.**

Объем мирового производства аминокислот составляет более 500 тыс.т/год: глутамат натрия – 300 тыс.т., метионин – 140 тыс.т., лизин – 100 тыс.т.

Потребность человечества (по данным ВОЗ): метионин – 4 млн.т., лизин – 5 млн.т., треонин – 3,7 млн.т., триптофан – 2 млн.т (таблица 6).

Аминокислоты вовлечены в биосинтез ферментов, ряда гормонов, витаминов, антибиотиков, алкалоидов, токсинов и других азотсодержащих соединений (пурины, пиримидины и др.)

Пищевая ценность белка определяется сравнением доли незаменимых аминокислот в пище с этим же показателем при адекватном питании. Белки яйца и молока обладают высокой пищевой ценностью и используются в качестве эталона при оценке других белков.

Аминокислоты используют в качестве пищевых добавок, приправ, усилителей вкуса, как сырье в химической, парфюмерной и фармацевтической промышленности и при производстве других веществ:

глицин – подсластитель, антиоксидант, бактериостатик;

аспарагиновая кислоты – усилитель вкуса, сырье для синтеза аспартама;

глутаминовая кислота – усилитель вкуса, препарат для лечения психических заболеваний;

гистидин – противовоспалительное средство;

метионин – пищевая и кормовая добавка;

цистеин – фармацевтический препарат;

треонин и триптофан - пищевые и кормовые добавки;

фенилаланин – сырье для получения аспартама;

лизин – пищевая и кормовая добавка, сырье для получения искусственных волокон и пленок.

Таблица 6 - Потребность в аминокислотах (мг/кг массы тела в сутки)

Аминокислота	Потребность (мг/кг массы тела в сутки)	
	младенцы	взрослые
Валин	92	14
Гистидин	33	10
Изолейцин	83	12
Лейцин	135	16
Лизин	99	12
Метионин (и цистеин)	49	10
Фенилаланин (и тирозин)	141	16
Треонин	68	8
Триптофан	21	3

*В промышленных масштабах белковые аминокислоты получают:*

- гидролизом природного белоксодержащего сырья;
- химическим синтезом;
- микробиологическим синтезом;
- химико-микробиологическим методом.

*Гидролиз природного белоксодержащего сырья*

Сырье: отходы пищевой и молочной промышленности.

Условия процесса: нагревание с растворами кислот или щелочей (20%) при  $t=100-105^{\circ}\text{C}$  в течение 20-48 часов. Вакуум или атмосфера инертного газа.

Каталитические системы: иммобилизованные протеолитические ферменты и ионообменные смолы.

Преимущества: рациональное использование сырья, обеспечивающее создание безотходных технологий.

Использование гидролизных аминокислот: фармацевтическая, пищевая, микробиологическая промышленность, медицина и животноводство.

*Химический синтез*

Недостаток: получение целевых препаратов в виде рацемической смеси D- и L-стереоизомерных форм.

Проницаемость L-аминокислот в клетке в 500 раз выше таковой у ее антипода. Стереоспецифичны также транспорт и метаболизм аминокислот. Исключение – метионин, метаболизм которого нестереоизбирателен, благодаря чему данная аминокислота получается преимущественно путем химического синтеза.

Разделение рацематов других аминокислот – дорогая и чрезвычайно трудоемкая процедура.

*Микробиологический синтез*

Более 60% всех производимых в настоящее время промышленностью высокоочищенных препаратов белковых аминокислот получают путем

микробиологического синтеза (рисунок 11). Главное преимущество его состоит в возможности получать L-аминокислоты на основе возобновляемого сырья.

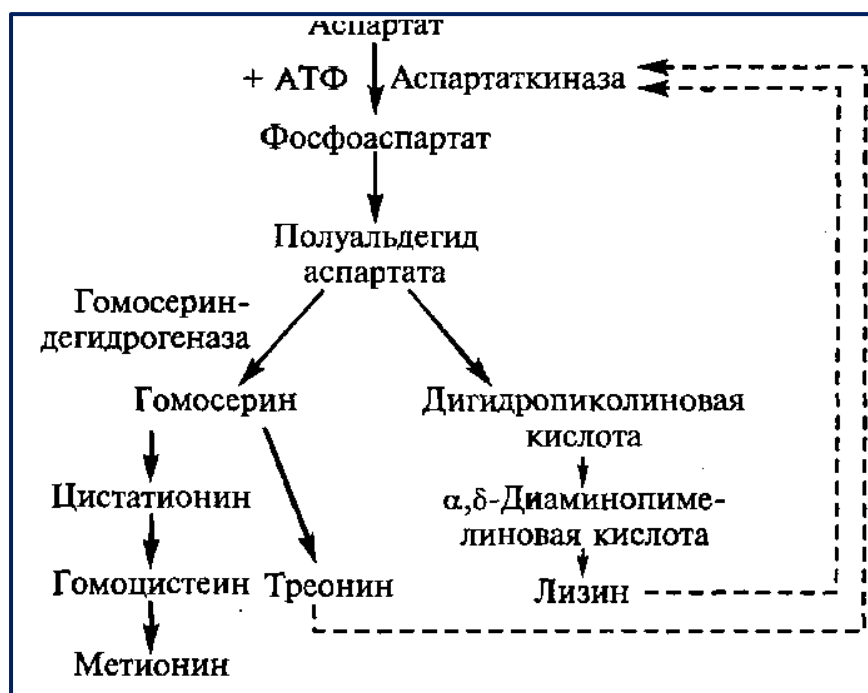


Рисунок 11 – Схема биосинтеза лизина, метионина и треонина в клетке *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* - ингибирование по принципу обратной связи

Микроорганизмы – продуценты аминокислот относятся к родам (таблица 7):

- *Arthrobacter*,
- *Brevibacterium*,
- *Corynebacterium*,
- *Micrococcus*.

Таблица 7 - Микроорганизмы, продуцирующие аминокислоты

Аминокислота	Микроорганизмы
Аргинин	<i>E.coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Brevibacterium flavum</i> , <i>Serratia marcescens</i>
Гистидин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>S. marcescens</i> , виды <i>Streptomyces</i>
Изолейцин	<i>B. flavum</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>S. marcescens</i>
Лейцин	<i>Brevibacterium lactofermentum</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>S. marcescens</i>
Лизин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i>
Фенилаланин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i>
Пролин	<i>B. flavum</i>
Серин	<i>C. glutamicum</i>
Треонин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>Arthrobacter parafinens</i> , <i>E. coli</i> ,

	<i>S.marcescens</i>
Триптофан	<i>Micrococcus sp., Candida utilis, B.subtilis</i>
Тирозин	<i>B. flavum, C.glutamicum</i>
Валин	<i>B. flavum, C.glutamicum</i>

### Производство витаминов

Витамины – группа незаменимых органических соединений различной химической природы, необходимых любому организму в ничтожных концентрациях и выполняющих в нем каталитические и регуляторные функции (таблица 8).

Таблица 8 - Классификация витаминов

Витамины		Витаминоподобные соединения
Жирорастворимые	Водорастворимые	
А, D, Е, К	С, Р, В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , В <sub>3</sub> , В <sub>5</sub> , В <sub>6</sub> , В <sub>12</sub>	Карнитин, липоевая кислота, рибоксин и др.

Получение витамина В<sub>2</sub> (рибофлавин)

1 т моркови – 1 г рибофлавина;

1 т печени – 6 г рибофлавина.

Продуцент рибофлавина – гриб *Eremothecium ashbyii*, при выращивании на 1 т питательной смеси способен синтезировать 25 кг витамина В<sub>2</sub>

<i>Смеситель, жидкая питательная среда</i> <i>Посевной аппарат, посевной материал культуры, стерилизация</i>	Продолжительность процесса – 3 суток	<i>Ферментер</i> Температура – 26-30°C
<i>Концентрирование в вакууме, наполнитель</i>	Концентрация рибофлавина культуральной жидкости – до 1,4 мг/мл	<i>Осушка до влажности 5-10%</i>
<i>Рибофлавин →</i>	<i>Витамин В<sub>12</sub></i>	

- регулирует углеводный и липидный обмен;
- участвует в метаболизме незаменимых аминокислот (Ак), пуриновых и пиримидиновых оснований;
- стимулирует образование предшественников гемоглобина в костном мозге;
- применяется в медицине для лечения злокачественной анемии, лучевой болезни, заболеваний печени и полиневрита

## 2.2.2. Растения как источник биологически активных веществ (БАВ)

Растения являются продуцентами многих БАВ – соединений, способных оказывать влияние на биологические процессы в организме, к таким соединениям принадлежат сердечные гликозиды, сапонины, стерины, каротиноиды, полифенолы, алкалоиды, витамины, хиноны, а также вещества, обладающие специфическим ароматом, вкусом и окраской (рисунок 12).



Рисунок 12 – Растения, продуценты БАВ

Биологически активные вещества принадлежат к продуктам вторичного обмена, которые называют вторичными метаболитами или вторичными продуктами биосинтеза. В настоящее время известно более 100000 вторичных метаболитов, продуцируемых растениями (таблица 9). Многие из них являются практически, экономически важными продуктами и используются в фармакологической, косметической, пищевой промышленности (таблица 10).

Таблица 9 - Вторичные метаболиты, продуцируемые растениями

Растительный продукт	Вид растения
Кодеин (алкалоид)	<i>Papaver somniferum</i>
Диосгенин (стероид)	<i>Dioscorea deltoidea</i>
Хинин (алкалоид)	<i>Cinchona ledgeriana</i>
Дигоксин (сердечный гликозид)	<i>Digitalis lanata</i>
Скополамин (алкалоид)	<i>Datura stramonium</i>
Винкрестин (алкалоид)	<i>Catharanthus roseus</i>

**Клеточная инженерия растений** рассматривает различные способы получения клеточных культур, культивирования растительных и животных клеток, выделение изолированных протопластов, биологическое конструирование, а также создание экспериментальных ассоциативных систем между культивируемыми клетками высших растений и микроорганизмами.



Таблица 10 - Десять наиболее употребляемых лекарственных веществ, получаемых из растений

Лекарственное вещество	Активность	Растение-источник
Стероиды из диосгенина	Противозачаточные средства	<i>Dioscorea deltoidea</i>
Кодеин	Болеутоляющее	<i>Papaver somniferum</i>
Атропин	Антихолинэргическое	<i>Atropa belladonna L.</i>
Резерпин	Снижающее давление	<i>Rauwolfia serpentina L.</i>
Гиосциамин	Антихолинэргическое	<i>Hyoscyamus niger L.</i>
Дигоксин	Тонизирующее сердечную деятельность	<i>Digitalis lanata L.</i>
Скополамин	Антихолинэргическое	<i>Datura metel L.</i>
Дигитоксин	Сердечно-сосудистые	<i>Digitalis purpurea L.</i>
Пилокарпин	Холинэргическое	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Хинидин	Антималарийное	<i>Cinchona ledgeriana</i>

Клеточные технологии, основанные на культивировании *in vitro* органов, тканей, клеток и изолированных протопластов высших растений, могут облегчить и ускорить традиционный селекционный процесс. Это, прежде всего, следующие технологии: культура семяпочек и зародышей, регенерация растений из тканей летальных гибридов, экспериментальная гаплоидия, криосохранение генофонда, клональное микроразмножение. Клеточная инженерия предлагает новые пути для создания высокопродуктивных форм растений. Это гибридизация соматических клеток, перенос чужеродных генов.

Примеры лекарственных веществ, полученные на основе каллусных культур

Стевиозид - естественный подсластитель и заменитель сахара, успешно используется вместо искусственных подслащивающих веществ. Исходное растение - *Stevia rebaudiana Bertoni*.

Арглабин – противоопухолевое соединение. Исходное растение - *Artemisia glabella Kar. et Kir*. Входит в состав одноименного препарата.

Лаптаконитин - дитерпеновый алкалоид, аритмическое средство. Исходное растение - *Aconitum septentrionale Koelle*. Входит в состав препарата Аллапинин (рисунок 13).

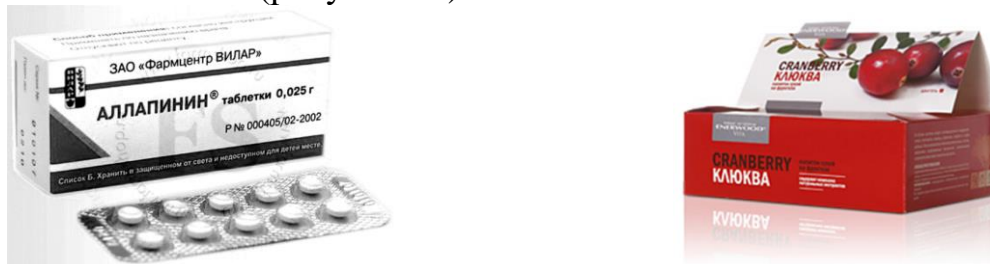


Рисунок 13 – Примеры лекарственных веществ

**Генная инженерия** растений разработана не так хорошо, как в случае с животными и тем более, микробными клетками. Однако в настоящее время она привлекает все большее внимание, так как открывает новые перспективы в растениеводстве. Обычная селекция – процесс медленный и, кроме того, она ограничена природными видовыми барьерами. Введение новых генов с помощью техники рекомбинантных ДНК могло бы ускорить этот процесс и существенно расширить его возможности. Кроме того растения обладают существенной особенностью – целое растение может быть выращено из отдельной клетки. Это не относится ко всем растениям. Например, клетки злаковых или бобовых очень редко претерпевают такую редифференциацию, тогда как клетки табака, томата или моркови, как показала практика, подвергаются редифференциации сравнительно легко.

При растворении целлюлозной стенки растительной клетки ферментами-целлюлозами, образуются протопласты, в которые легко проникают макромолекулы, в том числе и ДНК. Две различные клетки в виде протопластов соединяются с образованием гибридного протопласта – соматической гибридной клетки. протопласты способны восстанавливать клеточную стенку и далее давать целое растение. Растение может быть получено из протопластов, включивших чужеродную ДНК или из гибридных протопластов.

При наличии методов введения в растительные клетки определенных генов, способных к функционированию и стабильному наследованию, открываются реальные возможности создания растений с заранее полезными свойствами. Векторы для введения генов в растительные клетки могут быть основаны на репликациях растительных вирусов. Однако до настоящего времени попытки получить такие векторы, удовлетворяющие, в частности, требованию стабильного наследования, были не очень успешны.

Создан трансгенный рапс, содержащий гены отдельных нейропептидов человека, например, лей-энкефалина, связанного с геном альбумина семян рапса. С одного гектара земли, засеянного таким рапсом, можно получать до 3 кг нейропептида.

Создан новый сорт помидоров, длительно сохраняющийся без размягчения вследствие подавления активности фермента полигалактуронидазы.

Сконструированы такие генно-инженерные сорта сои, которые проявляют устойчивость к насекомым, гербицидам, вирусам и образуют больше запасных белков, обогащенных метионином.

На основе методов геномной инженерии получены межвидовые гибриды капусты, картофеля и табака с турнепсом, картофеля с помидором – «Помат», помидора дикого вида, устойчивого к некоторым вирусам, и культурного сорта.

Первое в мире генно-инженерное химерное растение «санбин» получено в США в результате переноса гена запасного белка бобов фазеолина в геном подсолнечника. В 1984-87 гг. получены трансгенные

растения: табак, томаты, сельдерей, люцерна, хлопчатник. Внедрение в геном пшеницы генов, детерминирующих животные белки (миозин), может приблизить хлеб по качеству к продуктам животного происхождения.

Введение в растение гена, кодирующего белок тауматин (в 600 раз слаще глюкозы), может улучшить вкусовые качества многих фруктов, не увеличивая содержание углеводов.

В США выращиваются трансгенные растения рапса, сои, хлопчатника, устойчивые к гербицидам, созданы трансгенные томаты, содержащие гены вируса табачной мозаики, благодаря чему они устойчивы к другим вирусам.

Генно-инженерными методами в геном растения вводятся гены, кодирующие белки, токсичные для многих насекомых. Так получают сорта растений, устойчивые к вредителям. Генетическая инженерия решает проблему искусственной пищи. Уже сейчас в микроорганизмы вводятся гены, управляющие синтезом незаменимых аминокислот, ставится задача создания штаммов дрожжей, бактерий, вырабатывающих пищевые белки, причем культивировать их предполагается на отходах сахарной промышленности.

Трансгенным (или генетически модифицированным) называется растение, в геном которого методами генетической инженерии перенесены гены (их называют «трансгенами») из других организмов. Процесс переноса называется генетической трансформацией. Основными преимуществами такой технологии по сравнению с традиционной селекцией являются: возможность переноса всего одного гена, что практически не затрагивает исходный генотип; возможность придания признаков, которые нельзя перенести путем скрещивания с близкородственными видами; значительное ускорение процесса ускорения новых генотипов.

Наиболее широко используемый метод трансформации - **агробактериальный** был разработан на основе природного процесса. Почвенная бактерия *Agrobacterium tumefaciens* способна инфицировать двудольные растения, вызывая опухоли – корончатые галлы. Как выяснилось, при этом происходит перенос и встраивание в растительный геном двух групп генов: продукты одних вмешиваются в нормальный метаболизм растения и способствуют разрастанию опухоли, а продукты других синтезируют опины, вещества, ненужные растению, но используемые в пищу бактериями. Ученые модифицировали агробактерии таким образом, что они вместо собственных переносят в растения гены, нужные человеку.

Впоследствии был разработан ряд других методов трансформации растительных клеток, из которых наибольшее распространение приобрел **биобаллистический**. Он используется чаще всего для генетической модификации однодольных растений, нечувствительных к агробактериям. В специальных установках микрочастицы золота или вольфрама с нанесенной на них ДНК ускоряют при помощи сжатого геля, и они проникают в ДНК клеток мишени.

Признаки, которые возможно придать с помощью генной инженерии, весьма разнообразны и в основном ограничены только наличием соответствующих генов. Очень условно их можно разделить на три группы.

К первой относятся признаки, интересные производителям: устойчивость к различным факторам окружающей среды – гербицидам, болезням, вредителям, засухе, засолению, улучшение минерального питания, повышение укореняемости.

Вторая группа признаков представляет интерес непосредственно для потребителей – модификация вкуса и аромата плодов, увеличение продолжительности их хранения, изменение окраски цветков, бессемянность, улучшение питательной ценности растений.

В третью группу входят растения-«биофабрики», способные синтезировать вакцины, ферменты, биополимеры и другие полезные вещества.

**Каллусная культура** – это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дифференцированных клеток. Каллус (означает мозоль) может образовываться как на изолированных кусочках ткани эксплантах, так и на целом растении при поражении. Каллусная ткань аморфна и не имеет анатомической структуры и может быть разной консистенции:

1. рыхлой, состоящей из сильно оподенных клеток, легко распадающихся на отдельные рыхлые агрегаты;
2. средней плотности с хорошо выраженными отдельными меристематическими очагами;
3. плотной, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.

Обязательным условием дедифференцировки ткани и превращения ее в каллус является присутствие в питательной среде фитогормонов: ауксинов и цитокининов. Ауксины способствуют дифференцировке, а цитокинины вызывают пролиферацию.

Опухолевые клетки, в отличие от каллусных, могут расти на питательных средах, лишенных фитогормонов (ауксина, гетероауксина и др.). Они не могут образовывать нормально организованные вегетативные органы. И в некоторых случаях из них могут возникать уродливые органоподобные структуры, поэтому для размножения их применять нельзя.

ДНК бактерий существуют не только в виде хромосом, но и в виде маленьких кольцевых молекул (плазмид). Бактерии *Agrobacterium tumefaciens* помимо прочих содержат плазмиды, вызывающие опухоли (**Ti-плазмиды**). На такой плазмиде среди прочих генов имеется область T-ДНК, содержащая гены, отвечающие за образование опухоли на растениях и синтез опинов. Именно этот кусочек плазмиды агробактерии встраивают в ДНК растений. Выяснилось, что агробактерии в принципе способны переносить в растения любую ДНК, которая расположена в этом месте плазмиды. Поэтому в плаزمидях, используемых в генно-инженерных целях, природные гены заменяют любыми другими, представляющими интерес для человека. Как

правило, это два-три гена: **целевой**, который придает, например, устойчивость к насекомым; **селективный**, который придает устойчивость к определенным веществам (чаще всего – антибиотикам), что позволяет трансформированной клетке расти в питательной среде с антибиотиками, в то время как нетрансформированные клетки в ней гибнут; и иногда **репортерный** ген, который позволяет качественно определить трансформированную клетку, например, по окрашиванию или свечению в ультрафиолетовом свете.

Регенерация растения из каллуса основана на тотипотентности. Это явление было открыто в лаборатории Габерланда. **Тотипотентность** – это свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития с образованием целого организма. Сущность его состоит в том, что если растительная клетка изолируется, она ведет себя подобно клетке зародышевого мешка, то есть образует эмбрионид и целое растение.

Тотипотентность культивируемых клеток свидетельствует том, что генетическая информация сохраняется. Но для ее реализации требуются специфические условия. К числу факторов, способных полностью или хотя бы частично восстановить замаскированную генетическую информацию, относятся свет, регуляторы роста, предшественники и элементы питания. Стимулирующее действие света на образование вторичных соединений было показано на примере каротиноидов, эфирных масел. Кроме этого важны температура, влажность, освещенность и периодическое обновление питательной среды, так как по мере роста клеток в ней накапливаются продукты метаболизма, что неблагоприятно действует на культуру. Поэтому данная методика связана с пересадками, т.е. с переносом части биомассы на новую среду в другом сосуде («пассажи»). При культивировании растительные клетки имеют более низкие темпы размножения, чем микробиологические объекты, поэтому продолжительность культивирования определяется не десятками часов, а десятками суток.

Метод выращивания клеток *in vitro* состоит в том, что растительная, выделенная из любого органа растения ткань (**эксплант**), помещается на питательную среду, компоненты которой подбираются так, что они поддерживают нормальную жизнедеятельность клетки и стимулируют деление. Поэтому культивировать эти клетки можно только на сложных питательных средах, содержащих соли азота, К, Mg, P и ряд микроэлементов, из органических веществ – углеводы, аминокислоты, витамины, фитогормоны (кинетин, индолилуксусная кислота).

Каллусные клетки имеют различную форму. При каллусогенезе в мембранах возрастает содержание насыщенных жирных кислот, и исчезают ненасыщенные, имеет место процесс дифференцировки, т.е. переход клеток на уровень изолированной клетки.

Каллус можно получить из ряда растительных тканей. Молодые клетки более пригодны для этой цели, чем зрелые, это особенно заметно на листьях. Кусочки стебля древесных пород – плохой материал для каллуса.

Любой вид растения дает каллус при соблюдении определенных методических приемов культивирования.

В клетках экспланта, состоящего из неделящихся специализированных клеток, в самом начале культивирования могут наблюдаться изменения в метаболизме, связанные с травматическими синтезами, с дедифференцировкой и подготовкой к процессу деления. Можно предположить, что травма приводит к высвобождению из клеток биологически активных веществ – индукторов клеточного деления, отличающихся по своей природе от известных стимуляторов роста (**ауксинов, гиббереллинов**).

**Клональное микроразмножение** – это использование техники *in vitro* для быстрого размножения растений, идентичным исходному, неполовым путем. Термин «клон» (от греческого – отпрыск) был предложен Вэбером в 1903 г. при изучении вегетативного размножения растений.

**Клон** – это совокупность клеток или особей, произошедших от общего предка путем бесполого размножения – основная единица учета в генетике микроорганизмов. В основе образования клонов лежит митоз, поэтому считается, что клон состоит из генетически однородных клеток. Однако это весьма относительно из-за спонтанных мутаций. Только клонированием удастся сохранить особенности сорта. Клональное микроразмножение получения клонов растений путем выращивания их из одной клетки на основе тотипотентности клеточной культуры. Клональное размножение обладает рядом преимуществ и является чрезвычайно перспективным:

1. Коэффициент клонального размножения гораздо выше, чем при обычных методах размножения. Так, из одного растения герберы в год можно получить 50-100 растений обычным способом, при клональном размножении из культуры ткани до 1 млн.

2. Можно размножать растения круглый год.

3. Тысячи растений могут расти на относительно небольшой лабораторной площади.

4. Одновременно с размножением происходит и оздоровление растений (от вирусов и патогенных микроорганизмов).

5. Методом клонального размножения получают посадочный материал растений, которые медленно размножаются половым путем или совсем не размножаются вегетативно.

6. При клональном размножении, в отличие от полового размножения, получают генетически однородное потомство. Различают 2 вида клонального размножения:

1) маломасштабное (при селекционных работах);

2) массоклональное, коммерческое размножение;

а) освобождение от вирусов (картофель);

б) получение посадочного материала (цветы, сельскохозяйственные культуры).

При использовании в качестве эксплантов дифференцированных тканей растений возможно появление мутантных форм. Все манипуляции при клональном микроразмножении растений осуществляются в асептических условиях, то есть с соблюдением техники микробиологических работ. Работа проводится или в микробиологических боксах, облучаемых УФ-светом, или в ламинар-боксах, где асептика достигается подачей стерильного воздуха.

Весь процесс клонального микроразмножения имеет продолжительность около трех месяцев и его можно разделить на 4 этапа (рисунок 14).

На первом этапе осуществляют выбор растения-донора, изоляцию и стерилизацию экспланта и создание условий для образования каллуса на твердой питательной среде.

Второй этап связан с увеличением числа инициалей на каллусе и формированием побега.

Третий этап – укоренение размножаемых пробирочных растений и адаптация их к условиям *in vitro*.

Четвертый этап – выращивание извлеченных из пробирок растений в теплице и закалка перед высаживанием в поле. Одной из важных проблем размножения с помощью каллуса является сокращение периода каллусного роста.

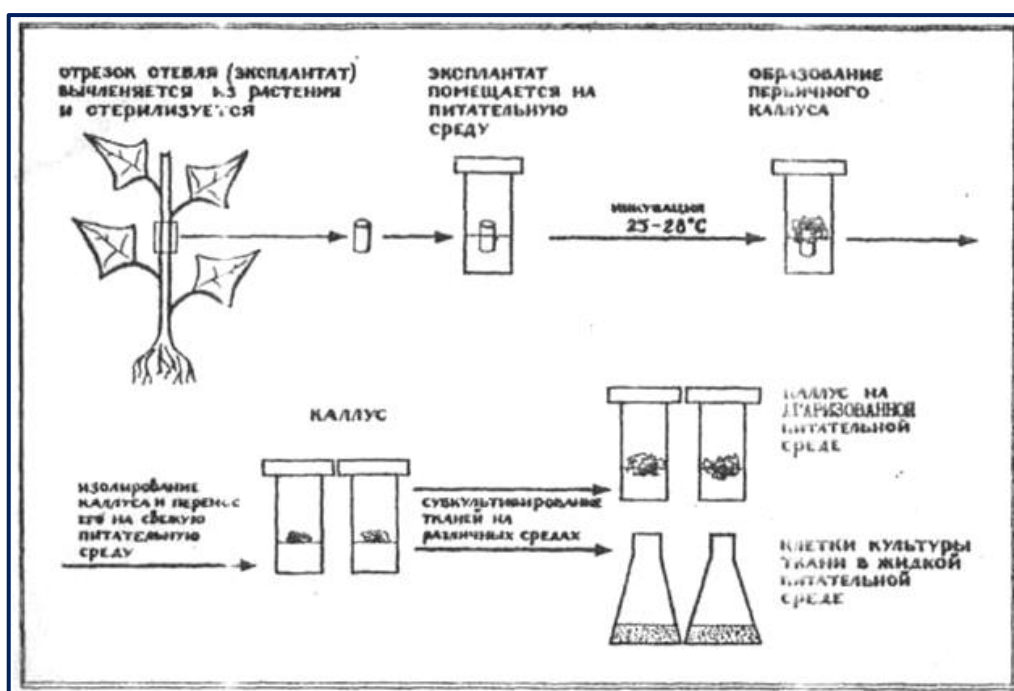


Рисунок 14 - Схема получения культуры каллусных тканей

Получение растений через органогенез можно осуществить 3 способами:

1. Путем формирования придаточных органов на каллусе, полученном из экспланта.

2. Путем формирования придаточных органов прямо из экспланта без промежуточной фазы каллусообразования.

3. Путем формирования растений-регенерантов из побегов, образовавшихся из набухших почек.

Основные недостатки клонального микроразмножения растений:

1. Большая трудоемкость и высокие затраты. Необходима автоматизация и принципиально новые приемы. Среди них можно назвать отказ от укоренения растения *in vitro* и привлечение гидро- и аэропоники. В дальнейшем прогресс будет связан с автоматизацией и роботизацией трудоемких процедур.

2. Все особи данного вида происходят из единственной меристемы и обладают уменьшением генетического разнообразия. Поэтому новые болезни могут оказаться для них катастрофическими за счет одинаковой восприимчивости к патогенным микроорганизмам.

Поэтому наряду с развитием техники вегетативного размножения на основе культуры меристематических клеток необходимо иметь и коллекции семян для сохранения генотипов, необходимых для поддержания генетического разнообразия.

### **Культивирование протопластов**

Методы культивирования протопластов соответствуют тем, которые применяются для выращивания клеток. Протопласты высевают как на жидкие, так и на агаризованные среды того же состава с различными концентрациями агара.

Основное требование к применяемым средствам состоит в том, чтобы в процессе культивирования не происходило разрушения протопластов и среда была оптимальна для образования клеточных колоний. До тех пор, пока протопласты не образовали клеточную стенку, они представляют собой очень нежные структуры и работа с ними должна проводиться в мягких условиях.

Условия, в которых культивируются протопласты, в основном соответствуют тем, которые применяются для выращивания в культуре клеток растений. Состав минеральных солей может несколько изменяться. Как правило, среда должна состоять из соматического стабилизатора, неорганических соединений, источников углерода, витаминов, источников органического азота и фитогормонов.

Манит, сорбит и их комбинация могут быть использованы в качестве осмотических стабилизаторов. За основу берется состав минеральных солей в средах для культивирования клеток растений. Можно менять соотношения аммонийного и нитратного азота в зависимости от потребности в них клеток, увеличивать концентрацию  $\text{CaCl}_2$  для стабилизации образующейся клеточной стенки. После того как образовались и начали делиться клетки, они могут



быть помещены в условия культивирования, применяемые обычно для клеток растений.

В первые сутки культивирования некоторое число протопластов погибает, что может быть связано с гетерогенностью популяции по отношению к действию осмолитиков. Оставшиеся протопласты уже через несколько часов начинают синтезировать клеточную стенку. Полностью этот процесс завершается при правильно подобранных условиях выделения и культивирования на 1-4 сутки. При этом протопласты теряют сферическую форму, клетки удлиняются. Скорость регенерации клеточной стенки зависит от вида растения и ткани, из которой получены протопласты, а также от степени ее дифференцировки. При неблагоприятных условиях выделения и культивирования протопластов клеточные стенки образуются не по всей поверхности. В местах разрывов часть протоплазмы выходит, оставаясь окруженной плазмалеммой. В ней могут находиться вакуоли. Это так называемые почки. «Почкование» происходит при повышенной концентрации осмотически активного вещества в присутствии неподходящего для данной культуры сахара, при низком содержании  $\text{CaCl}_2$  и др.

При правильно подобранных условиях выделения и культивирования к третьим-четвертым суткам с момента высева наблюдаются первые деления протопластов. В большинстве случаев затем образуются многоклеточные агрегаты, развивающиеся в дальнейшем в каллус, который способен регенерировать целое растение. Растения-регенераты из протопластов получены в настоящее время для люцерны, табака, моркови, томата и целого ряда других сельскохозяйственно важных растений.

#### Перспективы получения лекарственных средств на основе клеток растений

Преимущества получения ряда фармакологических веществ из растений заключается в следующем:

- независимость от климатических, сезонных и географических условий;
- стабильность выпуска продукции в течение года;
- уменьшение площади почвы, вовлеченной в хозяйственный оборот.

На основе культуры клеток можно:

- получать известные вещества, присущие определенному растению, такие как никотин, кодеин, хинин, сапонины и др.;
- обеспечить синтез новых продуктов из трудно выращиваемых растений, например адаптоген из корня женьшеня;
- получать новые вещества;
- использовать системы клеток для биотрансформации конечного продукта.

В настоящее время существует промышленное получение ряда ценных веществ из растительной биомассы методом *in vitro*. Хорошо налажен в

Японии выпуск таких лекарственных препаратов: шикоин (из воробейника аптечного), убихинон (из табака, дигоксин (из наперстянки шерстистой), диосгенин (диоскорей дельтовидная).

промышленное производство лекарственных веществ на основе культур клетки гарантирует достаточный выход продукта. Это можно подтвердить путем сравнения процента выхода активного начала из биомассы цельного сырья взятого в эквивалентном количестве. Например, получение антрахинонов из кассии:

- биомасса – 0,334%; цельное растение 0,209% сухой массы;
- диосгенин – клубень, 26 мг на 1 г сухой массы, биомасса – 26 г на 1 г сухой массы.

В 60-х годах была доказана способность клеток и тканей растений к росту, делению, органообразованию и вторичному метаболизму, т.е. способностью любой клетки образовывать полноценное растение, поскольку генетический и физиологический потенциал, необходимый для вторичных метаболитов присутствует в каждой клетке.

Для выращивания культур необходимы высокопродуктивные клетки растения. Так для выращивания родиолы розовой более перспективными являются клетки корневой системы.

Для обеспечения роста и синтеза продуктов вторичного метаболизма необходим подбор ингредиентов среды культивирования, которые проводят по двум направлениям и оценивают:

- влияние среды на формирование биомассы;
- влияние состава среды на синтез вторичных продуктов.

Компоненты среды для выращивания культур клеток растений должны включать: основные неорганические питательные вещества, источники железа, органические добавки (витамины, регуляторы роста), источники углерода, о чем говорилось выше.

Существует несколько стандартных питательных сред, широко используемых при культивировании, но количество регуляторов роста в них варьирует в зависимости от вида растений. На выход продукта может влиять концентрация источника углерода и других компонентов среды. Так в культуре клеток Барвинка розового увеличение выхода алкалоидов было связано с увеличением в среде концентрации сахарозы, а в культуре клеток моркови накопление антоциана стабилизировалось, когда в качестве лимитирующего фактора использовали фосфаты.

В качестве регуляторов роста и синтеза продуктов вторичного метаболизма используют ауксины, среди которых индолил-3-уксусная кислота, нафтилуксусная кислота, 2,4-дихлорфеноксиксусная кислота, а также цитокинины. На синтез вторичных метаболитов влияют внесенные в питательную среду известные предшественники, которые могут стимулировать определенные ферментативные пути метаболизма. Так внесение фенилаланина в среду для культивирования клеток увеличивало выход диосгенина примерно на 100%. На степень накопления вторичных

метаболитов влияют также свет, температура, рН, а при суспензионном суспензировании культивировании – аэрация и перемешивание, скорость вращения сосудов, газовый состав и т.д.

Таким образом, создавая для каждой культуры клеток растений благоприятные условия на стадии роста и синтеза вторичных метаболитов, можно гарантировать получение любого продукта с метаболической активностью.

Для накопления промышленного сырья путем выращивания клеток и тканей растений используют каллусные и суспензионные культуры, последние получают из каллусных.

Технология получения растительного сырья на основе каллусных культур имеет ряд преимуществ – это надежность и стабильность выхода биомассы и продуктов вторичного метаболизма, а также возможность использования каллусной системы для иммобилизации и последующей биотрансформации, но обладает существенным недостатком – необходимостью применения ручного труда.

В России разработана технология получения субстанций женьшеня, родиолы розовой, унгерии на основе каллусных культур. Данные препараты нашли применение в медицине, косметике и пищевой промышленности. При внедрении технологии суспензионного культивирования необходимо учитывать основные свойства растительных клеток: клетки растений в 50-100 раз больше, чем клетки грибов; в результате роста клетки увеличиваются в размерах, в них появляется большая вакуоль; суспензионные культуры состоят из клеточных агрегатов; наличие целлюлозной клеточной оболочки; интенсивность дыхания.

Выращивание растительных клеток осуществляется в сосудах различного объема (до 200 литров) с системами перемешивания (турбинное, восходящими потоками воздуха, встряхивания).

В настоящее время применяют многостадийные способы получения биомассы и продуктов вторичного метаболизма:

- выращивание в аэрируемом реакторе;
- перенос клеток из одной среды в другую, более богатую микро- и макроэлементами, питательными веществами, но лишенную органических добавок;
- последующее добавление в конце цикла органики.

В основном клетки выращивают в периодическом реакторе. Для повышения выхода продуктов вторичного метаболизма разрабатываются применительно к растительным клеткам методы иммобилизации, биотрансформации. На моделях ряда клеточных культур, например, кукурузы было показано, что синтез и накопление вторичных метаболитов связаны с агрегатным состоянием, отмечается, что чем ближе клетки и группы клеток к целому растению, тем выше у них метаболический потенциал. Имеется, однако, много данных об обратной зависимости между агрегатным состоянием и накоплением вторичных метаболитов. Это связано

с двумя типами механизмов. Первый основан на том, что определяет уровень агрегации клеток, а достаточная ее степень может быть достигнута в медленно растущих культурах. Второй механизм связан с кинетикой скорости роста и предполагает, что первичные и вторичные пути метаболизма по-разному конкурируют за предшественников в быстро и медленно растущих клетках.

Исходя из выше сказанного, очевидно, что иммобилизированные клетки, обладающие низкой скоростью роста, способны к интенсивной выработке метаболитов. Одно из условий при иммобилизации клеток – выделение метаболита в питательную среду, из которой он может быть легко извлечен. К таким культурам относятся клетки, продуцирующие алкалоиды. Преимущества иммобилизированных клеток по сравнению с суспензионными культурами следующие:

- многократное использование биомассы;
- четкое отделение биомассы от продуктов метаболизма;
- увеличение продолжительности культивирования на стадии продуцирования;
- получение большого количества вторичных метаболитов.

Другим перспективным вариантом использования культур клеток растений в фармацевтической промышленности следует считать их применение для биотрансформации.

**Биотрансформация** – метод, использующий ферменты, локализованные в клетке растения, которые способны менять функциональные группы добавленных извне химических соединений. Этот метод пригоден для повышения биологической активности данной конкретной химической структуры и осуществления серии специфических химических реакций за счет включения одного или нескольких последовательно связанных ферментов.

Возможность применения биотрансформации при синтезе некоторых соединений была показана на примере превращения дигитоксина в дигоксин клетками *Digitalis lanata* (наперстянки шерстистой). После 10-дневной инкубации клеток *D.lanata* в «ростовой» питательной среде (Мурасигё и Скуга) культуру клеток переносили в «продукционную» среду (8% раствор глюкозы) с субстратом для биотрансформации – дигитоксином. В этих условиях весь дигитоксин в течение 2 дней трансформировался в деацетиллантозид С (дигоксин) и пурпургликозид А 88% и 12% соответственно.

Дигитоксин и дигоксин принадлежат к группе "карденолидов", применяемых для лечения хронической болезни сердца.

В настоящее время названные соединения стоят на шестом и восьмом месте в списке наиболее распространенных препаратов США, но использование дигоксина предпочтительнее из-за его меньшей токсичности, по сравнению с таковой у дигитоксина. Оба соединения в США получают

путем экстрагирования плантационно выращиваемых растений, но при этом выделяется в основном дигитоксин.

Недифференцированные культуры *Digitalis* не образуют сердечных гликозидов, но могут осуществлять определенные реакции биотрансформации субстратов, добавленных в питательную среду. Биотрансформация дигитоксина в дигитоксин происходит за счет реакции 12-гидроксилирования, катализируемой ферментом, содержащимся в клетках *Digitalis lanata*. Работа была проведена с использованием свободных недифференцированных суспензионных культур в Германии в 1977 г, а к настоящему времени внедрена в производство; достигнут выход дигитоксина в пределах 700 г/л в 20-ти литровом реакторе за 17 суток культивирования. Таким образом, основные проблемы, связанные с биотрансформацией сердечных гликозидов клетками *Digitalis lanata* в настоящее время разрешены. Однако для дальнейшего развития этого направления необходима дальнейшая селекция специализированных линий клеток и оптимизация условий их культивирования, сокращение времени ферментации и увеличение срока работы клеток. Основные условия для перевода лабораторных методов культивирования клеток растений в промышленное производство – это экономически оправданные и относительно простые технологии культивирования клеток и выделения конечных продуктов.

Например, производство аймалина на основе меристемных культур Раувольфии стало реальным, когда в ходе селекционной работы и отбора были получены субклоны клеток, которые синтезируют этот алкалоид на порядок выше, чем исходные материнские штаммы.

Производство серпентина на основе суспензионных культур частично дифференцированных клеток меристемы *Catharatus roseus* оказалось эффективным и экономически оправданным лишь после того, как были получены субклоны, способные накапливать за 10-ти суточный цикл выращивания до 25 г сухого вещества на 1 литр суспензионной культуры.

Аналогичная ситуация имела место и при организации биотехнологического производства настойки женьшеня. Количественный выход биологической субстанции в пересчете на сухое вещество каллуса женьшеня было ниже, чем из женьшеня, полученного при плантационном выращивании, примерно в 3-4 раза.

Производство био-женьшеня стало экономически оправданным лишь после того, как удалось повысить продуктивность его каллусных культур, сохранив без изменений реактогенные свойства экстрагируемых лекарственных настоек. Оказалось, что чем более дифференцированы клетки меристемы в культуре, тем выше их продуктивность. Разработана технология получения в культуре так называемых «бородатых» корней, где по условиям роста в скоплении клеток возникают субпопуляции с повышенной дифференцировкой. Эти популяции являются самыми продуктивными по биологически активным веществам.

## 2.3 Классификация биотехнологических процессов

1. *Классификация по уровню организации биотехнологических процессов:*

- макроуровень (уровень аппаратного оформления биотехнологического процесса);
- микроуровень (уровень, соответствующий применяемому в технологическом процессе биообъекту).

2. *Классификация по применяемому объекту:*

2.1 По типу применяемого биообъекта:

- одноклеточные (монокультуры и ассоциации);
- культуры клеток и тканей;
- органеллы клеток;
- ферменты.

2.2 По степени усовершенствования применяемого биообъекта:

- стихийно возникающие биоценозы микроорганизмов;
- чистые культуры;
- мутанты;
- иммобилизованные ферменты и клетки;
- клеточные культуры многоклеточных организмов, генно-инженерные штаммы.

3. *Классификация по типу преобладающего процесса:*

- деструкция;
- биосинтез;
- трансформация.

4. *Классификация биотехнологических процессов в зависимости от масштаба:*

- крупномасштабные;
- среднемасштабные;
- мелкомасштабные.

5. *Классификация биотехнологических процессов по применяемой технологии:*

- периодические и непрерывные;
- поверхностные и глубинные;
- аэробные и анаэробные.

6. *Классификация биотехнологических процессов по истории возникновения и сложности:*

- процессы переработки продуктов питания - хлебопечение, приготовление напитков;
- бродильные производства, с помощью которых получают многие органические кислоты, растворители, органическое сырье (производство в не стерильных условиях);

- биотехнологические процессы с использованием специального оборудования – для очистки сточных вод, обезвреживания отходов производства, т.е. данные процессы в основном находят применение в области экологии (нестерильные условия);

- получение в промышленных условиях биологической массы для кормовых и технических целей: данные процессы требуют применения специального оборудования и реализуются в не стерильных условиях;

- получение микробной биомассы в асептических условиях;

- производство микробных метаболитов с целью получения антибиотиков, ферментов, органических кислот, полисахаридов и т.д. (стерильные условия процесса, требуется сложное оборудование для получения и очистки целевого продукта);

- использование иммобилизованных ферментов или клеток;

- биотрансформация органических веществ;

- культивирование клеток многоклеточных организмов (клональное размножение и т.д.);

- применение микробиологических процессов в нетрадиционных биологических областях – выщелачивание металлов, удаление метана из шахт, обогащение руд, повышение нефтеотдачи пластов.

Биотехнологические процессы отличаются от химических процессов: главными компонентами являются какой-либо биообъект (вирус, бактерии, грибы). Такие объекты отсутствуют в хим. технологии. Высокие температуры неприемлемы в биотехнологии, давление.

Многие процессы биологической технологии являются общими (показательно на аппаратном направлении, на выборе биореакторов).

Специальные - которые имеют свои специфические особенности (т.к. выращивание пеницилина, культивирование вирусов гриппа на куриных эмбрионах). С учетом этого все биотехнологические процессы делятся на микробиологические, фито- зообиотехнология (рисунок 15).



Рисунок 15 – Области использования специальных биотехнологий

Биотехнологические процессы условно подразделяются на *биологические, биохимические, биоаналогичные.*

К биологическим относят те, которые основываются на использовании прокариот и эукариот, акариоты (облигатные паразиты, которые развиваются лишь в живых клетках и тканях - бактериофаги, вирусы растений, млекопитающих).

Вторые - на использовании ферментов.

Третьи - основаны на химическом синтезе или полусинтезе веществ функционально близких или эквивалентных первичным или вторичным метаболитам живых организмов (*производство цефалоспорины, пенициллина, тетрациклина, нуклеиновых оснований*).

По условиям проведения процесса различают нестерильные (крупнотонажное производство кормовых дрожжей) и стерильные (получение антибиотиков, витаминов): аэробные и анаэробные.

Перспективность и эффективность применения биотехнологических процессов в различных сферах человеческой деятельности, от получения пищи и напитков до воспроизводства экологически чистых энергоносителей и новых материалов обусловлены их компактностью и одновременно крупномасштабностью, высоким уровнем механизации и производительности труда. Эти процессы поддаются контролю, регулированию и автоматизации.

Биотехнологические процессы, в отличие от химических, реализуются в «мягких» условиях, при нормальном давлении, активной реакции и



невысоких температурах среды; они в меньшей степени загрязняют окружающую среду отходами и побочными продуктами, мало зависят от климатических и погодных условий, не требуют больших земельных площадей, не нуждаются в применении пестицидов, гербицидов и других чужеродных для окружающей среды агентов. Поэтому биотехнология в целом и ее отдельные разделы находятся в ряду наиболее приоритетных направлений научно-технического прогресса и являются ярким примером «высоких технологий», с которыми связывают перспективы развития многих производств. Биологические технологии находятся в настоящее время в фазе бурного развития, но уровень их развития во многом определяется научно-техническим потенциалом страны.

В основу подразделения биотехнологических процессов могут быть положены различные принципы, например, оценка принадлежности объектов к надцарствам живых существ, функциональной активности биообъекта, возможности вычленения отдельных этапов из биотехнологических схем производства в виде самостоятельных процессов: выделение, очистка и упаковка готового продукта и т.д. (таблица 11).

Таблица 11 - Систематизация биотехнологических процессов

По характеристике биообъекта	По общности и специфичности биотехнологических процессов	По числу биообъектов	По условиям проведения процесса	По стадиям реализации технологии производства	По целевым продуктам	По механизму образования конечного продукта	По управлению процессом	По типу биотехнологического процесса
<p>1) плазмиды, фаги, вирусы растений и млекопитающих;</p> <p>2) клетки прокариот;</p> <p>3) клетки эукариот;</p> <p>4) биомолекулы (ферменты, нуклеиновые кислоты)</p>	<p>1) общие;</p> <p>2) специальные</p>	<p>1) один (например, иммобилизованный фермент, одна чистая культура – продуцент гликана и т.д.)</p> <p>2) два и более (например, иммобилизованная полиферментная система, кефирная зерна – ассоциация бактерий и дрожжей и т.д.)</p>	<p>1) нестерильный</p> <p>2) стерильный</p> <p>3) аэробный</p> <p>4) анаэробный</p> <p>5) поверхностный;</p> <p>6) глубинный;</p> <p>7) периодический</p> <p>8) полунепрерывный;</p> <p>9) непрерывный;</p> <p>10) твердофазный;</p> <p>11) газофазный;</p> <p>12) одноступенчатый;</p> <p>13) двухступенчатый;</p> <p>14) многоступенчатый</p>	<p>1) подготовка оборудования и питательных сред;</p> <p>2) стерилизация оборудования, питательных сред, воздуха;</p> <p>3) посев и выращивание (культивирование) биообъекта;</p> <p>4) выделение, очистка, сушка, стерилизация (при необходимости) продукта;</p> <p>5) упаковка</p>	<p>1) клеточная биомасса;</p> <p>2) первичные метаболиты;</p> <p>3) вторичные метаболиты</p>	<p>1) биосинтез;</p> <p>2) биотрансформация</p>	<p>1) управляемый;</p> <p>2) неуправляемый</p>	<p>1) простой;</p> <p>2) совместный</p> <p>3) последовательный;</p> <p>4) ступенчатый</p>

Процессы биохимической технологии подразделяют по стадиям реализации технологической схемы производства: подготовка оборудования и питательных сред, их стерилизация, посев биообъекта и ферментация, выделение, очистка, сушка, упаковка (рисунок 16).

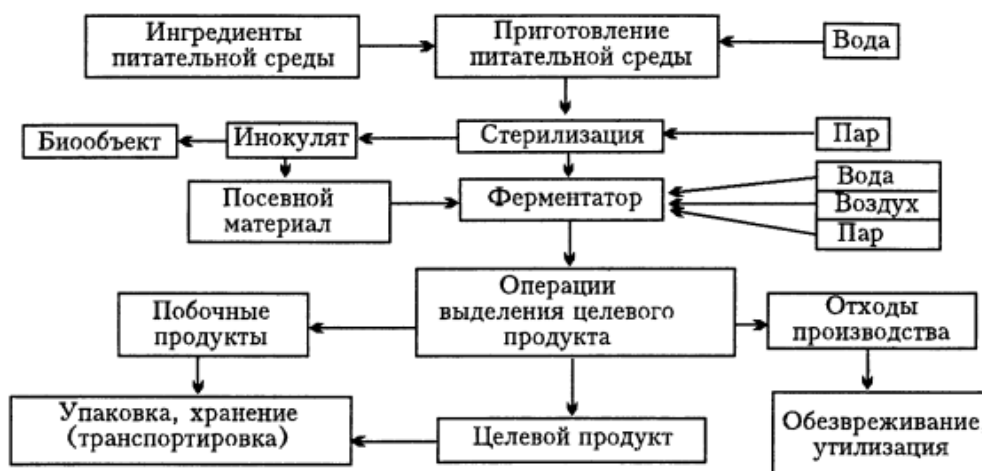


Рисунок 16 – Примерная обобщенная схема процессов в биотехнологии

В зависимости от целевого продукта число стадий процесса может быть то больше, то меньше. Для сравнения можно назвать производство кормовых дрожжей и антибиотика стрептомицина. В первом случае целевым продуктом являются дрожжевые клетки, во втором — вторичный метаболит, предназначенный для парентерального введения больным людям и животным. При получении антибиотика имеется больше стадий, чем в случае получения дрожжевых клеток.

Целевыми продуктами могут быть и первичные метаболиты — ферментные белки. Очевидно, что, например, экзогидролазы технологически получать легче, нежели какие-нибудь эндоферменты, локализующиеся внутри клеток, и число стадий в этом последнем случае может возрасть.

Очевидно, что подготовка оборудования, питательных сред, и все другие этапы регламентированной схемы производства какого-либо целевого продукта различны по многим показателям, если это будут, например, процессы получения экзотоксинов и органических кислот. С биотехнологических позиций работа с токсигенными культурами должна проводиться на таком уровне, чтобы исключить возможность попадания ее за пределы биореактора в живом состоянии. Строгий контроль осуществляется также за внутрипроизводственной обработкой и транспортировкой культуральной жидкости, содержащей экзотоксин. Эксплуатация возможностей, например *Aspergillus niger* продуцировать лимонную кислоту не сопряжена с подобной опасностью. Тем не менее, во избежание рассеивания грибных спор во внешней среде желательно и в этом случае ферментацию осуществлять в герметизированных биореакторах.

## 2.4 Стадии биотехнологического процесса

Большое разнообразие биотехнологических процессов, нашедших промышленное применение, приводит к необходимости рассмотреть общие, наиболее важные проблемы, возникающие при создании любого биотехнологического производства. Процессы промышленной биотехнологии разделяют на 2 большие группы: производство биомассы и получение продуктов метаболизма. Однако такая классификация не отражает наиболее существенных с технологической точки зрения аспектов промышленных биотехнологических процессов. В этом плане необходимо рассматривать стадии биотехнологического производства, их сходство и различие в зависимости от конечной цели биотехнологического процесса. В общем виде система биотехнологического производства продуктов микробного синтеза представлена на рисунке 17.

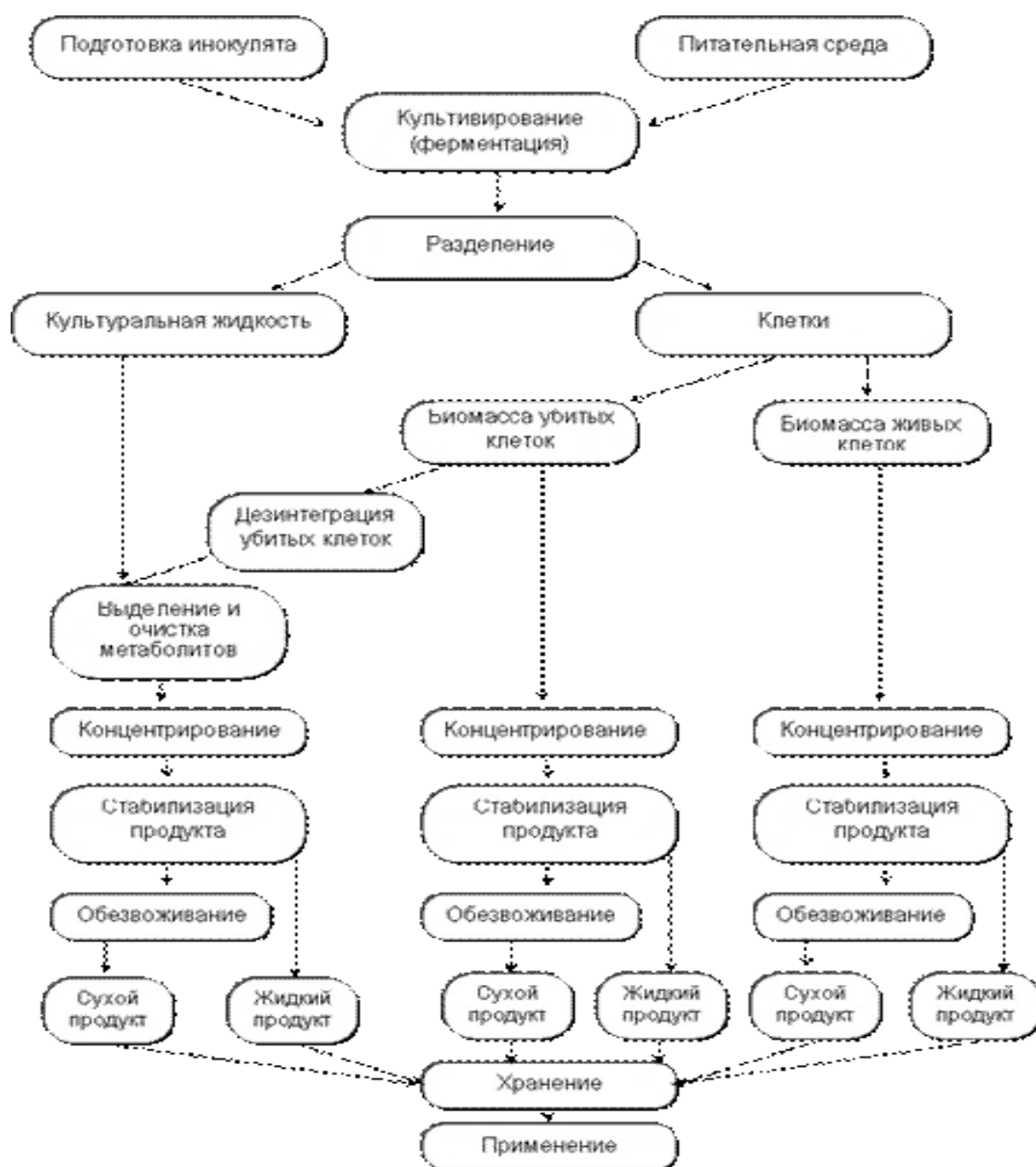


Рисунок 17 - Система биотехнологического производства

Существует 5 стадий биотехнологического производства:

Две начальные стадии включают подготовку сырья и биологически действующего начала. В процессах инженерной энзимологии они обычно состоят из приготовления раствора субстрата с заданными свойствами (рН, температура, концентрация) и подготовки партии ферментного препарата данного типа, ферментного или иммобилизованного. При осуществлении микробиологического синтеза необходимы стадии приготовления питательной среды и поддержания чистой культуры, которая могла бы постоянно или по мере необходимости использоваться в процессе. Поддержание чистой культуры штамма-продуцента - главная задача любого микробиологического производства, поскольку высокоактивный, не претерпевший нежелательных изменений штамм может служить гарантией получения целевого продукта с заданными свойствами.

Третья стадия - стадия ферментации, на которой происходит образование целевого продукта. На этой стадии идет микробиологическое превращение компонентов питательной среды сначала в биомассу, затем, если это необходимо, в целевой метаболит.

На четвертом этапе из культуральной жидкости выделяют и очищают целевые продукты. Для промышленных микробиологических процессов характерно, как правило, образование очень разбавленных растворов и суспензий, содержащих, помимо целевого, большое количество других веществ. При этом приходится разделять смеси веществ очень близкой природы, находящихся в растворе в сравнимых концентрациях, весьма лабильных, легко подвергающихся термической деструкции.

Заключительная стадия биотехнологического производства - приготовление товарных форм продуктов. Общим свойством большинства продуктов микробиологического синтеза является их недостаточная стойкость к хранению, поскольку они склонны к разложению и в таком виде представляют прекрасную среду для развития посторонней микрофлоры. Это заставляет технологов принимать специальные меры для повышения сохранности препаратов промышленной биотехнологии. Кроме того, препараты для медицинских целей требуют специальных решений на стадии расфасовки и укупорки, так должны быть стерильными. Далее приводятся характеристики каждой из стадий промышленного микробиологического синтеза.

В общем виде любой биотехнологический процесс включает три основные стадии: предферментационную, ферментационную и постферментационную. Принципиальная схема реализации биотехнологических процессов в общем виде может быть представлена блок-схемой, в которой сделана попытка охватить все варианты ферментационных процессов (рисунки 18).



Рисунок 18 - Обобщенная схема процессов в биотехнологии

На предферментационной стадии осуществляют хранение и подготовку культуры продуцента (инокулята), получение и подготовку питательных субстратов и сред, ферментационной аппаратуры, технологической и рециркулируемой воды и воздуха. Поддержание и подготовка чистой культуры является очень важным моментом предферментационной стадии, так как продуцент, его физиолого-биохимические характеристики и свойства определяют эффективность всего биотехнологического процесса. В отделении чистой культуры осуществляют хранение производственных штаммов и обеспечивают их реактивацию и наработку инокулята в количествах, требуемых для начала процесса. При выращивании посевных доз инокулята применяют принцип масштабирования, то есть проводят последовательное наращивание биомассы продуцента в колбах, бутылках, далее в серии ферментеров. Каждый последующий этап данного процесса отличается по объему от предыдущего обычно на порядок. Полученный инокулят по стерильной посевной линии направляется далее в аппарат, в котором реализуется ферментационная стадия. Приготовление питательных сред осуществляется в специальных реакторах, оборудованных мешалками. В зависимости от растворимости и совместимости компонентов сред могут быть применены отдельные реакторы. Технология приготовления сред значительно усложняется, если в их состав входят нерастворимые компоненты.

В различных биотехнологических процессах применяются различные по происхождению и количествам субстраты, поэтому процесс их приготовления варьирует. Дозирование питательных компонентов подбирается и осуществляется индивидуально на каждом производстве в соответствии с Технологическим регламентом конкретного процесса. В качестве дозирующего оборудования при этом применяются весовые и объемные устройства, используемые в пищевой и химической промышленности. Транспорт веществ осуществляется насосами, ленточными и шнековыми транспортерами. Сыпучие компоненты подают в ферментеры с помощью вакуумных насосов. Часто применяют принцип предварительных

смесей, то есть соли предварительно растворяют и затем транспортируют по трубопроводам, дозируя их подачу по объему. В силу исключительного разнообразия биотехнологических процессов и применяемых для их реализации сред, методов и аппаратуры рассмотрение данных элементов далее будет связано с конкретными биотехнологическими производствами.

Первая наиболее полноценная среда была приготовлена учеником Л. Пастера Ролэном в 1869 году для грибов рода *Aspergillus*. Хотя в распоряжении Л. Пастера не было метода чистых культур, но ему с учениками удалось, пользуясь элективными средами, доказать потребность микроорганизмов в главных и второстепенных компонентах среды и в источниках энергии. В 1870 году Р. Кох ввел в практическую микробиологию метод чистых культур, гарантировавших получение на предложенных им плотных питательных средах чистых культур только определенных видов бактерий.

Потребность в сложных веществах, необходимых для микроорганизмов и именуемых в настоящее время «факторами роста», впервые установил Вильдье в 1901 году.

Он доказал, что витамин В является одним из факторов, необходимых для роста дрожжей.

На первых этапах микробиологических исследований культивирование микроорганизмов осуществляли в пробирках или колбах путем выращивания их на поверхности плотных или жидких сред.

Стадия ферментации является основной стадией в биотехнологическом процессе, так как в ее ходе происходит взаимодействие продуцента с субстратом и образование целевых продуктов (биомасс, эндо- и экзопродуктов). Эта стадия осуществляется в биохимическом реакторе (ферментере) и может быть организована в зависимости от особенностей используемого продуцента и требований к типу и качеству конечного продукта различными способами. Ферментация может проходить в строго асептических условиях и без соблюдения правил стерильности (так называемая незащищенная ферментация); на жидких и на твердых средах; анаэробно и аэробно. Аэробная ферментация, в свою очередь, может протекать поверхностно или глубинно (во всей толще питательной среды).

Культивирование биологических объектов может осуществляться в периодическом и проточном режимах, полунепрерывно с подпиткой субстратом. При периодическом способе культивирования ферментер заполняется исходной питательной средой и инокулятом микроорганизмов. В течение определенного периода времени в аппарате происходит взаимодействие микроорганизмов и субстрат, сопровождающееся образованием в культуре продукта ( $X + S \rightarrow P$ ).

Биохимические превращения в этом аппарате продолжаются от десятков часов до нескольких суток. Регуляция условий внутри ферментера – важнейшая задача периодического культивирования микроорганизмов.

В ходе периодической ферментации выращиваемая культура проходит ряд последовательных стадий: лаг-фазу, экспоненциальную, замедления

роста, стационарную и отмирания. При этом происходят существенные изменения физиологического состояния биообъекта, а также ряда параметров среды. Целевые продукты образуются в экспоненциальной (первичные метаболиты – ферменты, аминокислоты, витамины) и стационарной (вторичные метаболиты – антибиотики) фазах, поэтому в зависимости от целей биотехнологического процесса в современных промышленных процессах применяют принцип дифференцированных режимов культивирования. В результате этого создаются условия для максимальной продукции того или иного целевого продукта. Периодически ферментер опорожняют, производят выделение и очистку продукта, и начинается новый цикл.

**Периодической системой культивирования** называют систему, в которой после внесения бактерий (засева) в питательную среду не производится ни добавления, ни удаления каких-либо компонентов, кроме газовой фазы. Отсюда следует, что периодическая система может поддерживать размножение клеток в течение ограниченного времени, на протяжении которого состав питательной среды изменяется от благоприятного (оптимального) для их роста до неблагоприятного, вплоть до полного прекращения процесса размножения.

Рост в такой «закрытой системе» подчиняется определенным закономерностям. Общую закономерность роста и размножения бактериальной популяции принято показывать графически в виде кривой, отражающей зависимость логарифма числа живых клеток от времени культивирования.

Типичная кривая (рисунок 19) имеет S-образную форму и позволяет различать несколько фаз роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности: начальную (или лаг-) фазу, экспоненциальную (или логарифметрическую, лог-фазу), стационарную и фазу отмирания.

#### **Начальная фаза.**

Эта фаза охватывает промежуток времени между инокуляцией (момент посева) и достижением максимальной скорости деления микробов.

Продолжительность этой фазы зависит главным образом от предшествующих условий культивирования и возраста инокулята, а также от степени пригодности питательной среды для роста данного микроба.

Если инокулят взят из старой культуры, то клеткам приходится сначала адаптироваться к новым условиям путем синтеза РНК, образования рибосом и синтеза ферментов.

Если источники энергии и углерода в новой среде отличаются от таковых предшествующей культуры, приспособление к новым условиям может быть связано с синтезом новых ферментов, которые ранее не были нужны и поэтому не синтезировались.

Образование новых ферментов индуцируется новым субстратом.

При более глубоком исследовании физиологического состояния микроорганизма в **лаг-фазе** представляется возможным и целесообразным выделить две стадии:



а) Стадия покоя – время от момента посева микробов до начала их роста. Число клеток при этом не увеличивается, а в некоторых случаях – даже уменьшается. Продолжительность её – 1-2 часа;

б) Стадия задержки размножения длительностью около 2 час. Клетки в течение этой стадии интенсивно растут, но слабо размножаются.

Количественные изменения состава бактериальной клетки во время лаг-фазы сильнее всего затрагивают РНК, содержание которой повышается в 8-12 раз, что указывает на участие РНК в синтезе ферментных белков.

**Экспоненциальная фаза, или фаза логарифмического роста** характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток.

Период генерализации (лат. Generatio – рождение, воспроизведение) – это время между двумя последовательными делениями бактерий – в этой стадии будет постоянным для данного вида, а количество бактерий будет увеличиваться в геометрической прогрессии.

Следовательно, после “n” генерации количество клеток в культуре будет равно “2n”.

Длительность лог-фазы – обычно 5-6 часов.

Величина клеток и количество содержания в них белка у многих бактерий в лог-фазе также остаются постоянными и в целом микробная популяция состоит из «стандартных клеток».

Если увеличение биомассы бактерий, включая белки, РНК, липиды и другие макромолекулы, происходит пропорционально увеличению численности бактериальных клеток, то такое состояние определяют понятием «**сбалансированный рост**».

Поэтому за ростом культуры в стадии «сбалансированного роста» лог-фазы можно следить, пользуясь каким-нибудь одним из этих показателей.

За стадией сбалансированного роста уже в лог-фазе наступает стадия **отрицательного ускорения**, при которой скорость размножения бактерий перестает быть максимальной. В результате число делящихся особей – уменьшается, а число погибших – увеличивается. Ее длительность около 2-х часов.

**Причина замедления размножения:** истощение питательной среды, накопление продуктов метаболизма, увеличение плотности клеточной суспензии и мн.др.

В связи с тем, что в экспоненциальной фазе скорость деления клеток относительно постоянна, эта фаза наиболее удобна для определения скорости деления (и скорости роста).

**Стационарная фаза максимума.**

В ней число новых живых бактерий почти равно числу отмерших (равновесие). Переход от лог-фазы к стационарной происходит постепенно.

Причины замедления роста - нехватка питательной среды, большая плотность бактериальной популяции, низкое парциальное давление O<sub>2</sub>, накопление токсических продуктов обмена. Все эти факторы вызывают переход к стационарной фазе.

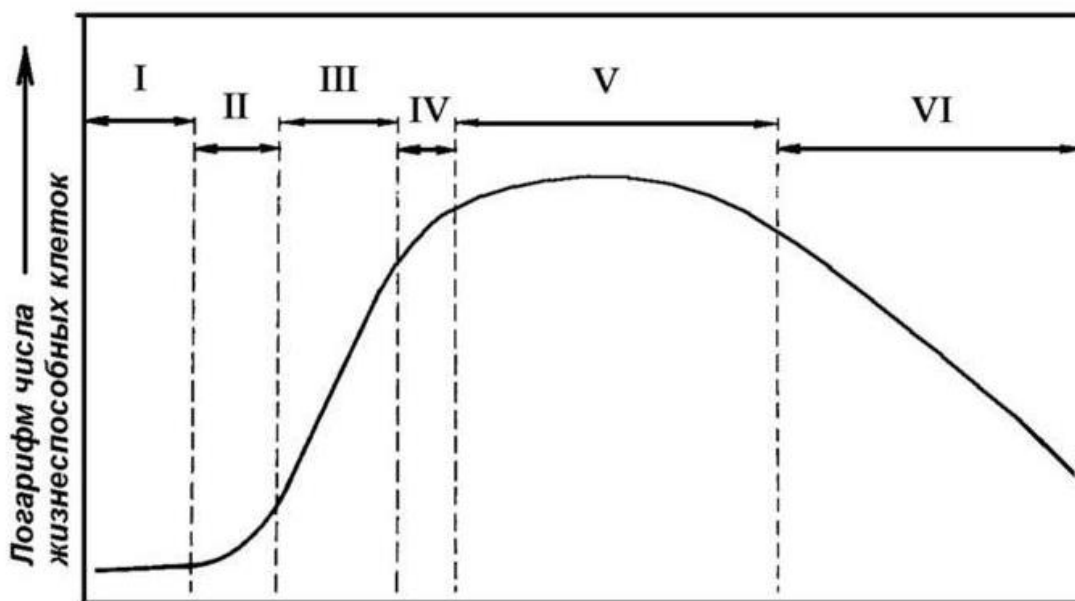
Но и в стационарной фазе могут еще происходить такие процессы, как использование запасных веществ, распад части рибосом и синтез ферментов. Наблюдаемая картина зависит от того, какой именно фактор лимитирует рост. Быстро гибнут лишь очень чувствительные клетки, другие – еще долго сохраняют жизнеспособность – до тех пор, пока еще есть возможность получать необходимую для этого энергию в процессе окисления каких-либо запасных веществ или клеточных белков.

Количество биомассы, достигнутое в стационарной фазе, называют выходом или урожаем. Урожай зависит от природы и количества используемых питательных веществ, а также от условий культивирования.

#### **Фаза отмирания.**

В этой фазе можно выделить три стадии:

- а) стадия ускорения гибели, характеризующаяся превышением числа отмирающих клеток над количеством вновь образующихся (около 3 часов);
- б) стадия логарифмической гибели – отмирание клеток происходит с постоянной скоростью (5 часов);
- в) стадия уменьшения скорости отмирания, во время которой оставшиеся в живых клетки переходят в стадию покоя.



*Рисунок 19 - Кривая роста микроорганизмов в ходе периодической ферментации: 1 - лаг-фаза; 2 - фаза экспоненциального роста; 3 - фаза линейного роста; 4 - фаза замедления роста; 5 - стационарная фаза; 6 - фаза отмирания*

Непрерывный процесс культивирования микроорганизмов обладает существенными преимуществами перед периодическим. Непрерывная ферментация осуществляется в условиях установившегося режима, когда микробная популяция и ее продукты наиболее однородны. Применение непрерывных процессов ферментации создает условия для эффективного

регулирования и управления процессами биосинтеза. Системы непрерывной ферментации могут быть организованы по принципу полного вытеснения или полного смешения. Первый пример – так называемая тубулярная культура.

Процесс ферментации осуществляется в длинной трубе, в которую с одного конца непрерывно поступают питательные компоненты и инокулят, а из другого с той же скоростью вытекает культуральная жидкость. Данная система проточной ферментации гетерогенна.

При непрерывной ферментации в ферментах полного смешения (гомогенно-проточный способ) во всей массе ферментационного аппарата создаются одинаковые условия. Применение таких систем ферментации позволяет эффективно управлять отдельными стадиями, а также всем биотехнологическим процессом и стабилизировать продуцент в практически любом требуемом экспериментатору или биотехнологу состоянии. Управление подобными установками осуществляется двумя способами.

Турбидостатный способ базируется на измерении мутности выходящего потока. Измерение мутности микробной суспензии, вызванное ростом клеток, служит мерой скорости роста, с которой микроорганизмы выходят из биореактора. Это позволяет регулировать скорость поступления в ферментер свежей питательной среды. Второй метод контроля, хемостатный, проще.

Управление процессом в хемостате осуществляется измерением не выходящего, а входящего потока. При этом концентрацию одного из компонентов питательной среды (углерод, кислород, азот), поступающего в ферментер, устанавливают на таком уровне, при котором другие питательные компоненты находятся в избытке, то есть лимитирующая концентрация задающегося биогенного элемента ограничивает скорость размножения клеток в культуре.

Обеспечение процесса ферментации с точки зрения инженерной реализации сводится к дозированному поступлению в ферментер потоков (инокулята, воздуха (или газовых смесей), питательных биогенов, пеногасителей) и отвода из него тепла, отработанного воздуха, культуральной жидкости, а также измерению и стабилизации основных параметров процесса на уровне, требуемом для оптимального развития продуцента и образования целевого продукта.

В ходе ферментации образуются сложные смеси, содержащие клетки, внеклеточные метаболиты, остаточные концентрации исходного субстрата. При этом целевые продукты, как правило, находятся в этой смеси в небольших концентрациях, а многие из них легко разрушаются. Все это накладывает существенные ограничения на методы выделения и сушки биологических препаратов.

Постферментационная стадия обеспечивает получение готовой товарной продукции и также, что не менее важно, обезвреживание отходов и побочных продуктов. В зависимости от локализации конечного продукта (клетка или культуральная жидкость) и его природы на

постферментационной стадии применяют различную аппаратуру и методы выделения и очистки. Наиболее трудоемко выделение продукта, накапливающегося в клетках.

Первым этапом постферментационной стадии является фракционирование культуральной жидкости и отделение взвешенной фазы – биомассы. Наиболее распространенный для этих целей метод – сепарация, осуществляемая в специальных аппаратах – сепараторах, которые работают по различным схемам в зависимости от свойств обрабатываемой культуральной жидкости. Основные проблемы возникают при необходимости выделения мелковзвешенных частиц с размером 0,5–1,0 мкм и менее (бактериальные клетки) и необходимостью переработки больших объемов жидкости (производство кормового белка, ряда аминокислот). Для повышения эффективности процесса сепарации применяют предварительную специальную обработку культуры – изменение рН, нагревание, добавление химических агентов. Для увеличения сроков годности биотехнологических продуктов производят их обезвоживание и стабилизацию.

В зависимости от свойств продукта применяют различные методы высушивания. Сушка термостабильных препаратов осуществляется на подносах, ленточном конвейере, а также в кипящем слое. Особо чувствительные к нагреванию препараты высушивают в вакуум-сушильных шкафах при пониженном давлении и температуре и в распылительных сушилках. К стабилизации свойств биотехнологических продуктов ведет добавление в качестве наполнителей различных веществ. Для стабилизации кормового белка применяют пшеничные отруби, кукурузную муку, обладающие дополнительной питательной ценностью. Для стабилизации ферментных препаратов используют глицерин и углеводы, которые препятствуют денатурации ферментов, а также неорганические ионы кобальта, магния, натрия, антибиотики и др.

#### **2.4.1 Питательные среды и микробиологическое исследование**

Микробиологическое исследование - это выделение чистых культур микроорганизмов, культивирование и изучение их свойств. Чистыми называют культуры, состоящие из микроорганизмов одного вида. Они нужны при диагностике инфекционных болезней, для определения видовой и типовой принадлежности микробов, в исследовательской работе, для получения продуктов жизнедеятельности микробов (токсинов, антибиотиков, вакцин и т. п.).

Для культивирования микроорганизмов (выращивание в искусственных условиях *in vitro*) необходимы особые субстраты - питательные среды. На средах микроорганизмы осуществляют все жизненные процессы (питаются, дышат, размножаются и т. д.), поэтому их еще называют средами для культивирования.

*Питательные среды*

Питательные среды являются основой микробиологической работы, и их качество нередко определяет результаты всего исследования. Среда должна создавать оптимальные (наилучшие) условия для жизнедеятельности микробов.

*Требования, предъявляемые к средам*

Среды должны соответствовать следующим требованиям:

1) быть питательными, т. е. содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. Ими являются источники органических и минеральных (неорганических) веществ, включая микроэлементы. Минеральные вещества не только входят в структуру клетки и активизируют ферменты, но и определяют физико-химические свойства среды (осмотическое давление, рН и др.). При культивировании ряда микроорганизмов в среду вносят факторы роста - витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать;

*Внимание!* Микроорганизмы, как все живые существа, нуждаются в большом количестве воды.

2) иметь оптимальную концентрацию водородных ионов - рН, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.

Для большинства патогенных бактерий оптимальна слабощелочная среда (рН 7,2-7,4). Исключения составляют холерный вибрион - его оптимум находится в щелочной зоне (рН 8,5-9,0) и возбудитель туберкулеза, нуждающийся в слабокислой реакции (рН 6,2-6,8).

Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН, среды должны обладать буферностью, т. е. содержать вещества, нейтрализующие продукты; обмена;

3) быть изотоничными для микробной клетки; т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5% раствору натрия хлорида;

4) быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды (состав, рН и др.);

5) плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию;

6) обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, т. е. соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом  $RH_2$ . Этот потенциал показывает насыщение среды кислородом. Для одних микроорганизмов нужен высокий потенциал, для других - низкий. Например, анаэробы размножаются при  $RH_2$  не выше 5, а аэробы - при  $RH_2$  не ниже 10. Окислительно-восстановительный потенциал большинства сред удовлетворяет требованиям к нему аэробов и факультативных анаэробов;

7) быть по возможности унифицированным, т. е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов. Так, среды для культивирования большинства патогенных бактерий должны содержать 0,8-1,2 г/л аминного азота  $\text{NH}_2$ , т. е. суммарного азота аминогрупп аминокислот и низших полипептидов; 2,5-3,0 г/л общего азота N; 0,5% хлоридов в пересчете на натрия хлорид; 1% пептона.

Желательно, чтобы среды были прозрачными - удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

#### *Классификация сред*

Потребность в питательных веществах и свойствах среды у разных видов микроорганизмов неодинакова. Это исключает возможность создания универсальной среды. Кроме того, на выбор той или иной среды влияют цели исследования.

В настоящее время предложено огромное количество сред, в основу классификации которых положены следующие признаки.

**1. Исходные компоненты.** По исходным компонентам различают натуральные и синтетические среды. Натуральные среды готовят из продуктов животного и растительного происхождения. В настоящее время разработаны среды, в которых ценные пищевые продукты (мясо и др.) заменены непищевыми: костной и рыбной мукой, кормовыми дрожжами, сгустками крови и др. Несмотря на то, что состав питательных сред из натуральных продуктов очень сложен и меняется в зависимости от исходного сырья, эти среды нашли широкое применение. Синтетические среды готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворенных в дважды дистиллированной воде.

Важное преимущество этих сред в том, что состав их постоянен (известно, сколько и какие вещества в них входят), поэтому эти среды легко воспроизводимы.

**2. Консистенция** (степень плотности). Среда бывает жидкие, плотные и полужидкие. Плотные и полужидкие среды готовят из жидких, к которым для получения среды нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин.

Агар-агар - полисахарид, получаемый из определенных сортов морских водорослей. Он не является для микроорганизмов питательным веществом и служит только для уплотнения среды. В воде агар плавится при 80-100°C, застывает при 40-45°C.

Желатин - белок животного происхождения. При 25-30°C желатиновые среды плавятся, поэтому культуры на них обычно выращивают при комнатной температуре. Плотность этих сред при pH ниже 6,0 и выше 7,0 уменьшается, и они плохо застывают. Некоторые микроорганизмы используют желатин как питательное вещество - при их росте среда разжижается.

Кроме того, в качестве плотных сред применяют свернутую сыворотку крови, свернутые яйца, картофель, среды с силикагелем.

3. **Состав.** Среда делят на простые и сложные. К первым относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонную воду. Сложные среды готовят, прибавляя к простым средам кровь, сыворотку, углеводы и другие вещества, необходимые для размножения того или иного микроорганизма.

#### 4. **Назначение:**

а) основные (общеупотребительные) среды служат для культивирования большинства патогенных микробов. Это вышеупомянутые МПА, МПБ, бульон и агар Хоттингера, пептонная вода;

б) специальные среды служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах. Например, для культивирования стрептококка к средам прибавляют сахар, для пневмо- и менингококков - сыворотку крови, для возбудителя коклюша - кровь;

в) селективные (избирательные) среды служат для выделения определенного вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Так, соли желчных кислот, подавляя рост кишечной палочки, делают среду селективной для возбудителя брюшного тифа. Среда становится селективной при добавлении к ним определенных антибиотиков, солей, изменении рН.

Жидкие селективные среды называют средами накопления. Примером такой среды служит пептонная вода с рН 8,0. При таком рН на ней активно размножается холерный вибрион, а другие микроорганизмы не растут;

г) дифференциально-диагностические среды позволяют отличить (дифференцировать) один вид микробов от другого по ферментативной активности, например среды Гисса с углеводами и индикатором. При росте микроорганизмов, расщепляющих углеводы, изменяется цвет среды;

д) консервирующие среды предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала; в них предотвращается отмирание патогенных микроорганизмов и подавляется развитие сапрофитов. Пример такой среды - глицериновая смесь, используемая для сбора испражнений при исследованиях, проводимых с целью обнаружения ряда кишечных бактерий.

#### **Приготовление сред**

Посуда для приготовления сред не должна содержать посторонних веществ, например щелочей, выделяемых некоторыми сортами стекла, или окислов железа, которые могут попасть в среду при варке ее в ржавых кастрюлях. Лучше всего пользоваться стеклянной, эмалированной или алюминиевой посудой. Большие количества среды (десятки и сотни литров) готовят в специальных варочных котлах или реакторах. Перед употреблением посуду необходимо тщательно вымыть, прополоскать и высушить. Новую стеклянную посуду предварительно кипятят 30 мин в 1-2% растворе хлороводородной кислоты или погружают в этот раствор на ночь, после чего в течение часа прополаскивают в проточной воде.

*Внимание!* Посудой, предназначенной для приготовления сред, нельзя пользоваться в других целях, например для хранения химических реактивов или дезинфицирующих растворов - даже следы этих веществ могут помешать росту микроорганизмов.

**Исходным сырьем** для приготовления большинства сред служат продукты животного или растительного происхождения: мясо и его заменители, молоко, яйца, картофель, соя, кукуруза, дрожжи и др.

Основные питательные бульоны готовят на мясной воде или на различных переварах, полученных при кислотном или ферментативном гидролизе исходного сырья. Бульоны из переваров в 5-10 раз экономичнее, чем из мясной воды. Среды на переварах богаче аминокислотами, следовательно, питательнее; обладают большей буферностью, т. е. имеют более стабильную величину рН. Кроме того, перевары можно готовить из заменителей мяса (сгустков крови, плаценты, казеина и т. д.).

В настоящее время снабжение лабораторий мясной водой и переварами централизовано. Чаще пользуются панкреатическим переваром Хоттингера, гидролизатами казеина или кормовых дрожжей. Из этих полуфабрикатов по определенным рецептам готовят необходимые среды.

**Этапы приготовления** сред: 1) варка; 2) установление оптимальной величины рН; 3) осветление; 4) фильтрация; 5) разлив; 6) стерилизация; 7) контроль.

**Варят** среды на открытом огне, водяной бане, в автоклаве или варочных котлах, подогреваемых паром.

**Установление рН** сред ориентировочно производят с помощью индикаторных бумажек. Для точного определения рН пользуются потенциометром, применяя стеклянные электроды в соответствии с инструкцией или компаратором (аппарат Михаэлиса), состоящим из штатива с гнездами для пробирок (рисунок 20) и набора стандартов определенного рН. При приготовлении сред пользуются обычно индикатором метанитрофенолом, изменяющим свой цвет в диапазоне 6,8-8,4.

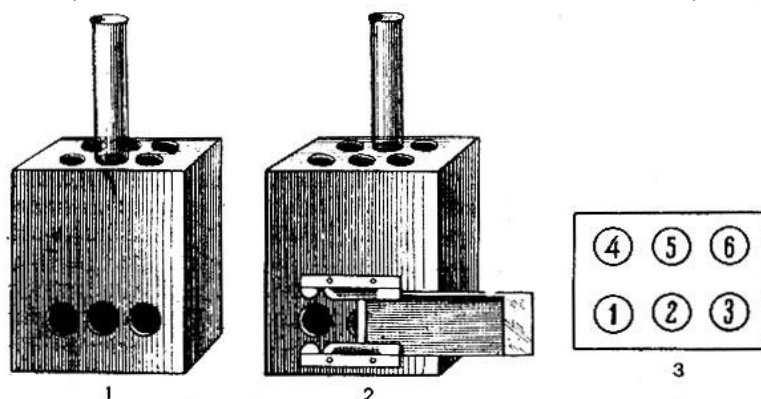


Рисунок 20 - Компаратор (аппарат макро-Михаэлиса). 1 - вид спереди; 2 - вид сзади; 3 - схема расположения пробирок в штативе

Для определения рН среды 4 пробирки, диаметр и цвет стекла которых не отличается от пробирок со стандартами, помещают в гнезда 1, 2, 3 и 5 (см.



рис. 20). В 1-ю и 3-ю пробирки наливают по 5 мл дистиллированной воды; в 5-ю - 7 мл; во 2-ю - 4 мл воды и 1 мл индикатора. В гнезда 4 и 6 ставят стандарты нужного рН. В 1-ю, 2-ю и 3-ю пробирки наливают 2 мл охлажденной среды. Содержимое пробирок смешивают.

Цвет жидкостей в пробирках сравнивают в проходящем свете, закрыв заднюю прорезь прибора фильтром (матовым или синим, если жидкости интенсивно желтые). рН испытуемого раствора соответствует рН стандарта, с цветом которого совпадает его цвет.

Готовя среды с заданным рН, в гнезде 4 и 6 ставят стандарты, рН которых близок к требуемому, а во 2-ю пробирку с испытуемой средой и индикатором добавляют из бюретки определенное количество раствора щелочи, если жидкость во 2-й пробирке светлее стандартов, или раствора кислоты - если светлее стандарты. Щелочь (или кислоту) приливают до тех пор, пока цвет жидкости во 2-й пробирке не совпадает с цветом стандартов. Количество щелочи (или кислоты), прибавленное к 2 мл среды во 2-й пробирке, пересчитывают на весь объем приготовленной среды. Например, если для получения нужного рН на 2 мл среды пошло 2 капли (0,1 мл) 0,05 н. раствора щелочи, то для подщелачивания 1 л нужно в 500 раз больше, т. е. 50 мл 0,05 н. или 2,5 мл 1 н. раствора щелочи.

При стерилизации рН сред снижается на 0,2, поэтому для получения среды с рН 7,2-7,4 ее сначала готовят с рН 7,4-7,6.

**Осветление** сред производят, если при варке они мутнеют или темнеют. Для осветления в среду, подогретую до 50° С, вливают белок куриного яйца, взбитый с двойным количеством воды, перемешивают и кипятят. Свертываясь, белок увлекает в осадок взвешенные в среде частицы. Таким же способом можно вместо яичного белка использовать сыворотку крови (20-30 мл на 1 л среды).

**Фильтрацию** жидких и расплавленных желатиновых сред производят через влажный бумажный или через матерчатые фильтры. Фильтрация агаровых сред затруднена, - они быстро застывают. Обычно их фильтруют через ватно-марлевый фильтр (в воронку помещают марлевую салфетку и на нее пышный комок ваты). Можно пользоваться бумажными или матерчатыми фильтрами, если проводить фильтрацию в горячем автоклаве или в воронках с подогревом.

Фильтрацию агаровых сред можно заменить отстаиванием. Среду наливают в высокий цилиндрический сосуд и расплавляют в автоклаве. При медленном остывании среды в выключенном приборе взвешенные в ней частицы оседают на дно. На следующий день агаровый сгусток извлекают из сосуда (для этого сосуд ненадолго помещают в горячую воду) и отрезают ножом нижнюю часть со скопившимся осадком. Верхнюю часть растапливают и разливают в соответствующие емкости.

**Разливают** среды в пробирки (по 3-5 мл или по 10 мл), флаконы, колбы, матрацы и бутылки не более чем на  $\frac{2}{3}$  емкости, так как при стерилизации могут намокнуть пробки и среды утратят стерильность.

Среды, которые стерилизуют при температуре выше 100° С, разливают в чистую сухую посуду. Среды, стерилизуемые при более низкой температуре, обязательно разливают в стерильную посуду.

Разливают среды с помощью воронки, на конец которой надета резиновая трубка с зажимом Мора. Для мерного разлива применяют мензурки, бюретки, дозаторы, шприцы-пипетки и т. п. (рисунок 21).

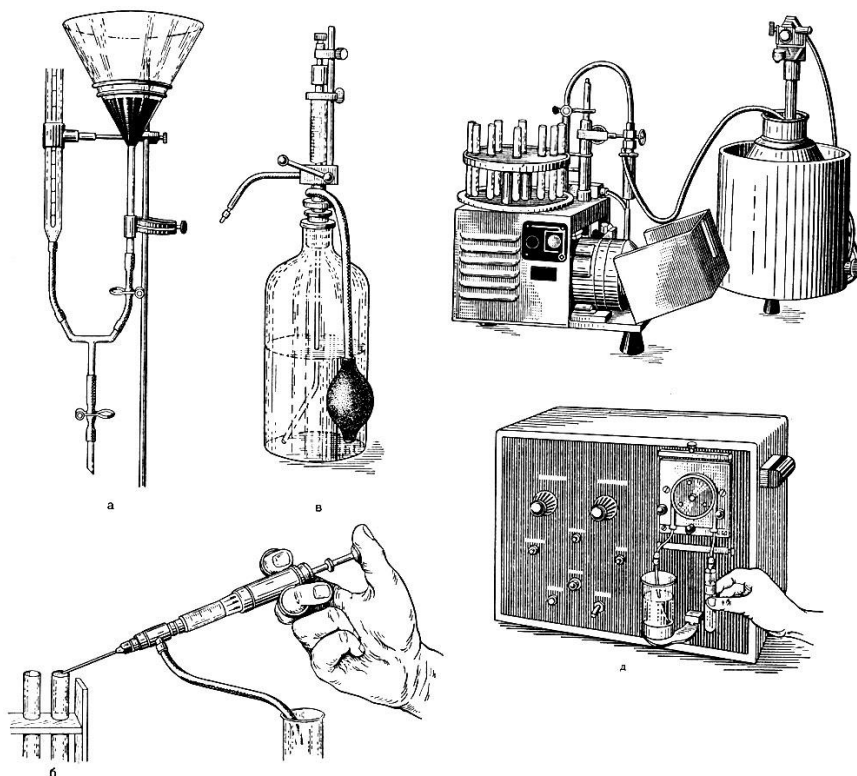


Рисунок 21 - Приспособления для мерного разлива сред: а - лабораторный монтаж; б - автоматический шприц-пипетка; в - дозатор; г - полуавтомат; д - автоматический дозатор

Посуду со средой обычно закрывают ватно-марлевыми пробками, поверх которых надевают бумажные колпачки. Важно, чтобы при разливе среда не смачивала края посуды, иначе к ним могут прилипнуть пробки. К каждому сосуду обязательно прикрепляют этикетку с названием среды и датой ее приготовления.

**Стерилизация.** Режим стерилизации зависит от состава среды и указан в ее рецепте. Примерная схема режима стерилизации сред приведена в таблице 12.

Таблица 12 - Режим стерилизации сред

Среды	Режим стерилизации		
	аппарат	температура, давление	время
Простые	Автоклав	120°С (1 атм)	20 мин
Сложные:	Автоклав с	100°С (текущий	30-60 мин 3 дня

1) с углеводами <sup>1</sup> , молоком, желатином	незакрытой крышкой или аппарат Коха	пар)	подряд (дробная стерилизация)
2) белковые (сывороточные или яичные) с уплотнением	Свертыватель Коха (возможны два режима)	80-85 <sup>0</sup> С	1 ч, 3 дня подряд
		95 <sup>0</sup> С	1 ч, однократно
3) белковые <sup>1</sup> жидкие	Водяная баня или инактиватор	58 <sup>0</sup> С	1 ч, 3-4 дня подряд

<sup>1</sup> (Жидкие среды с углеводами, белками или витаминами лучше стерилизовать с помощью бактериальных фильтров.)

**Контроль** готовых сред: а) для контроля стерильности среды ставят в термостат на 2 сут, после чего просматривают. Если на средах не появятся признаки роста, их считают стерильными и передают для химического контроля по несколько образцов каждой серии; б) химический контроль: окончательно устанавливают рН, содержание общего и аминного азота, пептона, хлоридов (их количество должно соответствовать указанному в рецепте).

Химический контроль сред производят в химической лаборатории; в) для биологического контроля несколько образцов среды засевают специально подобранными культурами микроорганизмов, и по их росту судят о питательных (ростовых) свойствах среды. К готовой среде прилагают этикетку и паспорт, в котором указывают название и состав среды, результаты контроля и др.

Хранят среды при комнатной температуре в шкафах, желательно специально для них предназначенных. Некоторые среды, например, среды с кровью и витаминами, хранят в холодильнике.

#### **Рецепты приготовления простых (основных) сред и изотонического раствора натрия хлорида**

**Изотонический раствор натрия хлорида.** К 1 л дистиллированной воды добавляют 9 г натрия хлорида. Раствор фильтруют, устанавливают заданный рН и, если нужно, стерилизуют при 120° С в течение 30 мин.

**Мясопептонный бульон (МПБ).** К мясной воде прибавляют 1% пептона и 0,5% х. ч. натрия хлорида, кипятят на слабом огне 10-15 мин для растворения веществ, устанавливают нужный рН и снова кипятят 30-40 мин до выпадения осадка. Фильтруют, доливают до первоначального объема водой и стерилизуют 20 мин при 120° С.

**Бульон Хоттингера.** Перевар Хоттингера разводят водой в 5-6 раз в зависимости от того, какое количество аминного азота он содержит и какое его количество должно быть в бульоне (указано в паспорте переваара и рецепте среды). Например, для приготовления среды с 1,2 г/л аминного азота переваар, содержащий 9,0 г/л, надо развести в 7,5 раз (9,0:1,2). К разведенному переваару прибавляют 0,5% натрия хлорида и кипятят на

слабом огне до растворения соли, В остывшей среде устанавливают рН, фильтруют, разливают и стерилизуют 20 мин.

**Мясопептонный агар (МПА).** К готовому бульону (до стерилизации или после нее) добавляют 2-3% измельченного агар-агара и кипятят, помешивая, на слабом огне до полного расплавления агара. МПА можно варить в автоклаве или аппарате Коха. Готовую среду, если нужно, осветляют, фильтруют и стерилизуют 20 мин при 120° С.

**Полужидкий агар содержит 0,4-0,5% агар-агара.**

**Питательный желатин.** К готовому бульону прибавляют 10-15% желатина, подогревают до его расплавления (не кипятят!), разливают в стерильную посуду и стерилизуют текучим паром.

**Рецепты приготовления сложных сред**

**Среды с углеводами.** К основному бульону или расплавленному агару прибавляют нужное количество (0,1-2%) определенного углевода (например, глюкозы). После его растворения разливают в стерильную посуду и стерилизуют текучим паром. Поскольку углеводы частично разрушаются даже при таком режиме стерилизации, предпочтительнее 25-30% раствор углеводов, простерилизованный через бактериальный фильтр, добавлять в нужном объеме с соблюдением асептики к стерильным основным средам - после контроля стерильности среда готова к употреблению.

**Среды с кровью** готовят из стерильных простых сред, добавляя в асептических условиях (лучше в боксе) от 3 до 30% (обычно 5%) стерильной дефибринированной крови. Агаровые среды перед этим растапливают и остужают до 45°С. Определяют температуру среды, поднося сосуд к шее у угла нижней челюсти. При нужной температуре должно быть терпимое ощущение горячего, но не ожога. После добавления крови, пока среда не застыла, содержимое сосуда тщательно перемешивают и разливают в чашки или пробирки.

*Внимание!* Среды с кровью растапливать нельзя - кровь изменит свои свойства.

**Среды с сывороткой крови** готовят так же, как среды с кровью. К основным средам добавляют 10-20% сыворотки, не содержащей консерванта и предварительно инактивированной при 56°С в течение 30 мин на водяной бане или в инактиваторе. При инаktivации разрушается вещество (комплемента), губительно действующее на микробы.

**Среды с желчью.** К простым средам добавляют желчь в количестве 10-40% объема среды, устанавливают нужный рН и стерилизуют 20 мин при 120° С. Можно стерильную желчь добавить к стерильной среде в асептических условиях.

**Разлив агаровых сред в чашки Петри.** Среды перед разливом расплавляют на водяной бане и остужают до 45-50° С. Обычно для чашки диаметром 9 см достаточно 15-20 мл среды (высота слоя 0,25-0,3 см). Если слой выше, на нем менее контрастно выглядят колонии. При очень тонком слое резко ограничено количество питательных веществ и влаги (среда быстро высыхает) - ухудшаются условия культивирования.

Разливают среды в стерильные чашки в асептических условиях. Чашки ставят крышкой вверх. Сосуд со средой берут в правую руку, держа его у огня.левой рукой вынимают пробку, зажав ее мизинцем и ладонью. Обжигают горлышко сосуда и двумя пальцами левой руки слегка приоткрывают крышку. Вводят под нее горлышко флакона, не прикасаясь им к краю чашки. Наливая среду, следят, чтобы она равномерно распределилась по дну чашки. Если при разливе на поверхности среды образуются пузырьки воздуха, к ним до того, как среда застынет, подносят пламя спички или горелки - пузырьки лопнут. Затем чашку закрывают и дают среде застыть. Если посев производят в день разлива, среду необходимо подсушить. Для этого чашки в термостате осторожно открывают и устанавливают крышки и чашки открытой стороной вниз на 20-30 мин. Если посев производят на следующий день после разлива, чашки, не подсушивая, завертывают в ту же бумагу, в которой их стерилизовали, и помещают в холодильник.

**Приготовление скошенного агара.** Пробирки с 4-5 мл стерильной расплавленной агаровой среды укладывают в наклонном положении (примерно под углом 20 °) с таким расчетом, чтобы среда не заходила за  $\frac{2}{3}$  пробирки, иначе она может смочить пробку. После того как среда застынет, пробирки ставят вертикально - дают стечь конденсату. Лучше употреблять свежескошенный агар.

*Внимание!* Пользоваться средой, в которой нет конденсата, нельзя. Ее следует снова растопить на водяной бане и скосить.

### **Сухие среды**

Отечественная промышленность выпускает сухие среды разного назначения: простые, элективные, дифференциально-диагностические, специальные. Это порошки во флаконах с завинчивающимися крышками. Хранят сухие среды в темном месте плотно закрытыми - они гигроскопичны. В лаборатории из порошков готовят среды по прописи на этикетке.

Преимущество сухих сред по сравнению со средами, изготовленными в лаборатории, - стандартность (их выпускают большими партиями), простота приготовления, делающая их доступными в любых (даже походных) условиях, стабильность, экономичность. Важно, что их можно готовить из заменителей мяса: гидролизата казеина, фибрина, кильки и даже белковых фракций микробных клеток (сарцин).

### **Методы посевов**

Важным этапом бактериологического исследования является посев. В зависимости от цели исследования, характера посевного материала и среды используют разные методы посева. Все они включают обязательную Цель: оградить посев от посторонних микробов. Поэтому работать следует быстро, но без резких движений, усиливающих колебания воздуха. Во время посевов нельзя разговаривать. Посевы лучше делать в боксе.

*Внимание!* Не забывайте выполнять правила личной безопасности при работе с заразным материалом.

**Посев из пробирки в пробирку.** Пробирку с посевным материалом и пробирку со средой держат слегка наклонно в левой руке между большим и

указательным пальцами так, чтобы края пробирок были на одном уровне, а их основания находились поверх кисти. Обычно пробирку с посевным материалом держат ближе к себе. В правой руке, как писчее перо, держат бактериальную петлю, и стерилизуют ее, держа вертикально в пламени горелки. Мизинцем и краем ладони правой руки вынимают обе пробки одновременно. Извлекают пробки не рывком, а плавно - легкими винтовыми движениями. Вынув пробки, края пробирок обжигают в пламени горелки. Прокаленную петлю вводят через пламя горелки в пробирку с посевным материалом, охлаждают и, набрав немного материала, осторожно переносят в пробирку со средой.

При посеве в жидкую среду посевной материал растирают на стенке пробирки над жидкостью и смывают средой.

При посеве на жидкие среды тампоном его погружают в среду и 3-5 с ополаскивают в ней. При посеве на плотную среду материал втирают в ее поверхность, вращая тампон, после чего тампон обеззараживают (помещают в пробирку, в которой он был доставлен в лабораторию, и автоклавируют).

*Внимание!* Следите, чтобы среда не вылилась и не смочила пробку.

При посеве на скошенный агар материал обычно растирают на поверхности среды зигзагообразными движениями снизу вверх, начиная от границы конденсата.

При посеве на плотные среды, разлитые в пробирки столбиком, петлей с посевным материалом прокалывают столбик, производя так называемый посев "уколом".

После посева петлю извлекают из пробирки, края пробирок обжигают и, проведя пробки через пламя горелки, закрывают пробирки, после чего прокалывают петлю.

Посев жидкого материала можно производить стерильными пипетками (пастеровскими или градуированными). После посева пипетки погружают в дезинфицирующую жидкость.

Посевы во флаконы, матрацы и бутылки производят примерно так, как в пробирки, только сначала набирают материал (петлей или в пипетку), а потом открывают сосуд со средой.

Сосуды с засеянной культурой надписывают и ставят в термостат.

**Посев на пробирки с чашки Петри.** Изучив характер роста культуры на чашке, со стороны дна отмечают восковым карандашом нужный для посева участок. Чашку с посевным материалом ставят перед собой крышкой вверх.левой рукой приоткрывают крышку и вводят под нее обожженную петлю. Остудив петлю, набирают посевной, материал с отмеченного участка. Вынимают петлю, закрывают чашку и в левую руку берут пробирку со средой. Посев производят так же, как с пробирки в пробирку. После посева чашку поворачивают вверх дном.

**Посев на агар в чашки Петри.** *Посев шпателем.* Шпатель - это стеклянная или металлическая трубочка, конец которой загнут в виде треугольника. Шпатель можно сделать из пастеровской пипетки, согнув под углом ее тонкий конец, предварительно разогретый в пламени горелки.

Левой рукой слегка приоткрывают крышку, держа ее большим и указательным пальцем. Петлей, пипеткой или стеклянной палочкой наносят на поверхность среды посевной материал, после чего тщательно втирают его круговыми движениями шпателя до тех пор, пока шпатель не перестанет свободно скользить по поверхности среды, левой рукой при этом придерживают крышку и одновременно вращают чашку. По окончании посева шпатель вынимают из чашки и закрывают крышку. Стеклянный шпатель помещают в дезинфицирующий раствор, а металлический прокалывают в пламени горелки.

*Посев петлей.* Небольшое количество посевного материала (иногда его предварительно эмульгируют в стерильном изотоническом растворе или бульоне) втирают петлей в поверхность среды у края чашки, несколько раз проводя петлей из стороны в сторону. Затем у того места, где закончились штрихи, агар прокалывают петлей, снимая избыток посевного материала. Оставшийся на петле посевной материал зигзагообразными движениями распределяют по всей поверхности среды. По окончании посева закрывают чашку и прожигают петлю.

*Посев петлей на секторы.* Чашку со стороны дна расчерчивают на секторы. Посев производят зигзагообразными движениями от края чашки к центру. Необходимо следить, чтобы штрихи не заходили на соседний сектор.

*Посев тампоном.* Тампон с посевным материалом вносят в слегка приоткрытую чашку и круговыми движениями втирают его содержимое в поверхность среды, вращая при этом тампон и чашку.

*Посев газоном.* Примерно 1 мл (20 капель) жидкой культуры (если культура с плотной среды, ее эмульгируют в стерильном изотоническом растворе или бульоне) наносят на поверхность агара и тщательно распределяют жидкость по поверхности среды. Чашку слегка наклоняют и пипеткой отсасывают избыток культуры, выливая ее в дезинфицирующий раствор. Туда же помещают пипетку.

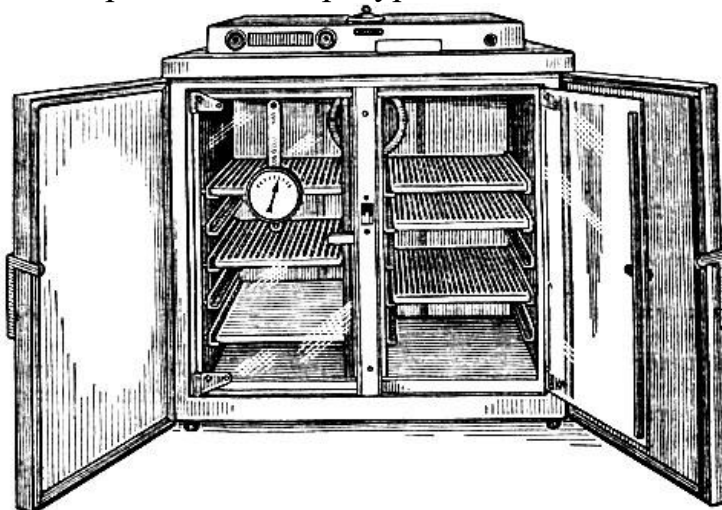
*Посев в толщу агара.* Культуру, выращенную на жидкой среде, или эмульгированный материал вносят в сосуд с расплавленным и остуженным до 45°C агаром, перемешивают и выливают в стерильную чашку Петри. Можно внести посевной материал в пустую чашку и залить 15-20 мл остуженного до 45°C агара. Для перемешивания содержимого чашки ее слегка покачивают и вращают. Чашки оставляют на столе до застывания среды.

Засеянные чашки подписывают со стороны дна и помещают в термостат дном вверх.

### **Методы культивирования**

Для успешного культивирования, помимо правильно подобранных сред и правильно произведенного посева, необходимы оптимальные условия: температура, влажность, аэрация (снабжение воздухом). Как правило, подходящие условия удается создать, тщательно воспроизведя условия природной обстановки.

**Температура.** Оптимальную температуру для культивирования большинства патогенных микроорганизмов (37°C) создают в термостате (рисунок 22). Это прибор с двойными стенками, между которыми находится воздух или вода, подогреваемые электричеством. Он снабжен терморегулятором, автоматически поддерживающим нужную температуру, и термометром для контроля за температурой.



*Рисунок 22 – Термостат*

Пробирки с посевами в штативах, проволочных сетках или банках устанавливают на полках термостата. Чашки в термостате должны стоять вверх дном. Чтобы воздух в термостате свободно циркулировал и нагрев был равномерным, полки в термостате делают с прорезями и плотно не загружают. Чтобы не охладить культуры, термостат не оставляют надолго открытым.

Лаборант обязан ежедневно регистрировать температуру в термостате и поддерживать чистоту в приборе, а при неисправности вызвать мастера.

**Свет** подавляющему большинству микробов (к ним относятся все патогенные) не нужен - их культивируют в темноте. Однако для изучения пигментообразования, которое происходит активнее на рассеянном свете, культуры после термостата выдерживают 2-3 дня при комнатном освещении.

*Внимание!* Следует избегать попадания прямых солнечных лучей, действующих на культуры губительно.

**Влажность.** Жизнь микробов невозможна без влаги - питательные вещества проникают в клетку только в растворенном виде. Это необходимо учитывать при культивировании на плотных средах: разливать их в чашки и скашивать в пробирках лучше в день посева. При культивировании микробов, особенно чувствительных к отсутствию влаги, например гонококков, в термостат ставят открытый сосуд с водой.

**Сроки культивирования.** Большинство патогенных микробов культивируют 18-24 ч, но есть виды, растущие медленно (до 4-6 нед). Чтобы сохранить в них влагу, ватные пробки после посева заменяют стерильными резиновыми или надевают на них резиновые колпачки.



*Внимание!* Резиновые пробки стерилизуют в автоклаве завернутыми в бумагу.

**Аэрация.** По потребности микробов в свободном кислороде их делят на аэробы и анаэробы. Обе группы требуют различных условий культивирования.

Поступление кислорода, необходимого для культивирования аэробов и факультативных анаэробов, осуществляется при пассивной и активной аэрации.

Пассивная аэрация - это культивирование на плотных и жидких средах в сосудах, закрытых ватными или ватно-марлевыми пробками, или в чашках Петри. При таком культивировании микробы потребляют кислород, растворенный в среде, находящийся в сосуде над средой и поступающий через пробку. Пассивно аэрируемые культуры можно выращивать на поверхности или в тонком слое среды, куда проникает кислород воздуха.

Активную аэрацию применяют при глубинном культивировании микробов, когда их выращивают в больших объемах среды. Чтобы достаточно снабдить кислородом такие культуры, их помещают в специальные качалки - постоянное перемешивание культуры обеспечивает соприкосновение ее с воздухом. При культивировании в объемах жидкости, достигающих десятков и сотен литров, проводимом в приборах, называемых реакторами или ферментерами, воздух продувают через культуру при помощи специальных устройств.

**Культивирование анаэробов** сложнее, чем аэробов, так как их необходимо лишить доступа свободного кислорода воздуха. Для этого удаляют воздух из питательной среды различными способами.

**Культивирование актиномицетов, грибов, микоплазм, L-форм, спирохет и простейших.** Культивирование этих микроорганизмов принципиально сходно с культивированием бактерий. Для них разработаны специальные среды и подобраны режимы, соответствующие их потребностям.

**Культивирование риккетсий и вирусов.** Риккетсии и вирусы являются облигатными паразитами, т. е. могут развиваться только в живых клетках. Их культивируют в культурах тканей, организме экспериментальных животных, развивающихся куриных эмбрионах.

#### **Методы выделения чистых культур микроорганизмов**

Чистой культурой называют скопление микробов одного вида на плотной или в жидкой питательной среде.

Существует ряд методов выделения чистой культуры в зависимости от свойств изучаемого материала и цели исследования. Обычно чистые культуры получают из изолированных колоний - обособленных скоплений микробов на плотной среде. Считают, что чаще всего колония развивается из одной микробной клетки, т. е. является чистой культурой этого микроорганизма.

#### **Этапы выделения чистой культуры:**

1-й день - получение изолированных колоний. Каплю исследуемого материала петлей, пипеткой или стеклянной палочкой наносят на поверхность агара в чашке Петри. Шпателем втирают материал в поверхность среды; не прожигая и не перевертывая шпателя, производят посев на 2-й, а затем на 3-й чашке. При таком посеве на 1-ю чашку приходится много материала и соответственно много микробов, на 2-ю меньше и на 3-ю еще меньше.

Можно получить изолированные колонии при посеве петлей. Для этого исследуемый материал эмульгируют в бульоне или изотоническом растворе натрия хлорида.

2-й день - изучают рост микробов на чашках. В 1-й чашке обычно бывает сплошной рост - выделить изолированную колонию не удастся. На поверхности агара во 2-й и 3-й чашке вырастают изолированные колонии. Их изучают невооруженным глазом, с помощью лупы, при малом увеличении микроскопа и иногда в стереоскопическом микроскопе. Нужную колонию отмечают со стороны дна чашки и пересевают на скошенный агар. Посевы ставят в термостат.

*Внимание!* Пересевать можно только изолированные колонии.

3-й день - изучают характер роста на скошенном агаре. Делают мазок, окрашивают его и, убедившись в том, что культура чистая, приступают к ее изучению. На этом выделение чистой культуры заканчивается. Выделенная из определенного источника и изученная культура, называется штаммом.

При выделении чистой культуры из крови (гемокультуры) ее предварительно "подращивают" в жидкой среде: 10-15 мл стерильно взятой крови засевают в 100-150 мл жидкой среды. Так поступают потому, что в крови обычно мало микробов. Соотношение засеваемой крови и питательной среды 1:10 не случайно - так достигается разведение крови (неразведенная кровь губительно действует на микроорганизмы). Колбы с посевом ставят в термостат. Через сутки (иногда через большее время в зависимости от выделяемой культуры) из содержимого колб делают высевы на чашки для получения изолированных колоний. При необходимости повторяют высевы с интервалами 2-3 дня.

При выделении чистой культуры из мочи, промывных вод желудка и других жидкостей их предварительно центрифугируют в асептических условиях и засевают осадок. Дальнейшее выделение чистой культуры производят обычным способом.

Для выделения чистой культуры широко применяют элективные среды.

В ряде методов для получения чистых культур используют биологические особенности выделяемого микроба. Например, при выделении спорообразующих бактерий посевы прогревают при 80°C 10 мин, убивая этим вегетативные формы; при выделении возбудителя туберкулеза, устойчивого к кислотам и щелочам, с помощью этих веществ посевной материал освобождают от сопутствующей флоры; для выделения пневмококка и палочки чумы исследуемый материал вводят белым мышам -

в их организме, высокочувствительном к данным возбудителям, эти микробы размножаются быстрее других.

В научно-исследовательской работе, особенно при генетических исследованиях, необходимо получать культуры заведомо из одной клетки. Такая культура называется клон. Для ее получения чаще всего пользуются микроманипулятором - прибором, снабженным инструментами (иглами, пипетками) микроскопических размеров. С помощью держателя под контролем микроскопа их вводят в препарат "висячая капля", извлекают нужную клетку (одну) и переносят ее в питательную среду.

#### **2.4.2 Изучение выделенных культур**

Изучение морфологии, подвижности, тинкториальных свойств, характера роста на средах (культуральные свойства), ферментативной активности и ряда других особенностей выделенного микроба позволяет установить его таксономическое положение, т. е. классифицировать микроорганизм: определить его род, вид, тип, подтип, разновидность. Это называется идентификацией. Идентификация микроорганизмов очень важна при диагностике инфекций, установлении источников и путей ее передачи и в ряде других научно-практических исследований.

##### **Культуральные свойства**

Разные виды микроорганизмов по-разному растут на средах. Эти различия служат для их дифференциации. Одни хорошо растут на простых средах, другие - требовательны и растут только на специальных. Микроорганизмы могут давать обильный (пышный) рост, умеренный или скудный. Культуры могут быть бесцветными, сероватыми, серо-голубыми. Культуры микроорганизмов, образующих пигмент, имеют разнообразную окраску: белую, желтую или золотистую у стафилококка, красную - у чудесной палочки, сине-зеленую - у сине-зеленой палочки, пигмент которой, растворимый в воде, окрашивает не только колонии, но и среду.

**На плотных средах** микроорганизмы в зависимости от количества посевного материала образуют или сплошной налет ("газон"), или изолированные колонии. Культуры бывают грубые и нежные, прозрачные и непрозрачные, с поверхностью матовой, блестящей, гладкой, шероховатой, сухой, бугристой.

Колонии могут быть крупные (4-5 мм в диаметре и больше), средние (2-4 мм), мелкие (1-2 мм) и карликовые (меньше 1 мм). Они различаются по форме, расположению на поверхности среды (выпуклые, плоские, куполообразные, вдавленные, круглые, розеткообразные), форме краев (ровные, волнистые, изрезанные).

**В жидких средах** микроорганизмы могут образовывать равномерную муть, давать осадок (зернистый, пылевидный, хлопьевидный) или пленку (нежную, грубую, морщинистую).

**На полужидких** средах при посеве уколом подвижные микробы вызывают помутнение толщи среды, неподвижные - растут только по "уколу", оставляя остальную среду прозрачной.

Культуральные свойства определяют, изучая характер роста культуры простым глазом, с помощью лупы, под малым увеличением микроскопа или пользуясь стереоскопическим микроскопом. Величину и форму колоний, форму краев и прозрачность изучают в проходящем свете, рассматривая чашки со стороны дна. В отраженном свете (со стороны крышки) определяют характер поверхности, окраску. Консистенцию определяют прикосновением петли.

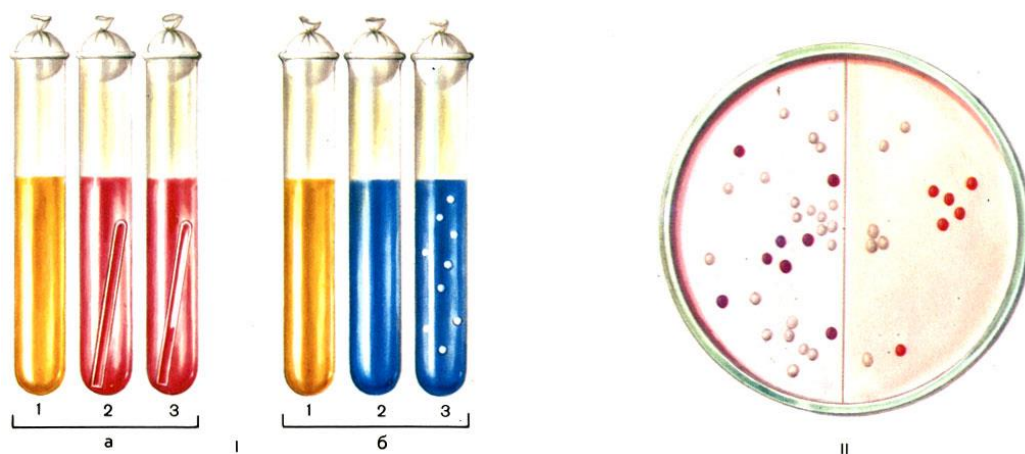
### **Морфологические свойства**

Изучение морфологии микробов тоже служит для их дифференциации. Морфологию изучают в окрашенных препаратах. Устанавливают форму и величину клеток, их расположение в препарате, наличие спор, капсул, жгутиков. В окрашенных препаратах определяют отношение микробов к краскам (тинкториальные свойства) - хорошо или плохо воспринимают краски, как относятся к дифференциальным окраскам (в какой цвет окрашивается по Граму, Цилю - Нильсену и др.). Витальная (прижизненная) окраска позволяет установить подвижность, дифференцировать живые и мертвые клетки, следить за их делением. Деление и подвижность можно изучать в нативных (неокрашенных) препаратах.

### **Ферментативная активность**

Ферментативная активность микроорганизмов богата и разнообразна. По ней можно установить не только видовую и типовую принадлежность микроба, но и определить его варианты (так называемые биовары). Рассмотрим основные ферментативные свойства и их качественное определение.

**Расщепление углеводов** (сахаролитическая активность), т. е. способность расщеплять сахара и многоатомные спирты с образованием кислоты или кислоты и газа, изучают на средах Гисса, которые содержат тот или иной углевод и индикатор. Под действием образующейся при расщеплении углевода кислоты индикатор изменяет окраску среды. Поэтому эти среды названы "пестрый ряд". Микробы, не ферментирующие данный углевод, растут на среде, не изменяя ее. Наличие газа устанавливают по образованию пузырьков в средах с агаром или по скоплению его в "поплавке" на жидких средах. "Поплавок" - узкая стеклянная трубочка с запаянным концом, обращенным вверх, которую до стерилизации помещают в пробирку со средой (рисунок 23).



*Рисунок 23 - Изучение сахаролитической активности микроорганизмов. I – «пестрый ряд»: а - жидкая среда с углеводами и индикатором Андрее; б - полужидкая среда с индикатором ВР: 1 - микроорганизмы не ферментируют углевод; 2 - микроорганизмы ферментируют углевод с образованием кислоты; 3 - микроорганизмы ферментируют углевод с образованием кислоты и газа; II - колонии микроорганизмов, не разлагающих (бесцветные) и разлагающих лактозу (фиолетовые на среде ЭМС - слева, красные на среде Эндо - справа)*

Кроме того, сахаролитическую активность изучают на средах Эндо, ЭМС, Плоскирева. Микроорганизмы, сбраживая до кислоты находящийся в этих средах молочный сахар (лактозу), образуют окрашенные колонии - кислота изменяет цвет имеющегося в среде индикатора. Колонии микробов, не ферментирующих лактозу, бесцветны (см. рис. 23).

Молоко при росте микробов, сбраживающих лактозу, свертывается.

При росте микроорганизмов, образующих амилазу, на средах с растворимым крахмалом происходит его расщепление. Об этом узнают, прибавив к культуре несколько капель раствора Люголя - цвет среды не изменяется. Нерасщепленный крахмал дает с этим раствором синее окрашивание.

**Протеолитические свойства** (т. е. способность расщеплять белки, полипептиды и т. п.) изучают на средах с желатином, молоком, сывороткой, пептоном. При росте на желатиновой среде микробов, ферментирующих желатин, среда разжижается. Характер разжижения, вызываемый разными микробами, различен. Микробы, расщепляющие казеин (молочный белок), вызывают пептонизацию молока - оно приобретает вид молочной сыворотки. При расщеплении пептонов могут выделяться индол, сероводород, аммиак. Их образование устанавливают с помощью индикаторных бумажек. Фильтровальную бумагу заранее пропитывают определенными растворами, высушивают, нарезают узенькими полосками длиной 5-6 см и после посева культуры на МПБ помещают под пробку между нею и стенкой пробирки. После инкубации в термостате учитывают результат. Аммиак вызывает

посинение лакмусовой бумажки; при выделении сероводорода на бумажке, пропитанной 20% раствором свинца ацетата и натрия гидрокарбоната, происходит образование свинца сульфата - бумажка чернеет; индол вызывает покраснение бумажки, пропитанной раствором щавелевой кислоты.

Помимо указанных сред, способность микроорганизмов расщеплять различные питательные субстраты определяют с помощью бумажных дисков, пропитанных определенными реактивами (системы индикаторные бумажные "СИБ"). Эти диски опускают в пробирки с исследуемой культурой и уже через 3 ч инкубации в термостате при 37°C по изменению цвета дисков судят о разложении углеводов, аминокислот, белков и т. д.

Гемолитические свойства (способность разрушать эритроциты) изучают на средах с кровью. Жидкие среды при этом становятся прозрачными, а на плотных средах вокруг колонии появляется прозрачная зона (рисунок 24). При образовании метгемоглобина среда зеленеет.



*Рисунок 24 - Гемолиз вокруг колоний, растущих на агаре с кровью*

### **Сохранение культур**

Выделенные и изученные культуры (штаммы), представляющие ценность для науки или производства, хранят в музеях живых культур. Общесоюзный музей находится в Государственном НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича (ГИСК).

Задача хранения - поддержать жизнеспособность микроорганизмов и предупредить их изменчивость. Для этого надо ослабить или прекратить обмен в микробной клетке.

Один из самых совершенных методов длительного сохранения культур - лиофилизация - высушивание в вакууме из замороженного состояния позволяет создать состояние анабиоза. Высушивание проводят в специальных аппаратах. Хранят культуры в запаянных ампулах при температуре 4°C, лучше при -30-70° С.

**Восстановление высушенных культур.** Сильно нагревают кончик ампулы в пламени горелки и прикасаются к нему ватным тампоном,

слегка<sup>1</sup> смоченным холодной водой, чтобы на стекле образовались микротрещины, через которые воздух медленно просочится внутрь ампулы. При этом, проходя через разогретые края трещин, воздух стерилизуется.

*Внимание!* Не забывайте, что в запаянной ампуле вакуум. Если воздух в нее попадает сразу через большое отверстие, может распылиться находящаяся в ампуле культура и произойти ее выброс.

Дав войти воздуху, быстро пинцетом надламывают и удаляют верхушку ампулы. Слегка обжигают отверстие и стерильной пастеровской пипеткой или шприцем вносят в ампулу растворитель (бульон или изотонический раствор). Перемешивают содержимое ампулы и засевают на среды. Рост восстановленных культур в первых посевах может быть замедлен.

Длительно сохранять культуры можно также в жидком азоте (-196° С) в специальных приборах.

Методы непродолжительного сохранения культур следующие:

1) субкультивирование (периодические пересевы на свежие среды) с интервалами, зависящими от свойств микроорганизма, среды и условий культивирования. Между пересевами культуры хранят при 4°С;

2) сохранение под слоем масла. Культуру выращивают в агаре столбиком высотой 5-6 см, заливают стерильным вазелиновым маслом (слой масла примерно 2 см) и хранят вертикально в холодильнике. Сроки хранения у разных микроорганизмов разные, поэтому из пробирок периодически высевают культуру, чтобы проверить ее жизнеспособность;

3) хранение при -20-70°С;

4) хранение в запаянных пробирках. По мере надобности сохраняемый материал высевают на свежую среду.

### **Контрольные вопросы:**

1. К какому типу метаболитов растений относятся алкалоиды?
2. Какие химические структуры наиболее технологично получать с помощью растительных продуцентов?
3. Назовите основные биотехнологические формы растительных продуцентов;
4. Назовите основные причины необходимости разработки биотехнологических растительных продуцентов?
5. Каким требованиям должны удовлетворять питательные среды?
6. Как классифицируют среды по исходным компонентам?
7. Какие вещества служат для уплотнения сред?
8. Какие среды являются простыми или общеупотребительными и для чего их применяют?
9. Какие среды называют сложными, что служит их основой?

---

<sup>1</sup> При избытке воды на тампоне она может попасть в ампулу и нарушить стерильность культуры: ее засосет через образовавшиеся микротрещины, так как в ампуле вакуум

10. Какие среды позволяют получить преимущественный рост одних микробов при одновременном подавлении других?
11. На каких средах изучают ферментативную активность микробов?
12. Каким должен быть рН сред для культивирования большинства патогенных микробов перед стерилизацией и почему?
13. При какой температуре плавятся и застывают агаровые среды?
14. Как должна быть подготовлена посуда, в которую разливают среды с углеводами и белками?
15. Нужны ли асептические условия во время посева? Обоснуйте ответ.
16. Как нужно обработать рабочее место по окончании посевов?
17. Что входит в понятие "бактериологическое исследование"?
18. Какой должна быть культура для такого исследования?
19. Что такое колония микробов, культура, штамм, клон?
20. Что входит в понятие "культуральные свойства микробов"?



### 3. АППАРАТУРА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

#### 3.1 Аппаратура для реализации биотехнологических процессов и получения конечного продукта.

Типы ферментационных аппаратов, применяемых в анаэробных и аэробных процессах ферментации (поверхностное культивирование, глубинное, гомогенное проточное и периодическое).

Вопросами технического обеспечения биотехнологических процессов занимается биоинженерия. Для различных процессов существует огромное разнообразие аппаратуры: собственно для процесса ферментации, а также для выделения и получения готового продукта. Наиболее сложна и специфична аппаратура для ферментационной стадии. Технически наиболее сложным процессом ферментации является аэробный глубинный стерильный и непрерывный (или с подпиткой субстратом). Аппараты для поверхностной и анаэробной ферментации менее сложны и энергоемки. В современной литературе описаны сотни биореакторов, отличающихся по конструкции, принципу работы и размерам (от нескольких литров до нескольких тысяч кубометров). Многочисленность методов культивирования, чрезвычайное многообразие используемых биологических агентов привели к огромному разнообразию конструктивных решений, которые зависят от ряда факторов: типа продуцента и среды, технологии и масштабов производства, а также целевого продукта и пр. Техническое оснащение биотехнологии базируется на общих положениях технической биохимии и пищевой технологии, однако имеет свою специфику.

Принципиальное отличие биотехнологических процессов от чисто химических заключается в следующем:

- чувствительность биологических агентов к физико-механическим воздействиям;
- наличие межфазового переноса веществ (по типу «жидкость – клетки», «газ – жидкость – клетки»);
- требования условий асептики;
- низкие скорости протекания многих процессов в целом;
- нестабильность целевых продуктов;
- пенообразование;
- сложность механизмов регуляции роста и биосинтеза.

Рассмотрим некоторые типы ферментационных аппаратов. Аппараты для анаэробных процессов достаточно просты и применяются в процессах конверсии растительного сырья, в том числе растительных отходов, а также различных промышленных отходов. При метановом брожении для получения биогаза, а также в ряде других процессов (получение ацетона, шампанских вин) используют ферментационные аппараты (метанотенки). Эти аппараты имеют различную конструкцию (от простой выгребной ямы до сложных металлических конструкций или железобетонных сооружений) и объемы (от нескольких до сотен кубометров). Метановые установки оборудованы

системой подачи сырья, системой теплообменных труб для стабилизации температуры, несложным перемешивающим устройством для гомогенного распределения сырья и биомассы продуцента, газовым колпаком и устройством переменного объема (газгольдер) для сбора образуемого биогаза.

К настоящему времени разработано и применяется огромное количество разнообразнейших перемешивающих и аэрирующих устройств, и классифицировать их практически невозможно. Классификация ферментационных аппаратов для аэробной глубинной ферментации по подводу энергии для перемешивания (таблица 13). Согласно этой классификации аппараты такого типа делятся на три группы по подводу энергии:

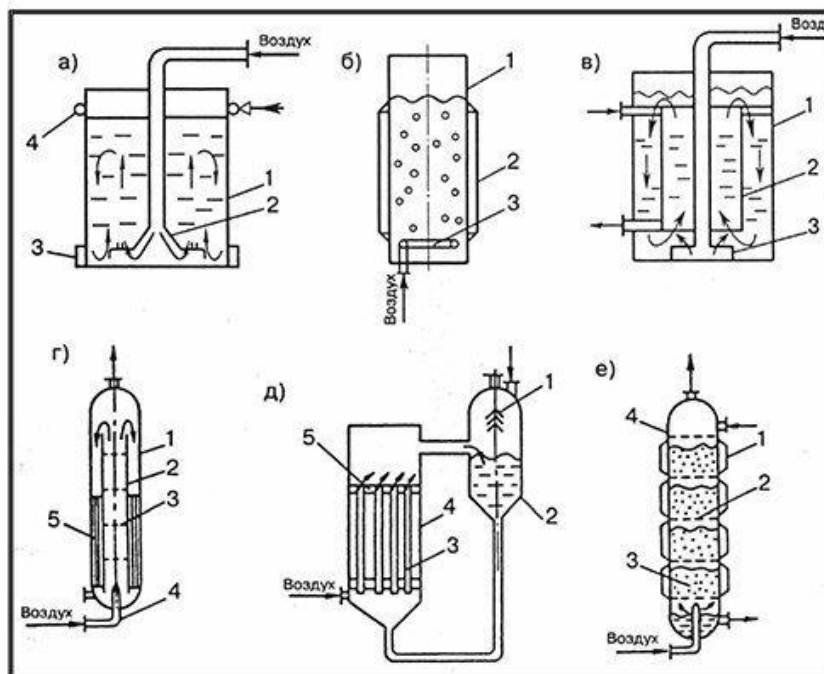
- 1 - к газовой фазе (ФГ),
- 2 - к жидкой фазе (ФЖ),
- 3 - комбинированный подвод (ФЖГ).

Таблица 13 - Классификация ферментаторов по способу ввода энергии

Ферментаторы	Характеристика конструкции аппарата	Тип аппарата
ФГ с подводом энергии газовой фазой	Простота конструктивного оформления и высокая надежность в связи с отсутствием движущихся узлов и деталей	Барботажный, барботажно-эрлифтный, колоночный (колонный), форсуночный
ФЖ с подводом энергии жидкой фазой	Обычно энергия передается жидкой фазе самовсасывающейся мешалкой или насосом	Эжекционный, с циркуляционным контуром, с всасывающей мешалкой
ФЖГ (комбинированные)	Основным конструктивным элементом является перемешивающее устройство, обеспечивающее высокую интенсивность растворения кислорода и высокую степень диспергирования газа. В то же время энергия газовой фазой выводится обычным способом	Барботажный с механическим перемешиванием

Ферментаторы с подводом энергии к газовой фазе (рисунок 25). Их общий признак - подвод энергии в аппарат через газовую фазу, которая является ее носителем. Ферментаторы характеризуются достаточно простой конструкцией (отсутствуют трущиеся, движущиеся узлы), высокой эксплуатационной надежностью, но имеют не очень высокие массообменные характеристики (коэффициент массопередачи кислорода менее 4 кг/м<sup>3</sup>·ч). Данные аппараты представляют собой вертикальную емкость, снабженную газораспределительным устройством одного из известных типов.

**Для справки:** Показателем работы системы подачи воздуха аппарата для культивирования микроорганизмов может служить величина объемного коэффициента массопередачи  $K$ . Коэффициент характеризует количество кислорода в 1 мг, передаваемое 1 мл жидкой среды за 1 ч (при разности равновесной и рабочей концентраций его в среде 1 мг/мл. Измеренные величины  $K$  у ферментеров глубинных культур различных микроорганизмов колеблются в пределах 429—5720 мг/(мл·ч) (Герольд и др., 1966).



*Рисунок 25 - Ферментаторы с подводом энергии газовой фазой (группа ФГ)*

*а - барботажный: 1-корпус, 2-воздухораспределитель, 3-карман, 4-коллектор;*

*б - барботажно-колонный: 1- корпус, 2 - рубашка, 3-воздухораспределитель;*

*в - барботажно-эрлифтный: 1-корпус, 2-диффузор-теплообменник, 3-воздухораспределитель;*

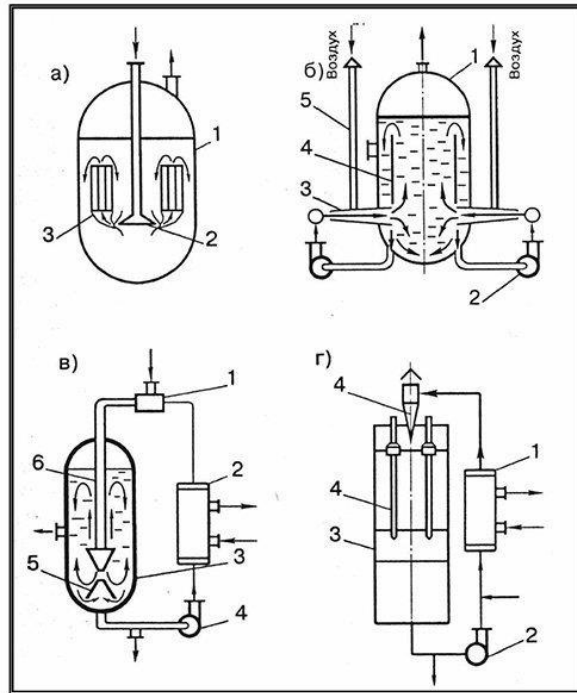
*г - газлифтный: 1-корпус, 2- диффузор, 3-диспергатор, 4-воздухораспределитель, 5-теплообменник;*

*д - трубчатый: 1-пеногаситель, 2-емкость, 3-трубы, 4-корпус, 5-распределительная перегородка;*

*е) аппарат с плавающей насадкой: 1-рубашка, 2-тарелка, 3- насадка, 4-корпус*

Барботажный - газораспределительное устройство данного типа обычно устанавливается в нижней части аппарата; подаваемый сверху через распределительную трубу воздух, пройдя через барботер, насыщает кислородом толщу среды. Коэффициент массопереноса кислорода невысок, 1-2 кг/м<sup>3</sup>·ч.

Барботажно-колонный - в нижней части корпуса такого аппарата устанавливается перфорированная пластина с диаметром отверстий 0,0005 м или сопловой эжектор с диаметром сопла 0,004 м. Барботажно-эрлифтный аппарат характеризуется наличием внутри одного или нескольких диффузоров («стаканов») или нескольких перегородок для принудительного разделения восходящих и нисходящих потоков циркулирующей жидкости; эти элементы расположены равномерно по сечению аппарата или концентрично. Газлифтный колонный ферментатор состоит из двух колонн разного диаметра, соединенных между собой; одна представляет собой барботажную колонну с восходящим потоком воздуха, другая - циркуляционную с нисходящим потоком. Воздух вводится в нижнюю зону аппарата, в барботажную колонну; камера, соединяющая колонны в верхней части аппарата, образует большую поверхность контакта фаз. Трубчатый аппарат сконструирован по типу теплообменных труб; взаимодействие газа в трубе при высоких скоростях продувки более интенсивное, чем в большом объеме, поэтому массообмен интенсивнее. Аппарат с плавающей насадкой позволяет интенсифицировать массообмен за счет увеличения поверхности контакта фаз и турбулизации жидкости при работе с большими скоростями подачи газовой и жидкой фаз. В аппарат введены секционные элементы в виде решеток, оборудованных лопастной насадкой; в центре аппарата находится труба, через которую вводится воздух, а жидкая фаза поступает противотоком сверху. Газ, поступая в лопастную насадку, сделанную обычно из полиэтилена, вращает ее; это существенно увеличивает поверхность контакта газовой и жидкой фаз. Ферментаторы с вводом энергии жидкой фазой (рисунок 26) наиболее сложны по конструкции и энергоемки, но обеспечивают более высокие по сравнению с группой ферментаторов ФГ значения коэффициента массопередачи кислорода, свыше 6 кг/м<sup>3</sup>·ч. В данных аппаратах ввод энергии осуществляется жидкой фазой, обычно самовсасывающими мешалками или насосами; в последнем варианте жидкость вводится в аппарат через специальное устройство (сопло, эжектор, диспергатор). Данные аппараты также можно подразделить на ряд типов.



*Рисунок 26 - Ферментаторы с вводом энергии жидкой фазой (группа ФЖ)*

*а - с самовсасывающей мешалкой: 1-корпус, 2-мешалка, 3-циркуляционный контур-обменник;*

*б - эжекционный: 1-корпус, 2-насос, 3-эжектор, 4-диффузор-теплообменник, 5-воздухозаборник;*

*в - струйный с затопленной струей: 1- эжектор, 2-теплообменник, 3-корпус, 4-насос, 5-рассекатель, 6-труба с насадкой;*

*г - струйный с падающей струей: 1- теплообменник, 2-насос, 3-корпус, 4-эжектор*

Ферментаторы с самовсасывающими мешалками не требуют специальных воздуходувных машин, так как поступление в них воздуха происходит в результате разрежения в воздушной камере мешалки, соединенной с воздухопроводом и с жидкостью, отбрасываемой лопатками мешалки. В эжекционных ферментаторах возможна рециркуляция газовой фазы, что экономит субстрат, однако требуется наличие специальных насосов для перекачки газосодержащей культуральной среды. Применение эжекционного ввода газовых субстратов в ферментатор может интенсифицировать массообмен на порядок. Струйные ферментаторы (с затопленной или падающей струей) оборудуются мощными насосами, которые забирают культуральную жидкость из нижней части аппарата и через напорный трубопровод подводят поток к аэрирующему устройству (по типу шахтного перепада или напорно-струйные). Струя жидкости под давлением свободно падает сверху и пронизывает аэрируемую жидкость до дна аппарата. Происходят интенсивная турбулизация и перемешивание жидкости. Внизу жидкость вновь засасывается насосом и снова подается

вверх аппарата, т. е. возникает замкнутый контур циркуляции. Недостатком данных аппаратов являются потери энергии при перекачке жидкости, трудности проектирования в связи с отсутствием надежных методик расчета конструкций и режимов работы струйных и эжекционных устройств. Третья группа аппаратов - с подводом энергии газовой и жидкой фазы (группа ФЖГ). Основными их конструкционными элементами являются перемешивающие устройства всех известных типов, а также наличие в совокупности насосов и перемешивающих устройств. Это могут быть аппараты с группой самовсасывающих мешалок и насосом для перекачивания культуральной жидкости и другие сочетания перемешивающих и аэрирующих устройств. Коэффициент массопереноса кислорода в таких ферментаторах может в принципе иметь любой из известных значений. Ферментаторы периодического действия из групп ФЖГ применяют с 1944 г. в промышленности для получения антибиотиков, витаминов и других биологически активных веществ. Их конструкции обеспечивают стерильность ферментации в течение длительного времени (нескольких суток) при оптимальных условиях для роста и жизнедеятельности продуцента. Прогресс в области получения клеточных и рекомбинантных культур выдвигает специальные требования к биореакторам. При этом на первый план выдвигаются такие показатели, как стабильность биологических агентов, повышенные требования к асептике, лимитация средовых условий при перемешивании и др.

Конструкция аппаратов для аэробной ферментации определяется типом ферментации и сырья. Аппараты для аэробной поверхностной ферментации, широко применяемые для производства органических кислот и ферментов, достаточно просты по конструкции и, соответственно, подразделяются на жидкофазные и твердофазные. Поверхностная жидкофазная ферментация протекает в так называемых бродильных вентилируемых камерах, в которых на стеллажах размещены плоские металлические кюветы. В кюветы наливают жидкую питательную среду, высота слоя составляет 80–150 мм, затем с потоком подаваемого воздуха среду инокулируют спорами продуцента. В камере стабилизируется влажность, температура и скорость подачи воздуха.

После завершения процесса культуральная жидкость сливается из кювет через вмонтированные в днища штуцера и поступает на обработку. При твердофазной ферментации процесс также протекает в вентилируемых камерах, но вместо кювет на стеллажах размещают лотки, в которые насыпают сыпучую твердую среду слоем 10–15 мм. Для лучшей аэрации среды подаваемый в камеру воздух проходит через перфорированное днище лотков.

Аппараты для аэробной глубинной ферментации наиболее сложны как конструкционно, так и с точки зрения их эксплуатации. Главная задача, возникающая при их конструировании, – обеспечение высокой интенсивности массо- и энергообмена клеток со средой. Массообмен определяется транспортом (переносом) кислорода и других биогенных

элементов из среды в микробную клетку и отводом из нее продуктов обмена. Главным показателем массообменных характеристик ферментера служит коэффициент массопередачи кислорода, так как кислород является основным лимитирующим фактором аэробных ферментационных процессов. Расход кислорода на образование 1 кг биомассы в зависимости от типа углеродсодержащего сырья и степени его восстановленности может составлять от 0,75 до 5,00 кг. Клетки способны утилизировать кислород только в растворенном виде, поэтому необходимо постоянно поддерживать его концентрацию в культуре на уровне, оптимальном для конкретного продуцента. При этом скорость поступления кислорода к клеткам должна превышать скорость его включения в клетки, и в околклеточном пространстве не должно возникать так называемых концентрационных ям. Кроме этого, концентрация клеток и растворенного субстрата должны быть равномерными по всему объему ферментера. Поэтому перемешивание является также одним из основных факторов, обеспечивающих требуемую гидродинамическую обстановку в аппарате. При интенсивном перемешивании пузырьки воздуха дробятся в аппарате и, диспергируясь, увеличивают площадь контакта фаз «среда-клетка». Однако чрезмерное перемешивание может вызвать механическое повреждение биологических объектов.

К настоящему времени разработано и применяется огромное количество разнообразнейших перемешивающих и аэрирующих устройств, и классифицировать их практически невозможно. Наиболее удачна, по нашему мнению, попытка классификации ферментационных аппаратов для аэробной глубинной ферментации по подводу энергии (Виестур и др., 1986; 1987). Согласно этой классификации, аппараты такого типа делятся на три группы по подводу энергии: 1) с газовой фазой, 2) с жидкой фазой, 3) с комбинированным подводом.

***Ферментеры с подводом энергии к газовой фазе (группа ФГ).*** Их общий признак – подвод энергии в аппарат через газовую фазу, которая является ее носителем. Ферментеры характеризуются достаточно простой конструкцией (отсутствуют трущиеся, движущиеся узлы), высокой эксплуатационной надежностью, но имеют не очень высокие массообменные характеристики (коэффициент массопередачи кислорода менее  $4 \text{ кг/м}^3$ ).

Данные аппараты представляют собой вертикальную емкость, снабженную газо-распределительным устройством одного из известных типов. Барботажные газораспределительные устройства обычно устанавливаются в нижней части аппарата. Подаваемый сверху через распределительную трубу воздух, пройдя через барботер, насыщает кислородом толщу среды. Коэффициент массопереноса кислорода невысок,  $1\text{--}2 \text{ кг/м}^3\text{-ч}$ ; барботажно-колонный – в нижней части корпуса такого аппарата устанавливается перфорированная пластина с диаметром отверстий  $0,0005 \text{ м}$  или сопловой эжектор с диаметром сопла  $0,004 \text{ м}$ ; барботажно-эрлифтный аппарат характеризуется наличием внутри одного или нескольких диффузоров («стаканов») или нескольких перегородок для принудительного

разделения восходящих и нисходящих потоков циркулирующей жидкости; эти элементы расположены равномерно по сечению аппарата или концентрично; газлифтный колонный ферментер состоит из двух колонн разного диаметра, соединенных между собой; одна представляет собой барботажную колонну с восходящим потоком воздуха, другая – циркуляционная, с нисходящим потоком.

Воздух вводится в нижнюю зону аппарата в барботажную колонну; камера, соединяющая колонны в верхней части аппарата, образует большую поверхность контакта фаз; трубчатый аппарат сконструирован по типу теплообменных труб; взаимодействие газа в трубе при высоких скоростях продувки более интенсивное, чем в большом объеме, поэтому массообмен интенсивнее; аппарат с плавающей насадкой позволяет интенсифицировать массообмен за счет увеличения поверхности контакта фаз и турбулизации жидкости при работе с большими скоростями подачи газовой и жидкой фаз. В аппарат введены секционные элементы в виде решеток, оборудованных лопастной насадкой; в центре аппарата находится труба, через которую вводится воздух, а жидкая фаза поступает противотоком сверху. Газ, поступая на лопастную насадку, обычно из полиэтилена, вращает ее; это существенно увеличивает поверхность контакта газовой и жидкой фаз.

**Ферментеры с вводом энергии жидкой фазой (группа ФЖ)** наиболее сложны по конструкции и энергоемки, но обеспечивают наиболее высокие по сравнению с группой ферментеров ГФ значения коэффициента массопередачи кислорода, свыше  $6 \text{ кг/м}^3 \cdot \text{ч}$ . В данных аппаратах ввод энергии осуществляется жидкой фазой, обычно самовсасывающими мешалками или насосами; в последнем варианте жидкость вводится в аппарат через специальное устройство (сопло, эжектор, диспергатор).

Данные аппараты также можно подразделить на ряд типов: ферментеры с самовсасывающими мешалками не требуют специальных воздухоподводящих машин, так как поступление в них воздуха происходит в результате разрежения в воздушной камере мешалки, соединенной с воздухопроводом и с жидкостью, отбрасываемой лопатками мешалки; в эжекционных ферментерах возможна рециркуляция газовой фазы, что экономит субстрат, однако требуется наличие специальных насосов для перекачки газосодержащей культуральной среды. Применение эжекционного ввода газовых субстратов в ферментер может интенсифицировать массообмен на порядок; струйные ферментеры (с затопленной или падающей струей) оборудуются мощными насосами, которые забирают культуральную жидкость из нижней части аппарата и через напорный трубопровод подводят поток к аэрирующему устройству (по типу шахтного перепада или напорно-струйные). Струя жидкости под давлением свободно падает сверху и пронизывает аэрируемую жидкость до дна аппарата. Происходят интенсивные турбулизация и перемешивание жидкости. Внизу жидкость вновь засасывается насосом и снова подается вверх аппарата, то есть возникает замкнутый контур циркуляции. Недостатком данных аппаратов считаются потери энергии при перекачке жидкости, трудности



проектирования в связи с отсутствием надежных методик расчета конструкций и режимов работы струйных и эжекционных устройств.

Третья группа аппаратов – *с подводом энергии газовой и жидкой фазами (группа ФЖГ)*. Основными их конструктивными элементами являются перемешивающие устройства всех известных типов, а также наличие в совокупности насосов и перемешивающих устройств. Это могут быть аппараты с группой самовсасывающих мешалок и насосом для перекачивающих устройств. Коэффициент массопереноса кислорода в таких ферментерах может в принципе иметь любые из известных значений.

Перечисленные типы аппаратов возникли в основном в течение «эры» антибиотиков и белка одноклеточных и применяются, главным образом, в технической микробиологии.

### **3.2 Аппаратура для конечной стадии биотехнологических производств и получения готового продукта**

Завершающая стадия биотехнологического процесса – выделение целевого продукта. Эта стадия существенно различается в зависимости от того, накапливается продукт в клетке либо выделяется в культуральную жидкость, или же продуктом является сама клеточная масса. Наиболее сложно выделение продукта, накапливающегося в клетках. Для этого клетки необходимо отделить от культуральной жидкости, разрушить (дезинтегрировать) и далее целевой продукт очистить от массы компонентов разрушенных клеток.

Выделение продукта облегчается, если он высвобождается (экскретируется) продуцентом в культуральную жидкость. Поэтому понятно стремление биотехнологов получить методами генетической инженерии промышленные штаммы микроорганизмов, экскретирующих возможно большее количество ценных продуктов.

Технология выделения и очистки в значительной степени зависит от природы целевого продукта. Так, ферменты (протеазы, целлюлазы и т. д.) выделяют путем осаждения органическими растворителями или сульфатом аммония. Имеется возможность обойтись без их полной очистки, поскольку в народном хозяйстве широко используют смешанные ферментные препараты, содержащие несколько белков, близких по физико-химическим свойствам. В то же время такие ферменты, как эндо- и экзонуклеазы, лигазы, требуют сложной многоэтапной очистки с применением тонких методов препаративного разделения. Некоторые традиционные биотехнологические процессы вообще не включают этапа отделения продукта.

Первым этапом на пути к очистке целевого продукта является разделение культуральной жидкости и биомассы – сепарация. Существуют различные методы сепарации:

- 1) флотация, если клетки продуцента в биореакторе из-за низкой смачиваемости накапливаются в поверхностных слоях жидкости;
- 2) фильтрация на пористой фильтрующей перегородке;

### 3) центрифугирование.

Метод основан на осаждении взвешенных в жидкости частиц с применением центробежной силы.

Центрифугирование требует более дорогостоящего оборудования, чем фильтрование. Поэтому оно оправдывает себя, если: а) суспензия фильтруется медленно; б) поставлена задача максимального освобождения культуральной жидкости от содержащихся частиц; в) необходимо наладить непрерывный процесс сепарации в условиях, когда фильтры рассчитаны только на периодическое действие.

Центрифугирование и фильтрация в некоторых производственных процессах реализуются в комбинации – речь идет о фильтрационных центрифугах. Широко применяют центрифуги, где разделение жидкой и твердой фаз не связано с фильтрацией и основано лишь на центробежной силе.

Следующим этапом получение целевого продукта является разрушение клеток. Разрушение клеток (дезинтеграцию) проводят физическим, химическим и химико-ферментативным методами. Наибольшее промышленное значение имеет физическое разрушение: ультразвуком; с помощью вращающихся лопастей или вибраторов – метод, обычно используемый в пилотных и промышленных установках; встряхиванием со стеклянными бусами; продавливанием через узкое отверстие под высоким давлением; раздавливанием замороженной клеточной массы; растиранием в ступке; осмотическим шоком; замораживанием – оттаиванием; сжатием клеточной суспензии с последующим резким снижением давления (декомпрессия).

За дезинтеграцией клеток следует этап отделения фрагментов клеточных стенок. Используют те же методы, что и при сепарации клеток: центрифугирование или фильтрацию. Однако применяют более высокоскоростные центрифуги и фильтры с меньшим диаметром пор (часто мембранные), чем при сепарации клеток. В большинстве биотехнологических процессов клеточные стенки отбрасывают, как балласт, но возможно и промышленное получение компонентов клеточных стенок как целевого продукта.

Выделение целевого продукта из культуральной жидкости или гомогената разрушенных клеток проводят путем его осаждения, экстракции или адсорбции.

Современные методы разделения веществ включают: хроматографию, электрофорез, изотахофорез, электрофокусировку, основанные на принципах экстракции и адсорбции. Разделение веществ путем хроматографии связано с их неодинаковым распределением между двумя несмешивающимися фазами. Различают хроматографию на бумаге, пластинках, колонках. При хроматографии на бумаге или на пластинках одной из несмешивающихся фаз служит движущийся растворитель, например бутанол, а другой, неподвижной, фазой – волокна бумаги или частицы покрывающего пластинку силикагеля или другого материала. При колоночной

хроматографии подвижная фаза – текущий через колонку растворитель, неподвижная – заполняющий колонку адсорбент, чаще всего гранулированный гель. Разделяемая смесь вводится в контакт с подвижной и неподвижной фазами. Колоночная хроматография допускает масштабирование – увеличение размеров и пропускной способности. Она применяется в промышленных условиях и имеет несколько разновидностей.

Ионообменная хроматография – гранулы адсорбента, например карбоксиметилцеллюлозы, несут на себе заряженные группы, катионные ( $\text{NH}_4^+$ ), анионные ( $\text{SO}_3^-$ ), способные к захвату ионов противоположного знака. Она применяется для выделения ионизированных соединений из жидкости, а также для очистки нейтральных соединений от примесей ионной природы.

Одной из первых примененных в промышленных масштабах ионообменных колонок была колонка с естественным ионообменником цеолитом для смягчения воды, т.е. удаления из нее  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Ионообменные колонки с амберлитом широко применяют для отделения витамина  $\text{B}_2$ .

Метод «молекулярных сит», гель-хроматография, гель-фильтрация. Хроматография, основанная на разделении веществ с различной молекулярной массой и диаметром. Частицы адсорбента захватывают и удерживают, скажем, только низкомолекулярные соединения, пропуская высокомолекулярные.

Аффинная хроматография – задерживается компонент, образующий прочный комплекс с лигандом, фиксированным на частицах носителя. Применяют агенты, специфически связывающие одно индивидуальное вещество. Например, фермент очищают путем связывания на колонке, несущей субстрат или специфический ингибитор.

Аффинная хроматография может обеспечить полную очистку продукта из сложной многокомпонентной смеси – культуральной жидкости, экстракта клеток – в одну стадию, в то время как более традиционные методы осаждения и ионообменной хроматографии требуют многоэтапной очистки, сопряженной с большими затратами труда и времени. Определенные неудобства вызывает относительная дороговизна материалов для аффинной хроматографии, в частности, веществ, используемых в качестве лигандов. Проблемой является также быстрый выход колонки из строя при пропускании через нее смесей, компоненты которых забивают промежутки между гелевыми частицами. Поэтому в производственных условиях колонки используются в периодическом, а не в непрерывном режиме.

После пропускания через колонку порции культуральной жидкости, из которой выделяют продукт, частицы геля подвергают очистке. Методы очистки основаны на: а) использовании гелевых частиц, превышающих по плотности конгломераты веществ, закупоривающих колонку: различие в плотности позволяет очистить гель путем его избирательного осаждения или проточной промывки, уносящей только загрязняющие частицы; б) придании частицам геля магнитных свойств, что позволяет провести их очистку в

градиентном магнитном поле; в) упаковке частиц геля в виде ленты, покрытой тонко ячеистой оболочкой: лента вращается и проходит попеременно через жидкость с неочищенным продуктом и через буферный раствор, в который переходят загрязняющие примеси. Масштабирование процесса аффинной хроматографии ограничивается разрушением структуры геля и уносом его частиц током жидкости. Это, в частности, обусловлено тем, что в широких колонках для крупномасштабной очистки продуктов стенки колонки уже не служат опорой для частиц геля, увлекаемых жидкостью. Увеличение высоты колонки приводит к пропорциональному возрастанию сил, разрушающих нижние слои геля. Помимо этого, для повышения эффективности и степени разделения близких по свойствам соединений целесообразно применять мелкие частицы геля (менее 1 мкм в поперечнике), но именно такие частицы легче всего увлекаются током жидкости. В последние годы изыскивают средства укрепления гелей для крупномасштабной аффинной хроматографии. Частицы агарозы – наиболее перспективного материала для гелей – предполагают укреплять путем сшивок.

Наряду с аффинной хроматографией, называемой также аффинной адсорбцией в геле, для крупномасштабного отделения и очистки продуктов биотехнологических процессов предполагают применять аффинную преципитацию и аффинное разделение. При аффинной преципитации лиганд прикрепляют к растворимому носителю. При добавлении смеси, содержащей соответствующий белок, образуется его комплекс с лигандом, который выпадает в осадок сразу после его формирования или после дополнения раствора электролитом. Аффинное разделение основано на применении системы, содержащей два водорастворимых полимера. Один из полимеров, например полиэтиленгликоль, несет специфические лиганды. Другой полимер, например высокомолекулярный декстран, обладает сродством к остальным, примесным компонентам. Так, содержащиеся в разделяемой смеси белки, нуклеиновые кислоты, фрагменты клеточных структур предпочитают более полярный декстран, тогда как целевой продукт, скажем, фермент, накапливается «в сетях» полиэтиленгликоля, несущего молекулы лиганда (субстрата, кофактора, ингибитора). Аффинное разделение представляет собой наиболее высокоэффективный из аффинных методов очистки.

### **3.3. Совокупность методов для контроля и управления биотехнологическими процессами**

Эффективное проведение биотехнологических процессов тесно связано с совершенствованием способов контроля и управления. В период предистории биотехнологии делались отдельные попытки регулировать развитие продуцента с помощью изменений параметров внешней среды. До середины XX века регулирование в основном сводилось к эмпирике, так как без знания сущности происходящего невозможно эффективно

контролировать и управлять процессом. В основном объектом управления того периода была экстенсивная периодическая культура микроорганизмов со всеми ее недостатками: динамикой состояния продуцента и среды, отсутствием средств контроля.

В последние 25 лет с внедрением управляемых культур биотехнологи переходят от простой задачи поддержания определенных параметров среды к управлению процессом в целом. Для реализации управляемого культивирования необходимо построение алгоритмов управления, основанных на моделях биотехнологического процесса. В современных биотехнологических процессах необходимо регистрировать и анализировать множество быстроизменяющихся факторов (концентрацию субстрата, биомассы и продукта в культуре, pH, температуру, парциальное давление кислорода и др.). Это вызывает необходимость в применении электронной техники. Первые разработки по применению ЭВМ в биотехнологии относятся к концу 60-х годов. XX века. На первых этапах ЭВМ привлекали в качестве советчика оператора, управляющего исполнительными механизмами для поддержания оптимального течения биотехнологического процесса. Прежде всего, для сбора и обработки информации по показаниям датчиков и для представления этой информации в легковоспринимаемой форме. Разрабатывали также системы автоматического регулирования отдельных параметров (дозировка среды или отдельных компонентов, стабилизация температуры и pH среды, скорости потока) по принципу контроля с обратной связью. Позднее ЭВМ стали использовать для управления технологическим процессом в целом в составе автоматизированных систем АСУ. Задача создания АСУ стала особенно актуальной при реализации крупнотоннажных биотехнологических процессов. В настоящее время АСУ осуществляется на основе системного подхода и управление имеет многоуровневую иерархическую систему.

Внедрение АСУ позволяет осуществить рациональное управление процессом биосинтеза. В результате этого экономятся исходное сырье, электроэнергия, вода, повышается продуктивность процесса и производительность труда обслуживающего персонала. Затраты на создание и внедрение АСУ в биотехнологии окупаются сравнительно быстро, в течение 3–4 лет.

Обычная схема контроля и управления ферментацией включает ферментер, датчики, регулируемую систему, которая реализует расчетные зависимости на основе измерения параметров процесса. Исходные данные от датчиков поступают на ЭВМ, в которой они оперативно анализируются, и в результате выдаются данные для исполнительных устройств и механизмов. В настоящее время разработка и внедрение АСУ для биотехнологических процессов, прежде всего, определяется уровнем технической оснащенности данных процессов и наличием электронного оборудования, средств контроля и автоматизации. Возникают также проблемы вследствие большой информационной емкости биотехнологических процессов. Эффективность АСУ связана с быстродействием и объемом памяти ЭВМ. Поэтому прогресс

в области биотехнологии зависит от прогресса в области электроники. Большое будущее имеет, в частности, микропроцессорная техника. Внедрение АСУ сдерживается отставанием в создании надежной и быстродействующей контрольно-измерительной аппаратуры, выдерживающей стерилизацию и удовлетворяющей современные требования к чувствительности и точности измерения, быстродействию, надежности, миниатюризации.

Моделирование является одним из наиболее значимых направлений при разработке биотехнологических процессов, так как с помощью моделирования, экспериментального и математического, исследуются и разрабатываются новые процессы, совершенствуются аппараты и технологические схемы производств. При экспериментальном моделировании в лабораторных и промышленных условиях применяются, как правило, модели объектов и процессов, отличающиеся масштабами. Экспериментальное моделирование позволяет исследовать и оптимизировать процессы, сущность которых мало изучена. Данный подход часто служит единственным средством для исследования биотехнологического процесса. Первым этапом экспериментального моделирования служит лабораторный уровень, в ходе которого при сравнительно небольших затратах проводится изучение новых продуцентов и разработка новых процессов. Далее полученные результаты переносят в опытные, полупромышленные и промышленные масштабы. На опытных установках отрабатываются все технологические детали будущего процесса, обучается персонал, создается оборудование, уточняются технико-экономические показатели. Затем проводятся крупномасштабные дорогостоящие промышленные эксперименты и испытания. Экспериментальное моделирование имеет ряд особенностей: трудоемкость, сложность реализации новой модели процесса. Наиболее трудны при этом вопросы масштабирования технологии и оборудования.

Развитие биологических агентов связано не только с поведением жидкости и реагентов в ферментере, но и с их собственным метаболизмом. Поэтому масштабирование в биологии требует специальных решений, при этом до настоящего времени нет единого подхода к решению данной задачи. Для оптимизации и управления биотехнологическими процессами, помимо экспериментального, необходимо также привлечение математического моделирования. Эти два подхода, дополняя друг друга, позволяют более эффективно решать поставленные задачи. Экспериментальное моделирование часто предшествует математическому, являясь для него источником информации. Математические модели – удобное средство обобщения экспериментальных данных. Наличие математических моделей позволяет более обоснованно подходить к планированию экспериментов и обрабатывать данные, существенно сокращать объем экспериментальных работ. Для моделирования и расчета биотехнологических процессов в силу их сложности применяют системный подход. Математическая модель

сложной биосистемы должна включать описание различных по своей природе объектов и явлений.

Поэтому, анализируя биологическую систему в целом, применяют метод декомпозиции, расчлняя исходную систему на ряд подсистем: строятся модели массообмена, кинетики роста биообъекта и биохимических процессов. К настоящему времени разработано много моделей массообмена, кинетики потребления субстрата и образования различных продуктов. Наиболее сложная задача – моделирование собственно биологических объектов, так как они значительно сложнее химических, физических и технических. Объекты биотехнологии способны к саморегулированию, их сложность усугубляется неоднородностью. Процессы, протекающие в биореакторе, зависят не только от сложных внутриклеточных факторов, но и от условий внешней среды; в свою очередь, внешние процессы в биологии связаны с внутренними, поэтому их разделить нельзя. Кроме этого, на данном этапе уровня развития математической биологии отсутствует теория, адекватная сущности биологических процессов. Пока не создан математический аппарат, способный описать природу биологических превращений во всем многообразии, то есть необходимо развитие и совершенствование самого математического аппарата. Математическое описание биологических объектов дополнительно осложняется их недостаточной изученностью. Поэтому на данном этапе возможно достаточно упрощенное и приближенное математическое описание биологических объектов, это направление нуждается в существенном совершенствовании.

Оптимизация биотехнологических процессов осуществляется на основе сочетания экспериментального и математического моделирования и применения современных методов оптимизации (динамического и нелинейного программирования, вариационного исчисления). Однако в настоящее время для оценки оптимальности биотехнологических процессов трудно даже подобрать критерии. При оптимизации в биотехнологии необходимо учитывать ограничения, связанные с экономическими и конструктивными условиями, возможностями контрольно-измерительной аппаратуры и средств управления, экологическими требованиями и др. Моделирование и оптимизация биотехнологических процессов – задача сложная и во многом еще не решенная.

Однако именно разработка адекватных моделей различных биотехнологических процессов и на их основе создание совершенных методов оптимизации и управления – важнейшее направление биотехнологии, без которого невозможен прогресс.

### 3.4. Критерии оценки эффективности биотехнологических процессов

Технологические факторы, влияющие на производительность и экономику биотехнологических процессов

В биотехнологии при выборе метода получения конкретного целевого продукта обязательно должна производиться технико-экономическая оценка альтернатив получения подобных продуктов традиционными методами. По сравнению с известными биотехнологические процессы должны быть более технологичными, экономичными и экологичными либо вообще должны исключать альтернативы. Оценка альтернативности вариантов только через себестоимость продукта – односторонняя. Оценкой эффективности биотехнологии, помимо качества получаемого продукта, может служить сопоставление экспериментального и теоретического выходов продукта, рассчитанных по материально-энергетическому балансу процесса. При этом затраты и стоимость сырья в крупномасштабных биотехнологических процессах, как правило, являются определяющими, поэтому материально-энергетическая оценка в данном случае очень существенна. И, напротив, при использовании процессов на основе высокопродуктивных рекомбинантных штаммов-продуцентов основная доля затрат относится не к сырью, а к созданию продуцента и его поддержанию, а также разработке специальных условий его культивирования, то есть в данном случае экономика сырьевых и энергоресурсов не является первостепенной.

В любом биотехнологическом процессе ключевую роль играет биологический агент, его природа и физиолого-технологические свойства. Для роста любого биообъекта нужен исходный жизнеспособный посевной материал, источники энергии и углерода, питательные вещества для синтеза биомассы, отсутствие действия ингибиторов роста, соответствующие физико-химические условия ферментации (рН, температура, аэрация и др.).

Одним из основных показателей, характеризующих адекватность условий ферментации, служит скорость роста продуцента. Скорость роста (увеличение биомассы) организмов с бинарным делением в хорошо перемешиваемой среде в периодической культуре будет пропорционально концентрации микробной биомассы:

$$dX/dt = \mu X,$$

где  $dX/dt$  – скорость роста,  $X$  – биомасса,  $\mu$  – коэффициент пропорциональности, (удельная скорость роста); параметр аналогичен сложным процентам (например, если удельная скорость роста равна  $0.1 \text{ ч}^{-1}$ , то есть увеличение биомассы равно  $10\%$  в час).

Если величина  $\mu$  постоянна, как это бывает в установившемся режиме культивирования, то интегрирование представленного уравнения дает:



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

где  $X_0$  – биомасса в начальный период времени  $t$ .

График зависимости  $\ln X$  от времени будет иметь вид прямой линии с наклоном  $\mu$ . Удельная скорость роста является одним из основных параметров, определяющих физиологическое состояние продуцента; ряд других параметров может быть выражен через этот показатель.

Продуктивность процесса характеризуется количеством продукта, получаемого на единицу объема биореактора в единицу времени. Продуктивность процесса зависит от многих факторов: активности продуцента, значений коэффициента выхода продукта из потребленного субстрата, количества активной биомассы в ферментере:

$$P = q_s \cdot Y_{p/s} \cdot X \text{ [г/л} \cdot \text{ч]},$$

где  $q_s$  – скорость потребления субстрата (метаболический коэффициент),  $Y_{p/s}$  – выход продукта (экономический коэффициент),  $X$  – концентрация биомассы,  $P$  – продукт,  $S$  – субстрат.

Влиять на величину продуктивности можно путем изменения различных ее составляющих, но в каждом конкретном случае это приходится рассматривать отдельно. Так, при повышении величины  $X$  могут возникнуть ограничения по массообменным характеристикам аппарата и лимитирующие состояния; влиять на величину метаболического коэффициента культуры возможно только при условии глубокого знания взаимосвязей между физиолого-биохимическими характеристиками продуцента и условиями среды.

Выход продукта ( $Y$ ) (экономический коэффициент) определяется как количество продукта, получаемого из данного количества субстрата:

$$Y = X/S_0 - S,$$

где  $S$  и  $S_0$  – конечная и исходная концентрация субстрата.

Данный коэффициент выражает эффективность использования субстрата для получения целевого продукта и является очень важной характеристикой, так как непосредственно связан с продуктивностью и позволяет влиять на себестоимость конечного продукта. Экономический коэффициент имеет четкий физический смысл, характеризующей степень перехода энергии, заключенной в субстрате, в продукт. Данная величина необходима для расчетов и прогнозирования процесса в целом и используется в качестве параметра для контроля и управления ходом различных процессов и сопоставления их эффективности.

Конечная концентрация продукта должна планироваться с учетом продолжительности процесса и величины выхода продукта. Достижение конечной высокой концентрации продукта оправданно, когда выделение, концентрирование его трудоемки и дорогостоящи.

Удельные энергозатраты существенно варьируют в зависимости от направленности и схемы процесса ферментации, а также условий подготовки сырья на предферментационной стадии и постферментационных процедур.

Удельные энергозатраты также очень существенно зависят от типа ферментационного оборудования.

Непродуктивные затраты субстрата ( $h$ ) – это затраты энергии субстрата, которые не проявляются в приросте продукта. В общем виде они выражаются через экономический коэффициент:

$$h = Y_{\text{экспериментальный}} / Y_{\text{теоретический}} < 1.$$

Непродуктивные затраты существенно влияют на эффективность и экономику биотехнологического процесса, поэтому выявление причин и мест этих дополнительных трат энергического субстрата очень важно. Непродуктивные затраты субстрата могут быть связаны с ошибками при считывании генетической информации в ходе быстрого роста продуцента и затратами на поддержание при разобщенном росте в результате снижения эффективности образования энергии в цепи переноса электронов из-за разобщения окисления и фосфорилирования, инактивации мест сопряжения, возникновения альтернативных, менее эффективных ветвей, с диссипацией энергии, а также из-за возрастания трат энергии на поддержание жизни без размножения (транспорт субстратов и мономеров в клетке, ресинтез молекул, защитные реакции, процессы репарации).

Первичная оценка эффективности биотехнологических процессов по перечисленным параметрам проводится на стадии лабораторных разработок и испытаний процесса и далее уточняется при масштабировании на опытных и опытно-промышленных стадиях.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Какие виды биохимической деятельности микроорганизмов используют в биотехнологии?
2. Какие существуют преимущества биотехнологии по сравнению с химической технологией?
3. Промышленное получение антибиотиков методом прямой ферментации.
4. Особенности культивирования. Требования к питательным средам и аэрации.
5. Биотехнологический процесс. Стадия культивирования.
6. Режимы культивирования биообъектов.
7. Стадии роста культуры в биореакторе, синтез целевого продукта.
8. Биореакторы, ферментеры. Особенности, правила работы. Классификация.
9. Способы перемешивания в ферментерах.
10. Основы проектирования и оборудование предприятий биотехнологической промышленности.

11. Процесс ферментации: основные характеристики.
  12. Возникновение и развитие науки о культивировании микроорганизмов.
  13. Классификация процессов ферментации.
  14. Основные параметры периодической ферментации.
  15. Кинетические характеристики процесса.
  16. Макростехиометрические характеристики процесса.
  17. Принципы выбора микроорганизмов для промышленных процессов ферментации.
  18. Глубинное культивирование клеточных культур.
  19. Основные этапы ферментации.
  20. Предферментационная стадия микробного производства.
  21. Постферментационная стадия микробного процесса.
  22. Виды продуктов ферментации по глубине протекания процесса.
  23. Оборудование для твердофазного культивирования микроорганизмов.
- Достоинства и недостатки.
24. Конструкции промышленных ферментеров. Классификация.
  25. Достоинства и недостатки основных конструкций ферментеров.
  26. Конструкции лабораторных ферментеров. Материалы изготовления.
  27. Система охлаждения ферментера.
  28. Система перемешивания ферментера.
  29. Система пеногашения ферментера.
  30. Система аэрации ферментера.
  31. Подготовка аппаратурно-технологического оборудования к ферментации. Последовательность действий.
  32. Обеспечение асептических условий ферментации.
  33. Средства измерений ферментера.
  34. Методы, лежащие в основе средств измерения ферментера.
  35. Основные задачи управления процессом ферментации.
  36. Управляющие воздействия в процессе ферментации.
  37. Основные направления совершенствования ферментеров.
  38. Сущность задачи масштабирования процесса ферментации. Основные подходы.
  39. Масштабирование процессов ферментации на основе концентрации растворенного кислорода.
  40. Зависимость скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата.
  41. Зависимость скорости роста микроорганизмов от концентрации продуктов метаболизма.
  42. Тепловой расчет процесса ферментации.
  43. Определение массообменной характеристики ферментеров.
  44. Сравнение производительности непрерывного и периодического процесса ферментации.
  45. Преимущества и недостатки непрерывных процессов ферментации.

## 4. ПРОМЫШЛЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

### 4.1 Промышленный биосинтез белковых веществ.

Промышленная микробиология – это наука о получении различных целевых продуктов на основе жизнедеятельности микроорганизмов. Промышленная микробиология (или техническая микробиология) в настоящее время представляет собой также самостоятельную и наиболее крупнотоннажную отрасль современной промышленной биотехнологии. Огромное разнообразие микроорганизмов, утилизирующих в качестве ростовых субстратов различные соединения, в том числе отходы, позволяет получать широкий спектр биологически активных соединений, а также осуществлять полезные для человека реакции, включая обезвреживание отходов, трансформацию и получение энергии и многое другое.

В настоящее время в различных процессах промышленной микробиологии получают около 200 соединений, обладающих коммерческой ценностью. Важнейшие среди них: алкалоиды, аминокислоты, антибиотики, антиметаболиты, антиоксиданты, белки, витамины, гербициды, инсектициды, коферменты, липиды, нуклеиновые кислоты, органические кислоты, пигменты, ПАВ, полисахариды, полиоксиалканоаты, противоопухолевые агенты, растворители, сахара, стерилы, ферменты, нуклеотиды, нуклеозиды, эмульгаторы.

Наиболее дефицитный компонент пищи – белок, в особенности высокой биологической ценности, то есть животного происхождения. Мировая потребность в белке в настоящее время удовлетворяется примерно на 40 %. Предполагается, что к 2000 году с ростом населения потребность в белке увеличится, при этом дефицит кормового белка возрастет до 147 %. Поэтому изыскание эффективных способов увеличения ресурсов белка для прямого или непрямого (через организм сельскохозяйственных животных) увеличения пищевых ресурсов считается одной из основных задач научно-технического прогресса.

Нетрадиционным и принципиально новым способом получения белковых веществ является микробиологический синтез. По скорости роста микроорганизмы превосходят сельскохозяйственные культуры в сотни, а животных – в тысячи раз. Поэтому микробиологический синтез с большей эффективностью использует материальные и энергетические ресурсы, не требует больших земельных площадей, не зависит от погодных и климатических условий и не загрязняет окружающую среду ядохимикатами, так как не использует пестициды. Качество микробных белков близко белкам животного происхождения. Применение микробных белков в кормопроизводстве улучшает качество и усвояемость традиционных растительных кормов. Например, 1 т кормовых дрожжей обеспечивает экономию 5 т зерна и увеличивает продуктивность в животноводстве на 15–30 %. Современный средний завод по производству микробного белка мощностью 50 т/год и занимающий 0.2 га может обеспечить потребность в

белке до 10 млн человек. Сельскохозяйственные технологии для таких масштабов производства требуют до 16 тыс. га, засеянных пшеницей, либо содержание фермы с производительностью 400 поросят/день. В 60-е годы появился новый термин – «белок одноклеточных» (single cell protein, «SCP»), означающий целые неживые высушенные микробные клетки (водорослей, дрожжей, бактерий, грибов), предназначенные в качестве белкового продукта для кормовых и пищевых целей. Термин несколько условен, так как в микробных биомассах помимо белков существенную долю занимают другие компоненты – сахара, липиды, нуклеиновые кислоты. Белок одноклеточных должен удовлетворять ряду специальных требований. Главными являются: питательность, переваримость, экономическая эффективность. Питательность микробного белка, определяемая по химическому составу, близка традиционным белковым продуктам.

Микробная биомасса питательна, если ее компоненты перевариваются ферментами пищеварительного тракта высших животных или человека. Препятствием этому могут быть клеточные стенки отдельных продуцентов, которые предварительно приходится разрушать, а также высокий уровень нуклеиновых кислот. Последние метаболизируются в организме животных и выводятся из организма с уриной, следовательно, не представляют для высших животных опасности. Для человека такой уровень нуклеиновых кислот неприемлем, так как в ходе их усвоения возможно нарушение обмена веществ и возникновение патологических состояний. Поэтому для пищевых целей микробную биомассу предварительно обрабатывают, используя различные методы разрушения и денуклеотизации.

В технико-экономических показателях микробиологического синтеза белка определяющее значение имеют удельные затраты и стоимость сырья (до 50 % в структуре всех затрат) и энергозатраты (до 15–30 %). Поэтому важнейший вопрос при разработке новых технологий получения белка одноклеточных – вопрос доступности сырьевой базы. Доступность сырья подразумевает наличие резервных вариантов, позволяющих оперативно заменять и использовать различные источники сырья без существенного изменения качества получаемого продукта. В современных промышленных процессах используют как «чистое» сырье постоянного химического состава, так и комплексные соединения, включая отходы производств. Последнее наиболее выгодно экономически и имеет огромное значение для охраны окружающей среды.

Микроорганизмы способны усваивать различные углеродсодержащие субстраты, которые принято подразделять на несколько поколений:

1-е поколение – углеводы;

2-е поколение – жидкие углеводороды;

3-е поколение – оксидаты углеводородов, газообразные углеводороды, углекислый газ, включая смеси с водородом.

Независимо от вида используемого сырья, типовая схема микробиологического производства белка включает получение и подготовку сырья, получение посевного материала, ферментацию, выделение,

инактивацию, сгущение микробной биомассы, последующее высушивание и стандартизацию готового продукта. Большое значение имеет качество исходного посевного материала (инокулята). Инокулят получают из музейной культуры в несколько стадий с применением принципа масштабирования. Подготовленные инокулят, основной ростовой субстрат и все необходимые питательные компоненты вместе с воздухом подают в ферментер, в котором происходит основная стадия биотехнологического процесса – ферментационная. Стадия ферментации проводится в соответствии с Технологическим регламентом, разработанным для конкретного процесса, включая субстрат и тип продуцента, и сводится к дозированному поступлению в ферментер потоков питательных веществ и воздуха (или газовой смеси), стабилизации основных параметров процесса на заданных уровнях и своевременному отводу из аппарата отработанного воздуха, образующихся продуктов, а также тепла. Максимальные скорости синтеза белковых веществ микробными клетками реализуются при оптимальных условиях среды, когда удельная скорость роста близка к максимальной. Поэтому для получения белка одноклеточных биотехнологические процессы реализуют в проточном режиме, который позволяет стабилизировать практически все параметры стадии ферментации на уровнях, оптимальных для размножения клеток со скоростями роста, близкими к  $\mu_{\max}$ , то есть в режиме белковой направленности биосинтеза. При производстве биомассы в качестве кормового белкового продукта, как правило, осуществляется режим незащищенной ферментации, то есть без соблюдения правил стерильности. Последнее оправдано как условиями ферментации (проточное культивирование), так и спецификой применяемых субстратов и штаммов-продуцентов, а также сферой применения конечного продукта. Получаемая на стадии ферментации суспензия с 1–2,5%-м содержанием микробной биомассы по сухому веществу (АСВ), то есть 10–25 кг/м<sup>3</sup>, на постферментационной стадии подвергается сгущению в несколько этапов до 12–16 % АСВ и термообработке, в ходе которой в течение 10–40 минут при 75–90°C практически все клетки штамма-продуцента и сопутствующая микрофлора погибают. После стадии термообработки суспензию в вакуум-выпарных установках сгущают до концентрации 20–25% АСВ и потом высушивают до остаточной влажности конечного продукта около 10%. Далее мелкодисперсный порошок высушенных клеток гранулируют. Порошок или гранулят фасуют по 25–30 кг и затаривают в многослойные бумажные мешки.

Обязательным условием технологического процесса получения микробной биомассы является очистка газоздушных выбросов, которые образуются на стадии ферментации и постферментационной стадии и представляют собой большие объемы воздуха, загрязненного живыми микробными клетками, белковой пылью и другими продуктами микробного синтеза. Очистке подвергаются также большие объемы культуральной жидкости, образуемой после отделения клеточной биомассы. Очищенная жидкость используется в цикле обратного водоснабжения технологической

схемы производства. Технология получения микробного белка является в настоящее время самой крупнотоннажной отраслью биотехнологии, производящей важнейшие кормовые препараты и белковые добавки для животноводства, звероводства, птицеводства, рыбоводства, а также белок пищевого назначения с использованием разнообразного сырья и субстратов.

#### **4.2 Субстраты для получения белково-витаминных концентратов.**

**Субстраты I-го поколения – углеводы.** Идею использования биомассы микроорганизмов в качестве белковых компонентов питания с 1890 года начал пропагандировать Дельбрюк, который вместе с коллегами разработал первый технологический процесс выращивания пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на мелассе. Полученную дрожжевую биомассу рекомендовали использовать в качестве белковой добавки в пищевые продукты. Во время Первой мировой войны мощность действующих в Германии установок по производству дрожжевого белка достигала 10 тыс. т/г. Получаемый продукт использовали главным образом, добавляя в мясные фарши. К середине 30-х годов производства дрожжей на гидролизатах отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности, сульфитном щелоке, барде гидролизных заводов стали появляться в разных странах. В России первый завод по производству кормовых дрожжей из отходов сельского хозяйства был пущен в 1935 году. Во время Второй мировой войны биомасса пищевых дрожжей (*Candida arborea* и *S. utilis*) также была важным белковым компонентом питания в Германии. После второй мировой войны серия заводов по производству пищевых дрожжей на углеводном сырье производительностью 10–12 т в сутки была построена в разных странах.

В настоящее время в микробиологических производствах белка применяется различное сахаросодержащее сырье. Это отходы пищевой, молочной, спиртовой, сахарной и целлюлозной промышленности и продукты переработки растительного сырья (древесины, соломы, торфа, несъедобных частей растений – стебли, лузга, кочерыжки). Питательные среды, приготовленные на основе перечисленных субстратов, содержат наборы моно- и дисахаров, органические кислоты, спирты и другие органические соединения, а также минеральные элементы, то есть являются сложными многокомпонентными субстратами. Поэтому при их применении используют штаммы-продуценты, способные, во-первых, усваивать как пентозы, так и гексозы, и, во-вторых, – устойчивые к присутствию спиртов, фурфурола и других продуктов гидролиза растительных биомасс. Наибольшее распространение получили виды дрожжей рода *Candida*: *S. utilis*, *S. scottii*, *S. tropicalis*, способные утилизировать наряду с гексозами пентозы и обладающие толерантностью к фурфуролу. Дрожжи утилизируют углеродсодержащие компоненты гидролизатов, сульфитного щелока, последовательно: глюкоза, уксусная кислота, манноза, ксилоза, галактоза, арабиноза. В зависимости от выбранной схемы культивирования дрожжей

полнота использования перечисленных углеродсодержащих компонентов различна; максимальная – при использовании смешанных культур. Применяются две, наиболее эффективные, схемы соединения ферментационных аппаратов при совместном выращивании *S. scottii* и *S. tropicalis*: двухступенчатая последовательная и параллельно-последовательная. В первом варианте в качестве исходной питательной среды используют неразбавленный гидролизат (сусло) с концентрацией редуцирующих веществ (РВ) 30–35 г/л (по массе). В первом ферментере утилизируется около 70 % РВ, главным образом за счет легкоусвояемых гексоз, до остаточной концентрации РВ около 10–15 г/л, в основном, пентоз. Полученные в первом аппарате дрожжи выделяются из дрожжевой суспензии и подвергаются обработке до получения готового продукта; отделенная культуральная жидкость поступает во второй аппарат, в котором оставшиеся пентозы утилизируются более приспособленными к ним другими штаммами дрожжей.

По второму варианту используют два последовательно соединенных фермента: в первый поступает разбавленное сусло с концентрацией РВ около 15–18 г/л; в нем в ходе ферментации дрожжей утилизируются в основном гексозы.

Далее дрожжевая суспензия поступает во второй аппарат, в котором без добавления субстрата происходит доутилизация оставшихся сахаров. Общий выход дрожжей достигает при этом 70–80 % по отношению к РВ.

Выращивание дрожжей на данных субстратах осуществляют в аппаратах эрлифтного типа объемом от 300 до 600 м<sup>3</sup> с вводом воздуха в нижнюю зону аппарата при избыточном давлении 40–60 КПа. В процессе насыщения питательной среды воздухом образуется газожидкостная эмульсия, циркулирующая по всему объему аппарата, обеспечивающая эффективное перемешивание среды. Для борьбы с образующейся при аэрации пеной используют механическое пеногашение. Рабочий объем аппарата составляет около 70 % от общего объема. На отдельных предприятиях применяют также барботажно-эрлифтные ферментеры большего объема, до 1300 м<sup>3</sup>, с воздухом распределением по нескольким, обычно 4–5 зонам.

Процесс выращивания дрожжей осуществляется в непрерывном режиме при скорости потока среды, равной 0,20–0,25 ч<sup>-1</sup>, рН 4.2–4.6; температура среды составляет в зависимости от используемых штаммов от 30–35 до 38–40°C. Сдвиг рН в кислую сторону в ходе ферментации дрожжей автоматически корректируется подтитровкой среды аммиачной водой. Для отвода образующегося в ходе ферментации тепла в составе аппаратов применяют теплообменные устройства в виде змеевиков, через которые циркулирует охлажденная вода. Суспензия, сливаемая из аппарата, с содержанием дрожжей от 20 до 40 г/л и влажностью 75%, поступает на стадию обработки и концентрирования, в ходе которой подвергается флотации, трехступенчатой сепарации, термообработке и высушиванию. Для обогащения дрожжевой биомассы витамином D<sub>2</sub> дрожжи облучают



ультрафиолетом, под воздействием которого содержащийся в липидной фракции клеток эргостерин превращается в витамин. Для этого сгущенную суспензию дрожжей прокачивают по кварцевым трубкам. Содержание витамина D<sub>2</sub> достигает 5000 МЕ/1 г АСВ. В составе биомассы дрожжей (%): белок – 43–58, липиды – 2–3, углеводы – 11–23, зола – 11, остаточная влажность – не более 10. Выход товарных дрожжей на продуктах переработки отходов древесины составляет 46–48 %. Это соответствует выходу 240 кг АСВ дрожжей с 1 т отходов, при этом экономический коэффициент использования субстрата составляет 0,4–0,6, затраты углеводов на получение биомассы – около 2 т, кислорода – 0,7–1,0 т/т. Удельная производительность аппаратов – 15–20 кг/м<sup>3</sup> в сутки при расходе электроэнергии 600–800 кВт ч.

Наращивание объемов производства кормовых дрожжей на гидролизатах древесины сдерживается существующим уровнем технологий химического гидролиза растительного сырья. Некоторые преимущества имеют процессы получения кормовых дрожжей на предприятиях целлюлозно-бумажной промышленности, так как отходы данного производства (сульфитный щелок, предгидролизат) сравнительно низкой себестоимости. Выход дрожжей из 1 т целлюлозы достигает 37 кг при комплексном получении дрожжей и спирта и 96 кг – при получении только дрожжей. Производительность процесса составляет 2,4 кг/м<sup>3</sup> -ч, содержание сырого протеина в биомассе – 48 %.

Представляется перспективным привлечение в качестве субстрата для получения кормовых дрожжей продуктов совместного гидролиза растительного сырья и ила очистных сооружений. Питательная среда дополнительно обогащается аминокислотами растительного и животного происхождения.

Это увеличивает выход дрожжей и содержание в них белка. Сырьевая база производства микробного кормового белка расширяется также за счет использования гидролизатов торфа, которые содержат в больших количествах легкоусвояемые моносахара, а также органические кислоты. Выход дрожжей достигает 65–68 % от РВ гидролизатов, при этом качество дрожжевой биомассы превосходит дрожжи, выращенные на гидролизатах отходов растительного сырья.

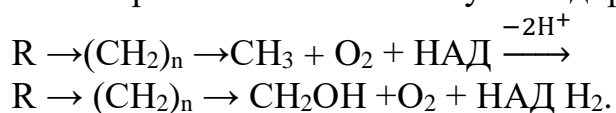
Среди новых источников сырья большой интерес представляют так называемые возобновляемые ресурсы углеводов, получаемые из лигнин-целлюлозных материалов. Данные материалы с целью осахаривания подвергают обработке с использованием традиционных физических и химических, а также биотехнологических методов, например, на основе целлюлолитических ферментов или микробных клеток. Микробные клетки (дрожжи, бактерии, грибы белой гнили) в процессе роста разлагают целлюлозу и обогащают получаемый белковый продукт аминокислотами. Круг таких продуцентов расширяется за счет быстрорастущих представителей не только дрожжей, но и грибов и бактерий, например родов *Trichoderma*, *Cellulomonas*, *Aspergillus* и *Alcaligenes*, обладающих по

сравнению с дрожжами более высокими скоростями роста и лучшим набором аминокислот.

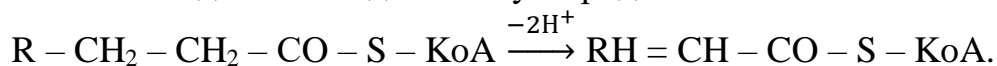
**Субстраты II-го поколения – жидкие углеводороды.** Способность микроорганизмов использовать в качестве основного ростового субстрата углеводороды была доказана Таусоном в 1935 году. Интенсивные научные исследования углеводородов в качестве потенциального субстрата для получения белка одноклеточных были развернуты в 50–60-е годы XX столетия. Было установлено, что микроорганизмами могут усваиваться практически все классы углеводородов, включая прямогонные дизельные фракции, очищенные жидкие парафины, масляные дистилляты и другие нефтепродукты, содержащие n-парафины, но с наибольшими скоростями утилизируются углеводороды нормального строения с длиной углеродной цепи C<sub>11</sub>–C<sub>18</sub>, вскипающие при 200–320 °С.

В качестве штаммов-продуцентов белка одноклеточных на углеводородах наибольшее распространение получили дрожжи рода *Candida*: *C. guilliermondii*, *C. maltosa*, *C. scottii*. Полученные в результате селекционно-генетической работы быстрорастущие штаммы устойчивы к вытеснению другими микробными видами в условиях нестерильной промышленной культуры.

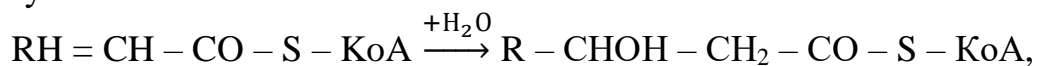
Углеводороды проникают в микробные клетки через липидную фракцию клеточной стенки, имеющей гидрофобную структуру, до цитоплазматической мембраны по градиенту концентрации. Микробиологическое окисление n-парафинов включает несколько этапов. В результате первичного окисления углеводородов образуются спирты:



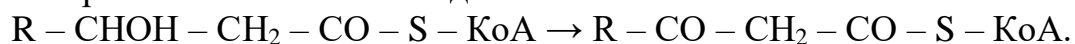
Спирты далее с участием алкогольдегидрогеназы окисляются до альдегидов, которые альдегиддегидрогеназой окисляются до кислот. Далее в реакциях β-окисления при участии ацетил-КоА образуются соответствующие производные кислот, которые при участии ацетилгидрогеназы окисляются с образованием соединений с двойной углеродной связью:



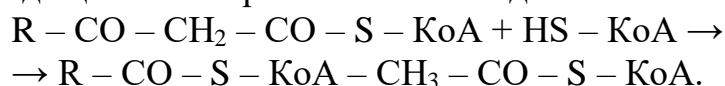
Далее ненасыщенное соединение гидратируется, превращаясь в β-кислоту:



которая восстанавливается до кетокислоты:



Реакции β-окисления завершаются при участии α-кетואцетилтиолазы с образованием ацетил-КоА и жирной кислоты с укороченной на 2 атома углерода цепью по сравнению с исходной кислотой:



Ацетил-КоА-эфир жирной кислоты снова вступает в реакции  $\beta$ -окисления.

При получении белковой биомассы на углеводородах имеются существенные ограничения, так как в исходных парафинах могут присутствовать циклические углеводороды. Поэтому в качестве сырья могут быть использованы только высокоочищенные парафины с содержанием ароматических углеводородов не более 0,01 %. Парафины не растворяются в воде, поэтому культивирование на данном субстрате осуществляется в эмульсии, представляющей собой мелко диспергированные в среде капли углеводородов диаметром не более 5 мкм. В данном случае культура является четырехфазной системой («газ – жидкость – жидкие углеводороды – микробные клетки»).

Кроме перемешивания на эффективность диспергирования углеводородов оказывает влияние также поверхностное натяжение, поэтому очень важен состав и реологические свойства питательной среды. Парафины служат только источником энергии и углерода для микроорганизмов, поэтому все необходимые для роста дрожжей макро- и микроэлементы дозируют в питательную среду в соответствии с потребностями в них культуры. В питательную среду вводятся сульфат аммония, суперфосфат, хлорид калия и раствор микроэлементов, а также ПАВ для снижения поверхностного натяжения и повышения скорости роста дрожжей. Используемая для коррекции рН среды аммиачная вода является также дополнительным источником азота. Содержание парафинов в исходной питательной среде на стадии ферментации составляет 3–5 %. С увеличением концентрации углерода потребности культуры в кислороде возрастают, так как утилизация углеводородов клетками осуществляется в режиме интенсивной аэрации. Потребности углеводород-ассимилирующих дрожжей в кислороде в 2,6–2,8 раза выше по сравнению с процессом на углеводах. Расход воздуха составляет от 20 до 50 м<sup>3</sup> на 1 кг АСВ дрожжей.

Эффективный процесс получения белка одноклеточных на жидких углеводородах реализуется в ферментах типа Б-50, представляющих собой 12-секционный аппарат в виде тора общим объемом 800 м<sup>3</sup> при рабочем объеме 320 м<sup>3</sup>. Каждая секция аппарата снабжена перемешивающим устройством в виде самовсасывающей мешалки турбинного типа и эжекционным устройством. Суспензия в ходе ферментации последовательно проходит все секции.

При этом в 1–9 секциях реализуется активный рост клеток при непрерывном поступлении углеродного субстрата; в последних трех – так называемая стадия «дозревания», в ходе которой подача субстрата прекращается и происходит окисление и доутилизация дрожжами остаточных углеводородов. Такой режим позволяет практически полно утилизировать субстрат и получить продукт с допустимым уровнем остаточных углеводородов (не более 0,01 %).

Окисление углеводородов с большими затратами кислорода сопровождается большим тепловыделением (2,5–3,5 ккал/кг). Поэтому

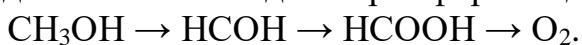
система отвода тепла представляет собой встроенные теплообменники с поверхностью до 3000 м<sup>3</sup> на каждую секцию. Время пребывания культуры в аппарате составляет около 8 ч, скорость протока среды – до 0,22 ч<sup>-1</sup> при стабилизации рН на уровне 4,0–4,5, температуры – 32–34°С. Производительность процесса достигает 27 т в сутки, экономический коэффициент по углеводородам – 1.0–1.2, затраты углеводов – 0.9–1.0 т, кислорода – 2.4–2.8 т/т АСВ. Готовый продукт, БВК, полученный на углеводородах, содержит (%): сырой протеин – до 60, жиры – 5, углеводы – 10–20, зола, влага – до 10; витамин D<sub>2</sub> – до 4000 м.е. и витамины группы В.

К середине 70-х годов технологии получения белка одноклеточных на углеводородах были разработаны всеми развитыми странами. Крупнотоннажные производства БВК были созданы в СССР, Италии, Румынии, Франции. В 1980 г. объемы производства составили: в СССР около 1,0 млн. т/г; 20000 т/г во Франции; 300 000 т/г в Италии; 1500 т/г в Румынии, 5000 т/г в Великобритании. Однако это направление производства белка одноклеточных не получило развития, за исключением России, так как стоимость БВК из углеводов пока не удалось снизить до уровня традиционных кормовых продуктов (соевой и рыбной муки).

**Субстраты III-го поколения – оксидады углеводов, газообразные углеводороды, углекислота, водород.** Перспективными видами сырья для крупнотоннажного получения микробного белка принято считать спирты, природный газ, водород.

Масштабы производства, технологичность низших спиртов и качество получаемого микробного белка выдвинули метанол и этанол в разряд наиболее перспективных субстратов. Исследования процессов микробного синтеза на спиртах с середины 70-х годов были развернуты всеми развитыми странами. Было показано, что способность усваивать метанол присуща как дрожжам (рода *Hansenula*, *Candida*), так и бактериям (*Pseudomonas*, *Methylomonas*).

Усвоение метанола микроорганизмами происходит в результате трех последовательных стадий через формальдегид и формиат до углекислоты:



Преимущества метанола по сравнению с жидкими углеводородами состоят в его прекрасной растворимости в воде, высокой чистоте и отсутствии канцерогенных примесей, высокой летучести. Это позволяет легко удалять его остатки из готового продукта на стадии термообработки и высушивания.

Тепловыделение в ходе ферментации на метаноле также существенно ниже вследствие химического строения спиртов и наличия в их составе кислорода.

Биологическая активность спиртов, проявляющаяся по отношению к посторонней микрофлоре, служит дополнительным фактором, обеспечивающим доминирование в культуре производственных штаммов-продуцентов. Однако горючесть спиртов и возможность образования с воздухом взрывоопасных смесей (диапазон концентраций 6–35 % объемных),

а также токсичность требуют специальных мер, обеспечивающих безопасный режим работы. Питательная среда, помимо спирта (8–10 г/л), содержит все необходимые для нелимитированного роста клеток элементы питания. Помимо традиционных макро- и микроэлементов в среду в качестве дополнительного источника азотного питания и витаминов вводят дрожжевой экстракт (50 мг/л).

Типы используемых режимов ферментации и аппаратуры определяются физиологической спецификой штамма-продуцента. При выращивании дрожжей (*S. boidinii*, *H. polymorpha*) в условиях асептической или частично неасептической ферментации применяются аппараты с вводом энергии жидкой фазой с эжекционными устройствами. Температура культивирования составляет 34–37 °С, рН – 4,2–4,6, скорость протока среды – 0,12–0,16 ч<sup>-1</sup>, экономический коэффициент по метанолу – 0,4. Производительность аппаратов достигает 75 т АСВ в сутки при концентрации клеток в суспензии до 30 г/л. Затраты метанола на синтез биомассы составляют около 2,5 т/т. Получаемые на метаноле дрожжи имеют следующий состав (%): сырой протеин – 56–62, липиды – 5–6, нуклеиновые кислоты – 5–6, зола – 7–11, влажность – не выше 10.

При использовании в качестве продуцента белка одноклеточных бактериальных форм (*Methylomonas clara*, *Ps. rosea*) для ферментации используют струйные аппараты производительностью 100–300 т АСВ в сутки. Процесс проводят при 32–34 °С, рН 6,0–6,4, скорости протока среды 0,5 ч<sup>-1</sup>. Экономический коэффициент по метанолу достигает 0,45, то есть его затраты на получения конечного продукта снижаются до 2,2 т/т. Бактериальная биомасса по сравнению с дрожжевой имеет больше азотсодержащих компонентов (%): сырого протеина – до 74, нуклеиновых кислот – 10–13.

Высокоочищенным субстратом для получения микробного белка пищевого назначения является этанол. Наиболее продуктивные производственные штаммы дрожжей (*S. utilis*, *Hansenula anomala*) обеспечивают получение белкового продукта пищевого назначения с содержанием белка до 60 % при скорости протока среды 0,14 ч<sup>-1</sup> и экономическим коэффициентом по этанолу 0,40–0,45. До недавнего времени вопрос о реализации процесса получения микробного белка на спиртах в промышленных масштабах не казался злободневным из-за достаточно высокой отпускной цены на данный субстрат. Однако в связи с разработкой в последние годы более эффективных технологий получения спиртов и повышением спроса на белковые продукты данная технология становится перспективной.

В 70-е годы с поиском новых доступных источников сырья стали рассматривать возможности привлечения для получения микробного белка газообразных углеводородов, главным образом метана, источником которого служит широко распространенный природный газ. Природный газ, помимо сравнительно низкой стоимости и доступности, характеризуется отсутствием ингибирующих рост микроорганизмов примесей, позволяет получать

сравнительно большие выходы биомассы и не требует специальной очистки ни исходного сырья, ни получаемой биомассы. Продуцентами микробного белка на метане являются бактерии родов *Methylococcus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Methanomonas*, которые утилизируют метан в качестве источника углерода и энергии, окисляя его последовательно стадий через спирт и альдегид до углекислоты:



При использовании метана возникает ряд существенных технологических проблем в связи с особенностями метана. Метан поступает из газовой фазы и имеет низкую растворимость (до 0,02 г/л при нормальном давлении), поэтому скорость его растворения в культуре служит лимитирующим фактором, определяющим скорость роста продуцента. Синтез биомассы сопровождается выделением в околочлеточную среду промежуточных продуктов окисления метана (до 0,2–0,6 г углерода на 1 г синтезированной биомассы), ингибирующих развитие основного производственного штамма. Поэтому используют микробную ассоциацию, в составе которой, помимо метанотрофов, развиваются 5–6 гетеротрофных видов, утилизирующих продукты неполного окисления метана. В связи с высокой восстановленностью метана для его микробного окисления требуется большое количество кислорода (в 5 раз больше, чем на углеводах, и в 2–3 раза больше, чем при окислении жидких углеводородов). Поэтому процесс требует сложного аппаратного оформления стадии ферментации. Выращивание метанотрофных бактерий осуществляется в проточной культуре при 34–38°C и нейтральных значениях рН среды. Питательная среда содержит обычный набор минеральных элементов; источником азота служит как восстановленная, так и окисленные формы. При использовании олигонитрофильных микроорганизмов концентрация азота в среде низка (20–30 мг/л). Потребности в кислороде у микробных клеток в 2–3 раза превышает их потребности в метане. Однако из-за взрывоопасности субстрата стехиометрическое соотношение данных газов принимается не оптимальным для развития бактерий, и процесс реализуют при лимите по кислороду и избытке метана.

Для выращивания метанотрофных бактерий используют аппараты со струйным диспергированием газовой среды, имеющие высокие массообменные характеристики. Для более полного усвоения метана применяют рециркуляцию газовой смеси, повышение рабочего давления в аппарате, а также использование вместо воздуха кислорода. Это позволяет повысить степень утилизации газового субстрата до 95 %. Скорость протока среды в ходе ферментации составляет 0,25–0,30 ч<sup>-1</sup>; концентрация клеток в культуре на выходе из ферментера не превышает 10 г/л. Затраты субстрата на 1 т биомассы составляют для метана и кислорода 1.8–2.2 и 4.5–5.0 т соответственно. Биомасса содержит (%): сырой протеин – до 75, нуклеиновые кислоты – 10, липиды – 5, зола – до 10, влажность – не выше 10. Получаемый белок по содержанию и соотношению аминокислот близок к рыбной муке и соевым шротам.

Крупнотоннажное производство белка одноклеточных на природном газе реализовано в России. Технологию и данный субстрат прогнозно считают перспективными. Однако рентабельность и развитие этого направления во многом будут зависеть от возможности совершенствования аппаратного оформления и интенсификации процесса.

Принципиально новое направление в изыскании перспективных продуцентов белка – привлечение фотоавтотрофных организмов, использующих в качестве углеродного источника углекислоту, а энергии – свет. Исследования водорослей как возможных продуцентов белка проводят несколько десятилетий. Внимание к водорослям определяется способом их питания, химическим составом биомассы, технологичностью. Процесс прироста биомассы водорослей происходит за счет фотосинтеза, поэтому главным фактором, определяющим эффективность, является освещенность. С середины 60-х водоросли (*Chlorella*, *Scenedesmus*) активно рассматривали в качестве перспективных биосинтетиков белка. Однако эти надежды не оправдались из-за малой доступности данных биомасс (неперевариваемые клеточные стенки, необходимость дезинтеграции клеток и очистки белков от токсичного хлорофилла и др.), а также низкой энергетической эффективности фотосинтеза.

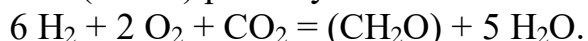
Эффективным белковым продуктом оказались цианобактерии рода *Spirulina*, растущие в природных условиях и способные фиксировать атмосферный азот. Биомасса *Spirulina* содержит (%): до 70 белков, полноценного аминокислотного состава, 19 углеводов, 4 нуклеиновых кислот и 4 липидов, 6 пигментов и по 3 золы и волокон. Клеточная стенка имеет отличный от микроводорослей состав и легко переваривается. Низкий уровень нуклеиновых кислот в биомассе, нетоксичность пигментов фикоцианинов, высокий уровень переваримого белка – все они сделали данную биомассу полноценным белковым продуктом пищевого назначения. При метаболизме белков спирулины в организме человека не образуется холестерин, поэтому данный белок стали рассматривать в качестве компонента диетического питания.

Первые упоминания о спирулине относятся к началу XVI века, когда на базарах в окрестностях Мехико продавали в виде галет высушенную *Spirulina maxima*, растущую в естественных условиях в щелочном озере Текскоко. В середине XIX века бельгийская экспедиция через Сахару на деревенских базарах в районе озера Чад также обнаружила сине-зеленые галеты, представляющие собой высушенную биомассу другой популяции – *Spirulina platensis*, растущей в щелочных прудах, окружающих озеро. Спирулина растет практически как монокультура, так как рН озерной воды в местах ее естественного обитания достигает 10,5–11,0. Благодаря наличию в клетках наполненных газом вакуолей и спиральной форме филаментов, клубки водорослей всплывают на поверхность, и ветер выносит их на берег. Время удвоения биомассы спирулины – около 3–4 дней, и собирать урожай можно круглосуточно. В оптимальных условиях выход биомассы составляет до 20 г

АСВ/м<sup>2</sup> в сутки. Это на порядок превышает урожаи пшеницы, при этом качество получаемого белка существенно выше растительного.

Эксперименты по исследованию биологической ценности спирулины, выполненные Французским институтом нефти совместно с компанией «Соса Текскоко», завершились в 1973 году созданием первой опытной фабрики. К 1982 году производство достигло 1000 т/г. Главными импортерами продукта (мука, таблетки) являются Япония, США, европейские страны. Аналогичные производства по выращиванию спирулины в искусственных условиях планируют Франция, Италия. В Израиле близ г. Хайфа на болотах площадью 12 000 м<sup>2</sup> выращивают водоросль *Spirulina platensis* для кормовых и пищевых целей. Генетическое усовершенствование имеющихся штаммов *Spirulina* может существенно повысить их урожайность. Получены мутанты, у которых при сохранении скорости роста пул аминокислот может быть существенно выше, чем у исходного. Показана возможность выращивания спирулины в искусственных щелочных прудах, а также в отходящих теплых водах теплостанций.

В середине 70-х годов активизировались исследования, направленные на разработку технологий получения микробного белка с использованием хемолитоавтотрофных микроорганизмов. Хемолитоавтотрофные водородокисляющие бактерии, использующие в качестве источника углерода углекислоту, а энергии – реакцию окисления водорода, в середине 70-х годов привлекли внимание биотехнологов. Окисление водорода с образованием биомассы (СН<sub>2</sub>О) реализуется по схеме:



*символ биомассы*

Перспективность водородокисляющих бактерий определяется их автотрофией и независимостью от дефицитных источников органического сырья, быстрым ростом, высоким содержанием полноценного по аминокислотному составу белка, отсутствием внеклеточных промежуточных продуктов обмена органической природы (единственным побочным продуктом процесса окисления водорода является вода), высокой экологической чистотой процесса производства и получаемого продукта. В качестве источника водорода, помимо электролизного, могут быть использованы различные водородсодержащие газы, включая синтез-газ и отходы ряда химических и нефтехимических производств, а углекислоты – топочные газы и экспанзерная углекислота биохимических производств. Таким образом, производство белка одноклеточных на основе водородокисляющих бактерий может выполнять функции очистного сооружения.

Вместе с тем данная технология по ряду показателей (труднорастворимый и взрывоопасный газовый субстрат) имеет ограничения аналогично способу получения белка одноклеточных на метане. Технология получения микробного белка на основе водородных бактерий, реализованная на уровне опытного производства, имеет следующие характеристики при незащищенной проточной ферментации в аппаратах с вводом энергии



жидкой фазой, оснащенных эжекторами или самовсасывающими турбинными мешалками (1500 об/мин): скорость протока среды  $0,4 \text{ ч}^{-1}$ , концентрация клеток в культуре – 10–20 г/л; затраты водорода – 0,7, углекислоты – 2,0, кислорода – 3,0 т на 1 т АСВ биомассы.

В настоящее время по сравнению с легкодоступным и сравнительно дешевым природным газом биотехнология на основе водорода считается менее доступной для организации крупнотоннажного производства белка одноклеточных. Однако в связи с прогнозами развития водородной энергетики и высокой экологической чистотой данный процесс, несомненно, представляется перспективным.

Таким образом, для эффективного восполнения имеющегося дефицита белка могут быть реализованы различные нетрадиционные биотехнологии с привлечением разнообразных субстратов и штаммов-продуцентов. История микробного белка только начинается, и если сегодня белки одноклеточных принципиально не могут решить проблему существующего белкового дефицита, в последующие годы они будут играть все большую роль в жизни человека.

#### **4.3 Микробиологическое получение целевых продуктов.**

Аминокислоты с каждым годом находят все большее применение в качестве кормовых и пищевых добавок и приправ, сырья фармацевтической и парфюмерной промышленности. Все аминокислоты, из которых состоят белки, являются L-формами. Из 20 аминокислот 8 (изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, валин, фенилаланин) незаменимы для человека. Для сельскохозяйственных животных этот список дополняют гистидин и аргинин, а для молодняка птицы – еще и пролин. Поэтому в больших количествах аминокислоты употребляют для балансировки кормов. Введение в состав комбикормов аминокислот сокращает расход дефицитных белков животного происхождения. За последние 10 лет количество аминокислот, используемых в кормопроизводстве, возросло в 15 раз. Это составляет около 70 % от объема их производства. Около 30 % производимых аминокислот используется в пищевой промышленности. Так, цистеин предотвращает пригорание пищи в процессе приготовления, улучшает качество хлеба при выпечке, усиливает запах пищи. Глицин, обладающий освежающим, сладковатым вкусом, используется при производстве напитков. Глутаминовая кислота – для усиления вкуса и консервирования пищи. Ряд аминокислот (аргинин, аспарат, цистеин, фенилаланин и др.) применяют в медицине. Аминокислоты широко используют в химической и фармацевтической промышленности в качестве предшественников для производства детергентов, полиаминокислот, полиуретана и препаратов для сельского хозяйства.

Получение аминокислот возможно несколькими путями: химическим синтезом, гидролизом природного белкового сырья и в биотехнологических

процессах. Химический синтез дает рацемат – продукт, содержащий как L-, так и D-формы аминокислот.

За исключением глицина, который не имеет оптически активных изомеров, и метионина, усвояемого организмами в обеих формах, D-изомеры обладают токсичностью. Получение оптически активных L-изомеров аминокислот из гидролизатов природных материалов растительного и животного происхождения связано с многоступенчатой и дорогостоящей очисткой. Биотехнологическое получение аминокислот включает в себя прямую микробную ферментацию, а также микробиологический или ферментативный синтез из предшественников.

Микробиологический метод получения аминокислот, наиболее распространенный в настоящее время, основан на способности микроорганизмов синтезировать все L-аминокислоты, а в определенных условиях – обеспечивать их сверхсинтез.

Биосинтез аминокислот в микробных клетках протекает в виде так называемых свободных аминокислот или «пула аминокислот», из которого в процессах конструктивного метаболизма синтезируются клеточные макромолекулы. Для синтеза всех белков требуется 20 аминокислот.

Пути синтеза большинства аминокислот взаимосвязаны. При этом одни аминокислоты являются предшественниками для биосинтеза других. Пируват – предшественник аланина, валина, лейцина; 3-фосфоглицерат – серина, глицина, цистеина; щавелево-уксусная кислота – аспартата, аспарагина, метионина, лизина, треонина, изолейцина;  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота – глутамата, глутамина, аргинина, пролина; фосфоэнолпируват+эритрозо-4-фосфат – фенилаланина, тирозина, триптофана; 5-фосфорибозил-1-пирофосфат + АТФ – гистидина.

Синтез каждой аминокислоты в микробных клетках реализуется в строго определенных количествах, обеспечивающих образование последующих аминокислот, и находится под строгим генетическим контролем. Контроль осуществляется по принципу обратной связи на уровне генов, ответственных за синтез соответствующих ферментов (репрессия), и на уровне самих ферментов, которые в результате избытка образующихся аминокислот могут изменять свою активность (ретроингибирование). Данный механизм контроля исключает перепроизводство аминокислот и также препятствует их выделению из клеток в окружающую среду. Чтобы добиться сверхсинтеза отдельных аминокислот, нужно обойти или изменить данный контрольный механизм их синтеза. Для первого пути возможно использование природных «диких» штаммов; очень существенны при этом условия ферментации, так как добиться дисбаланса в системе синтеза аминокислот можно путем изменения ряда основных факторов среды (концентрация основного субстрата, pH, соотношение макро- и микроэлементов в среде и др.).

Изменение контрольного механизма синтеза аминокислот осуществляется генетическими методами. При этом получают мутантные организмы: ауксотрофные и регуляторные мутанты. Ауксотрофные мутанты

– это организмы, утратившие способность к синтезу одной или нескольких аминокислот.

Среди продуцентов аминокислот – различные микроорганизмы, представители родов *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Microbacterium*, *Escherichia*. Используемые в промышленности микроорганизмы можно подразделить на несколько классов: дикие штаммы, ауксотрофные мутанты, регуляторные мутанты и ауксотрофные регуляторные мутанты. Промышленные штаммы, как правило, несут несколько мутаций, затрагивающих механизмы регуляции целевой аминокислоты и ее предшественников.

Для получения таких аминокислот, как L-глутамата, L-валина, L-аланина, L-глутамин и L-пролина, возможно применение природных штаммов и усиление у них продукции аминокислот условиями ферментации. Например, высокий, до 30 г/л, выход глутамата возможен при полном или частичном подавлении активности  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы, добавках в среду ПАВ и антибиотиков (пенициллина, цефалоспорины) для увеличения проницаемости клеточных мембран для глутамата.

Синтез L-глутамата можно переключить на образование L-глутамин или L-пролина, изменяя условия ферментации. При повышении концентрации ионов аммония и биотина в среде стимулируется образование L-пролина; слабокислая среда и ионы цинка при избытке аммония усиливают синтез L-глутамин.

Ауксотрофные мутанты используют в тех случаях, когда необходимо синтезировать аминокислоты, являющиеся конечными продуктами разветвленных цепей метаболических реакций аминокислот. Например, для получения L-лизина, L-треонина, L-метионина или L-изолейцина, для которых общим предшественником служит L-аспартат, применяют мутанты, ауксотрофные по гомосерину или треонину и гомосерину. Ауксотрофные мутанты не способны образовывать ингибиторы соответствующего метаболического пути, работающие по принципу отрицательной обратной связи из-за отсутствия определенной ключевой ферментативной реакции. Поэтому при выращивании такого штамма в среде с минимальной концентрацией необходимого ингредиента (аминокислоты) они способны на суперпродукцию аминокислоты-предшественника. Ауксотрофные мутанты, способные накапливать конечные продукты неразветвленных цепей биосинтеза, например L-аргинина, невозможны. В данной ситуации приходится получать мутанты с частично нарушенной регуляцией биосинтеза, так как это позволяет повысить выход целевого продукта. Такие организмы – регуляторные мутанты.

Регуляторные мутанты отбирают по устойчивости к аналогам аминокислот либо среди ревертантов ауксотрофов. Аналоги аминокислот выступают в роли искусственных ингибиторов ферментов, работающих по принципу обратной связи, одновременно обеспечивая биосинтез требуемых аминокислот и подавляя процесс их включения в белки. Так, серусодержащий аналог лизина S-(2-аминоэтил)-L-цистеин является у

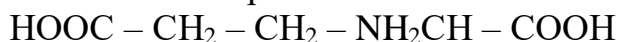
*Brevibacterium flavum* ложным и действует ингибитором аспараткиназы по принципу обратной связи. Поэтому устойчивые к его действию мутанты, у которых выход лизина достигает 33 г/л, синтезируют фермент, в 100 раз менее чувствительный к ингибированию по механизму обратной связи, по сравнению с исходным штаммом. Регуляторные мутанты получают путем трансдукции, проводя при этом отбор отдельных мутаций, вызывающих полное рассогласование механизмов регуляции, а затем объединяя данные признаки путем ко-трансдукции. В результате этого у одного штамма можно последовательно закрепить устойчивость к нескольким аналогам. В последние годы для получения новых эффективных штаммов-продуцентов аминокислот стали применять новейшие методы биотехнологии. Методы генетической инженерии позволяют повышать количество генов биосинтеза путем их клонирования на плаزمиды. Это приводит к увеличению количества ферментов, ответственных за синтез аминокислот, следовательно, повышает выход целевого продукта. Клонирование генов системы синтеза аминокислот в клетки микроорганизмов с иным, по сравнению с донорским организмом, типом питания позволяет расширять сырьевую базу и заменять дорогостоящие сахаросодержащие субстраты более дешевыми.

Производственные биотехнологические процессы получения аминокислот реализуются в условиях глубокой аэробной периодической ферментации. Скорость синтеза аминокислот не совпадает во времени со скоростью роста производственной культуры.

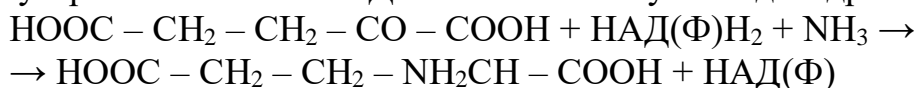
Максимальная продукция аминокислоты наступает, как правило, когда прирост биомассы практически прекращается. Поэтому питательная среда на первом этапе ферментации должна обеспечивать сбалансированный рост клеток; а на втором – условия для сверхсинтеза целевой аминокислоты. В качестве источника углерода и энергии используют богатые сахаросодержащие субстраты, главным образом, мелассу. Возможно также привлечение более доступных субстратов (ацетат, сульфитный щелок, углеводороды). В зависимости от таксономического положения и физиологических потребностей микроорганизмов в качестве источника азота используют соли аммония, нитраты, а также аминокислоты и молекулярный азот. В состав среды вносят необходимые количества углерода и азота, фосфатов и других солей, а также стимуляторы роста (витамины, дрожжевой экстракт), ПАВ, антибиотики. Периодический режим ферментации и богатая по составу среда требуют соблюдения строгой стерильности в ходе получения инокулята и на ферментационной стадии. Стерилизации подвергаются питательная среда, воздух и все технологическое оборудование. После стадии ферментации в процессе обработки культуральной жидкости клетки отделяют от раствора, который далее подвергают очистке от окрашенных примесей и взвешенных частиц с помощью сорбционных методов. Далее процесс проводится с использованием различных методов выделения и очистки в зависимости от сферы применения конечного продукта. Для фармакологии и пищевой промышленности аминокислоты выпускают в виде высушенных чистых

кристаллических препаратов; для кормовых и технических целей используют стабилизированную и сконцентрированную культуральную жидкость.

**Технология получения глутаминовой кислоты.** L-глутаминовая кислота ( $\alpha$ -аминоглутаровая) – первая аминокислота, полученная на основе промышленного микробиологического синтеза:



Глутаминовая кислота является важнейшей аминокислотой растительных и животных белков, не будучи незаменимой. Синтез глутаминовой кислоты происходит в цикле трикарбоновых кислот (слайд) в результате ферментативного восстановительного аминирования 2-кетоглутаровой кислоты НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназой:



2-кетоглутаровая кислота образуется в свою очередь из изолимонной кислоты под воздействием изоцитратдегидрогеназы. Необходимый для синтеза глутаминовой кислоты НАД(Ф)Н постоянно регенерируется в процессе окисления изолимонной кислоты в 2-кетоглутаровую.

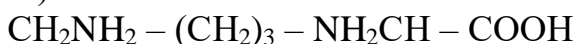
Возможность получения глутаминовой кислоты из углеводов на основе микроорганизмов впервые была продемонстрирована в 1957 году японскими исследователями Киносита, Асаи и др. Продуцировать глутаминовую кислоту способны дрожжи, микроскопические грибы, бактерии. Бактерии обеспечивают наибольший выход по отношению к использованному углеродному субстрату (не менее 40–50 %). Промышленное значение имеют бактериальные культуры (*Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*). Сверхсинтез кислоты у диких штаммов возможен в специальных физиологических условиях при торможении скорости роста и увеличении проницаемости клеточной мембраны для глутаминовой кислоты. Такие условия обеспечивает определенная концентрация биотина в среде (1–5 мкг/л), а также присутствие некоторых антибиотиков. Внутриклеточная концентрация глутаминовой кислоты снижается в результате экскреции продукта в околочлеточную среду, поэтому регуляция синтеза конечным продуктом ослабевает. Сверхпродукция глутаминовой кислоты связана также с высокой концентрацией аммония в среде, высокой активностью НАД(Ф)Н-зависимой глутаматдегидрогеназы и отсутствием или дефектом  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы, катализирующей превращение 2-кетоглутарата в янтарную кислоту.

Глутаминовая кислота в основном используется в фармакологии и пищевой промышленности, поэтому задача постферментационной стадии – получение высокоочищенных препаратов. Для этого на первом этапе обработки культуральной жидкости в нее добавляют негашеную известь или известковое молоко. После этого избыток ионов осаждают кислотой, осадок удаляют центрифугированием. Фильтрат после осветления активированным углем и сорбции на ионообменных смолах концентрируют вакуум-выпариванием при 40–60 °С. Осаждение кристаллов глутаминовой кислоты проводят в изоэлектрической точке (рН 3,2 при 4–15 °С). В результате

перекристаллизации чистота продукта достигает 99.6 %. Кристаллы кислоты отделяют от маточника центрифугированием, промывают и высушивают. Если нужно получить глутамат натрия, кристаллы глутаминовой кислоты обрабатывают гидроокисью натрия. Для этого влажные кристаллы растворяют в воде, нейтрализуют 50 %-м раствором едкого натра. Полученный раствор фильтруют, упаривают под вакуумом до содержания сухих веществ 60 % и направляют на перекристаллизацию. Полученные кристаллы глутамата натрия выделяют из маточного раствора центрифугированием и высушивают током горячего воздуха.

Глутамат натрия усиливает вкус многих пищевых продуктов, способствует длительному сохранению вкусовых качеств консервированных продуктов (овощей, рыбы, мясных продуктов). За рубежом глутамат натрия добавляют во все продукты не только при консервировании, но и при замораживании и просто хранении. В Японии, США и других странах глутамат натрия является обязательной принадлежностью стола аналогично соли, перцу, горчице. Глутаминовая кислота не только повышает вкусовую ценность пищи, но также стимулирует пищеварение. Важное свойство глутаминовой кислоты – служить защитным фактором при отравлениях внутренних органов (печени, почек), ослаблять действие токсинов и усиливать ряд фармакологических препаратов. В настоящее время производство глутаминовой кислоты – крупнотоннажное биотехнологическое производство (около 400 000 т/г), объемы ее производства возрастают с каждым годом. Ведущие странами производители глутаминовой кислоты и глутамата – Япония и США.

**Технология получения лизина.** L-Лизин ( $\alpha$ ,  $\epsilon$ -аминокапроновая кислота)



в организме высших животных и человека определяет биологическую ценность переваримого белка. Данная аминокислота выполняет также много других важнейших биохимических функций – способствует секреции пищеварительных ферментов и транспорту кальция в клетки, улучшает общий азотный баланс в организме. Добавление лизина в состав комбикормов увеличивает усвояемость белка животными и снижает расход кормов на производство животноводческой продукции.

Синтез L-лизина у микроорганизмов осуществляется различными путями. Дрожжи, грибы и микроводоросли синтезируют лизин из  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты через  $\alpha$ -аминоадипиновую кислоту. Вследствие малой изученности этого биосинтетического пути получение мутантов – суперпродуцентов лизина через аминоксадипиновый путь представляется проблематичным. Высшие растения и бактерии синтезируют лизин по другой схеме – через  $\alpha$ -диамино-пимелиновую кислоту. По этой разветвленной схеме биосинтеза L-лизина (диаминопимелиновый путь) синтез начинается с аспарагиновой кислоты и проходит через диаминопимелиновую кислоту. Помимо L-лизина, аспарагиновая кислота является также предшественником для L-метионина, L-треонина и L-изолейцина. Ключевым местом в синтезе

лизина является аспараткиназа; она ингибируется треонином. Присутствие лизина этот эффект усиливает. Треонин ингибирует дегидрогеназу полуальдегида аспарагиновой кислоты, а также гомосериндегидрогеназу. Метионин является репрессором по отношению к гомосериндегидрогеназе, а изолейцин ингибирует треониндегидрогеназу. Продукты обмена, угнетающие различные ферменты и участвующие в синтезе лизина, следует вывести из реакции. Именно поэтому для производства L-лизина используют различные ауксотрофные мутанты.

Производственные штаммы-продуценты лизина – это ауксотрофные штаммы глутаматпродуцирующих коринебактерий (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*). Применяют три типа ауксотрофных мутантов: ауксотрофы по гомосерину или треонину с подавленной гомосеринкиназой; метионин- и треонинчувствительные штаммы с существенно сниженной активностью гомосериндегидрогеназы; аналогорезистентные прототрофные продуценты лизина, устойчивые к треонину и аминокотицилцистеину, с аспараткиназой, нечувствительной к согласованному ингибированию лизином и треонином. Получены штаммы, обеспечивающие 40 %-ю конверсию углеродного субстрата в аминокислоту и выходы лизина на сахарах до 40, уксусной кислоте – до 70 г/л.

Микробиологический процесс производства лизина аналогичен процессу получения глутаминовой кислоты, однако использование ауксотрофных микроорганизмов требует специального состава питательных сред, которые подбираются индивидуально для каждого штамма. Очень важно также осуществлять на стадии ферментации стабилизацию основных параметров культуры в строгом соответствии с технологическим регламентом данного производства, так как выход лизина зависит от температуры среды, концентрации кислорода, длительности ферментации, дозы и возраста посевного материала. Помимо сахаров (7–12 % по объему), сульфата аммония и фосфатов калия, в среду вносят кукурузный экстракт в качестве источника биологически активных веществ (1.2–1.5 % по содержанию сухих веществ), а также мел и синтетический пеногаситель. Среда должна содержать (в л): 200 мг метионина, 800 мг треонина, 15–20 мкг биотина (при меньших концентрациях биотина синтезируется глутаминовая кислота, при 2.5 мг – молочная кислота как механизм обратного действия). Соотношение углерода и азота в среде оптимально как 11:1 (при его увеличении выход лизина падает, при уменьшении – накапливается аланин).

Культивирование осуществляется в строго стерильной глубинной аэробной периодической культуре в аппаратах объемом 50 и 100 м<sup>3</sup> при коэффициенте заполнения 0.75. Процесс длится 48–72 ч при 29–30 °С, контролируемом рН 7.0–7.5, непрерывном перемешивании и избыточном давлении 20–30 кПа.

Уровень аэрации составляет 1 м<sup>3</sup> воздуха/м<sup>3</sup> среды в минуту. При ухудшении условий аэрации происходит образование молочной кислоты. Для пеногашения используют кашалотовый жир или синтетические масла (0.5 % от объема среды). В первые сутки потребляется около 25 % сахаров и

почти все аминокислоты, при этом образуется практически вся биомасса. Далее на фоне резкого снижения скорости роста клеток наблюдается самая высокая скорость синтеза лизина (до 1.0 г/л ч). Для стабилизации рН периодически проводят подтитровку культуры 25 %-м раствором аммиака. При дополнительном дробном введении в аппарат углеводов и азота выход лизина можно повысить. Конечная концентрация кислоты достигает 40 г/л при остаточной концентрации сахаров около 0.5–1.0 г/л.

Эффективный процесс получения лизина реализован на более доступном субстрате – уксусной кислоте. Токсичность данного субстрата делает необходимой дробную подачу ацетата; его концентрация в среде не должна превышать 2 %. Небольшие добавки сахара в среду (около 1 %) повышают выход лизина на 30–50 %. Экономический коэффициент по потребляемому ацетату при этом составляет 27 %. Конечная концентрация лизина в среде достигает 40–50 г/л. В последние годы получены мутантные штаммы *V.flavum*, обеспечивающие на ацетатной среде выход лизина до 73 г/л.

Практически весь производимый микробиологическим способом L-лизин используется в кормопроизводстве для повышения усвояемости и питательности кормов. Поэтому выпускается лизин, главным образом, в виде кормовых препаратов – жидкого концентрата лизина (ЖКЛ) и кормового концентрата лизина (ККЛ).

При производстве ЖКЛ культуральную жидкость, предварительно стабилизированную 25 %-м раствором гидросульфита натрия, подкисляют соляной кислотой до рН 4.5–5.0. Образующийся при этом термостабильный монохлорид лизина упаривают в вакуумно-выпарных аппаратах до 40 % содержания сухих веществ. Готовый препарат ЖКЛ не замерзает при температуре до минус 18 °С и сохраняет свои свойства в течение 3 месяцев.

ККЛ получают на основе ЖКЛ, высушивая жидкий концентрат в распылительных сушилках при температуре не более 90 °С до остаточной влажности 4–8 %. Сухой препарат лизина гигроскопичен и в процессе хранения подвержен порче. Для устранения данного нежелательного явления в концентрат перед высушиванием вводят наполнители в виде костной муки, бентонита, негашеной извести, пшеничных отрубей. Высушивание полученной пасты проводят конвективным способом на вальцево-ленточных сушилках. Препарат по составу близок к жидкому концентрату лизина и содержит (в %): 7–10 лизина, 15–17 белка, до 14 других аминокислот, 10–13 бетаина и 20–25 зольных веществ. Препарат сыпуч и негигроскопичен. Срок его хранения возрастает до 1 года.

#### ***Технология получения триптофана.***

L-Триптофан ( $\alpha$ -амино- $\beta$ -индо-лилпропионовая кислота) относится к незаменимым аминокислотам:



Триптофан, наряду с другими ароматическими аминокислотами, фелиаланином и тирозином, в последние годы находит все большее применение. Отсутствие или дефицит триптофана в организме приводит к



ряду тяжелых заболеваний (диабет, туберкулез, пеллагра). Используется триптофан в биохимических исследованиях, в небольших количествах – в животноводстве.

В общем виде последовательность биосинтетических реакций образования триптофана следующая:

эритрозо-4-фосфат + фосфоеноилпирувиноградная кислота →  
→ 7-фосфо-3-дезоксид-арабиногептулозная кислота →  
→ 5-дегидрошикимовая кислота → шикимовая кислота →  
→ хоризмовая кислота → анраниловая кислота → триптофан.

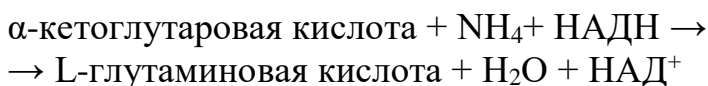
Шикимовая кислота – основной промежуточный продукт, из которого через 5-фосфо-3-енолпирувилшикимовую кислоту образуется хоризмовая кислота. Данная стадия является ключевой для синтеза ароматических аминокислот.

Микробиологический синтез L-триптофана реализуется на основе мутантных штаммов дрожжей (*Candida*) и бактерий (*E. coli*, *Bacillus subtilis*), дефицитных по тирозину и фенилаланину. Промышленный синтез L-триптофана осуществляется на основе сахаров. Исходная питательная среда для стерильного периодического выращивания дрожжей содержит (в %): сахароза 10, мочевины 0.5, кукурузный экстракт 2.0, а также хлорид кальция, калий фосфорнокислый и сульфат магния. Продолжительность периодической ферментации при 37 °С не превышает 48 ч. В ходе постферментационной стадии триптофан выделяют из культуры по обычным схемам. Для получения очищенного кристаллического препарата работают с культуральной жидкостью. Для получения кормового концентрата используют и биомассу клеток.

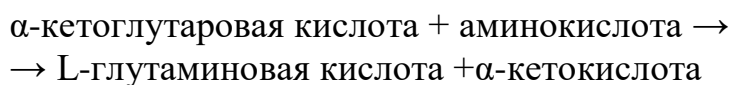
**Двухступенчатое получение аминокислот из биосинтетических предшественников** выбирают в тех случаях, когда предшественник недорог, а прямая микробная ферментация недостаточно экономична или разработана.

При микробиологическом синтезе аминокислот из предшественников удается значительно понизить репрессию или ретроингибирование, так как в результате внесения в среду готового интермедиата снимаются проблемы, связанные с наличием генетического контроля в системе синтеза аминокислот.

При двухступенчатом способе получения глутаминовой кислоты из α-кетоглутаровой, играющей роль предшественника, необходим источник данного предшественника и ферментная система, катализирующая превращение кетоглутарата в целевую аминокислоту. Кетоглутарат получают микробиологическим синтезом на основе бактерий (*Pseudomonas*, *Escherichia*) или дрожжей (*Candida*) – I ступень. На II ступени можно получить L-глутаминовую кислоту в реакции восстановительного аминирования с помощью культуры *Pseudomonas*, имеющей сильную глутаматдегидрогеназу:



L-глутаминовая кислота также может быть получена из кетоглутарата через переаминирование последней с участием трансамидазы:



II ступень по данной схеме может быть реализована культурой *E. coli*, в качестве донора аминокислот могут выступать аланин или аспарагиновая кислота.

Комбинированный, принципиально новый способ получения L-лизина в 1973 году был предложен японской фирмой «Тойо Рейон» («Торей»). Конечный продукт, получаемый по данной технологии, отличается высокой концентрацией и чистотой. На первой стадии циклогексан в результате химических реакций превращается в циклический ангидрид лизина (D, L - $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактама). На второй стадии осуществляют разделение оптических изомеров с помощью ферментов; происходящий при этом асимметрический гидролиз с участием гидролазы аминокaproлактама приводит к образованию L-лизина. Гидролазу L- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактама синтезируют дрожжи (*Candida*, *Trichospora*, *Cryptococcus*), фермент стимулируется ионами марганца, магния и цинка. Источником рацемазы аминокaproлактама могут служить бактерии (*Flavobacterium*, *Achromobacter*). Оба эти фермента, обладающие рацемазной и гидролазной активностями, в виде определенного количества биомассы вводят на II ступени в водный раствор предшественника – DL-аминокaproлактама. В ходе ферментативных реакций из предшественника образуется L-лизин, чистота препарата – выше 99 %. Помимо микробной биомассы, источником превращений DL-аминокaproлактама в лизин могут служить изолированные иммобилизованные ферменты. Раствор предшественника пропускают через колонку, содержащую оба иммобилизованных фермента: один из них (гидролаза) гидролизует амидную связь в L-аминокaproлактаме, не затрагивая D-формы предшественника; второй (рацемаза) – превращает D-изомер в рацемат с высокой скоростью. Выход L-лизина может составлять до 95 %.

L-триптафан также можно получать из предшественника – антраниловой кислоты. На первом этапе по традиционной микробиологической схеме с использованием дрожжей *Candida utilis* в течение 20–24 ч проводят процесс ферментации в условиях интенсивной (около 7 г O<sub>2</sub>/л.ч) аэрации. Среда содержит мелассу (10.4 %), мочевины, сульфат магния, фосфаты калия. Для пеногашения используют кашалотовый жир и синтетические кремнеорганические соединения. Далее интенсивность аэрации снижают вдвое, в культуру периодически вносят растворы мочевины, мелассы и антраниловой кислоты.

В течение 22–24 ч наращивают биомассу – источник ферментов; в течение последующих 120 ч происходит собственно трансформация

антраниловой кислоты в аминокислоту. Общее время процесса составляет около 140 ч, выход триптофана – 60 г/л.

Большие успехи в биотехнологии аминокислот были достигнуты с формированием методов инженерной энзимологии, в частности, с развитием техники иммобилизации ферментов.

Первым процессом промышленного использования иммобилизованных ферментов был процесс для разделения химически синтезированных рацемических смесей D- и L-форм аминокислот, разработанный в Японии в 1969 году (предыдущие 15 лет процесс проводился компанией «Танабе Сейяку» с применением растворимых ферментов – аминоксилаз). В качестве исходного материала используют раствор ацилпроизводных синтезированных химическим путем LD-форм аминокислот, который пропускают через колонку с иммобилизованной L-аминоксилазой. Последняя гидролизует только ацил-L-изомеры, отщепляя от них объемную ацильную группу и тем самым резко увеличивает растворимость образующейся L-аминокислоты по сравнению с присутствующими в реакционной смеси ацил-D-изомерами. Далее смесь легко разделяется обычными физико-химическими методами. Компанией на промышленном уровне по данной технологии реализован синтез нескольких L-аминокислот, в том числе метионина, валина, фенилаланина, триптофана. Представляет интерес процесс получения аспарагиновой кислоты из химических предшественников (фумаровой кислоты и аммиака) на основе фермента аспартазы, разработанный японской фирмой «Танабе Сейяку». Фермент в одну стадию присоединяет молекулу аммиака к двойной связи фумаровой кислоты с образованием оптически активной L-аспарагиновой кислоты. Выход продукта составляет 99 %, процесс реализуется непрерывно в колонке объемом 1 м<sup>3</sup>. Производительность достигает 1700 кг чистой L-аспарагиновой кислоты в день на один реактор.

Дегидрогеназы аминокислот (лейцин- и аланиндегидрогеназы), катализирующие обратимые реакции дезаминирования, применяют в непрерывных процессах синтеза аминокислот из соответствующих кето-аналогов. Глутаматсинтетаза, катализирующая АТФ-зависимую реакцию аминирования глутамата, используется для получения глутамина с 92 %-м выходом. L-тирозин-фенол-лиаза, катализирующая реакцию элиминации, в которой тирозин распадается с образованием фенола, аммиака и пирувата, используется для энзиматического получения последнего. L-триптофан-индол-лиаза может быть использована для получения L-триптофана из индола, пирувата и аммиака.

Высокая потребность в аминокислотах непрерывно стимулирует разработку принципиально новых и более эффективных биотехнологических способов их получения при наращивании темпов и объемов промышленного производства.

#### 4.4 Органические кислоты

Органические кислоты широко используют в пищевой и фармацевтической промышленности, в технике и в качестве химического сырья. Отдельные органические кислоты (лимонную, яблочную) можно получать экстракцией из природного растительного сырья; другие (уксусную, молочную) – в процессах органического синтеза. Более 50 органических кислот могут быть получены на основе микробиологического синтеза. Биотехнологические методы их получения к настоящему времени детально разработаны. Более того, принято считать, что органические кислоты, полученные в результате микробиологического синтеза, для использования человеком предпочтительнее в сравнение с синтетическими кислотами. Для технических нужд органические кислоты получают химическим путем; применяемые в пищевой и фармацевтической промышленности – в различных биотехнологических процессах.

Это производства лимонной, молочной, уксусной, итаконовой, пропионовой и глюконовой органических кислот (молочная и уксусные кислоты производятся также и химическим путем).

Органические кислоты в системе микробного метаболизма являются продуктами деградации источника энергии и углерода. Так, лимонная, изолимонная, кетоглутаровая, янтарная, фумаровая и яблочная кислоты – интермедиаты цикла трикарбоновых кислот у большинства аэробных микроорганизмов. Глюконовая, кетоглюконовая и винная кислоты – промежуточные продукты прямого окисления глюкозы (без фосфорилирования) некоторых аэробных бактерий и грибов. Молочная, масляная и пропионовая кислоты служат конечными продуктами метаболизма углеводов у анаэробных бактерий. Уксусная кислота – продукт окисления этанола, а алифатические моно- и дикарбоновые кислоты – промежуточные продукты окисления нормальных алканов. Таким образом, возможности микроорганизмов для получения на основе их метаболизма органических кислот велики.

Для сверхсинтеза отдельных кислот нужны селективные, строго определенные условия. При сбалансированном росте микроорганизмов на полноценной среде накопления органических кислот не происходит, так как, будучи промежуточными продуктами в системе микробного метаболизма, органические кислоты – исходный материал для синтеза других макромолекул.

Время максимальной скорости образования в клетке органических кислот, как и многих других метаболитов, не совпадает во времени со скоростью размножения клеток и накоплением биомассы. Сверхсинтез органических кислот наблюдается при торможении скорости роста продуцента и блокировании процессов биосинтеза, требующих участия кислот в качестве субстрата, то есть при нарушении процессов диссимиляции имеющегося эндогенного субстрата и процессов синтеза основных (азотсодержащих) компонентов клетки. Такими условиями, как правило,

служат полное или избыточное содержание в среде источника углерода и энергии и дефицит биогенных элементов, ограничивающих рост клеток. Большинство органических кислот получают, лимитируя рост клеток-продуцентов дефицитом азота или фосфора при избытке углеродсодержащего субстрата. Поэтому микробиологические процессы получения органических кислот двухфазные: на первом этапе обеспечивается так называемый сбалансированный рост при максимальном накоплении биомассы и потреблении углеродного и энергетического субстрата, а также лимитирующего биогена; на втором – происходит замедление скорости роста клеток. В результате этого прирост биомассы прекращается и начинается интенсивное кислотообразование. Длительность фазы интенсивного кислотообразования определяется наличием углеродсодержащего субстрата в среде. Важным условием кислотообразования большинства органических кислот (за исключением молочной) является хороший режим аэрации, а также величина рН среды.

Способность продуцировать ту или иную кислоту – широко распространенное среди микроорганизмов свойство. В качестве производственных культур используют специально подобранные штаммы, продуцирующие целевую кислоту в виде монопродукта с высокими выходами и эффективным усвоением углеродного субстрата. При многих производствах органических кислот экономический коэффициент по углероду достигает 90 % и выше. В качестве продуцентов используют бактериальные, дрожжевые и грибные культуры (*Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*). Способы ферментации в микробиологических процессах производства органических кислот разнообразны. Среди них – поверхностные жидко- и твердофазные процессы, а также глубинные, включая проточные культуры. В последние годы разработаны принципиально новые и эффективные биотехнологии с использованием иммобилизованных целых клеток и ферментов. Также разнообразны и субстраты, используемые в производстве органических кислот. Применяемые в начале века глюкоза и сахароза со временем стали заменять более доступными комплексными средами (мелассой, гидролизным крахмалом); в 60-е годы были разработаны новые процессы получения органических кислот на жидких парафинах нефти.

**Получение лимонной кислоты.** Лимонная кислота ( $\text{CH}_2 - \text{COOH} - \text{CONHCOOH} - \text{CH}_2\text{COOH}$ ) – трехосновная оксикислота, широко распространенная в плодах и ягодах. Она широко применяется в пищевой промышленности при производстве кондитерских изделий и напитков, в фармацевтической, химической и текстильной промышленности. Лимонная кислота была идентифицирована в качестве продукта метаболизма плесневых грибов в 1893 году Вемером. В настоящее время это кислота по объемам производства (свыше 350 тыс. т/г) занимает первое место среди всех органических кислот.

У микроорганизмов синтез лимонной кислоты реализуется в цикле дикарбоновых кислот и осуществляется в результате конденсации кислоты с

четырьмя атомами углерода и двумя карбоксильными группами и кислоты с одной карбоксильной группой. Образующая в результате гликолиза пирувиноградная кислота связывается с углекислотой; синтезируемая при этом щавелево-уксусная кислота реагирует с уксусной кислотой с образованием лимонной кислоты, то есть образование лимонной кислоты включает реакции гликолиза и ряд реакций цикла Кребса. При каждом обороте цикла молекула щавелево-уксусной кислоты взаимодействует с уксусной, образуя лимонную кислоту.

Производство лимонной кислоты методом ферментации плесневых грибов принадлежит к числу давних биотехнологических процессов. Первое производство было реализовано в конце XIX века. Совершенствование процесса получения лимонной кислоты тесно связано с разработкой многих фундаментальных аспектов микробиологии (борьбой с микробным загрязнением производственной культуры, оптимизацией состава питательных сред, селекцией высокопродуктивных штаммов и др.).

В промышленном производстве лимонной кислоты в качестве продуцента в основном используют *Aspergillus niger*, но также применяют и *A. wentii*. Процесс ферментации достаточно сложен, так как лимонная кислота-продукт первичного метаболизма грибов, и даже незначительное выделение данного продукта в окружающую среду свидетельствует о выраженном дисбалансе клеточного метаболизма. Рост продуцента и синтез кислоты обычно регулируют составом среды (сахара, P, Mn, Fe, Zn). Сверхсинтез лимонной кислоты реализуется при больших концентрациях сахаров в среде (14–24 %) и является ответной реакцией продуцента на дефицит фосфора, а также других металлов, хотя их роль до конца не ясна. Это, видимо, и подавление анаболизма, и влияние на свойства поверхности и морфологию гиф. Оптимум pH на стадии кислотообразования составляет 1.7–2.0. В более щелочной среде процесс сдвигается в сторону накопления щавелевой и глюконовой кислот. В качестве основы среды обычно используют глюкозный сироп, гидролизаты крахмала или мелассу. Последнюю предварительно разбавляют до требуемого уровня сахаров и обрабатывают с целью снижения содержания металлов. Источником азота служат соли аммония (0.2 %), концентрация фосфатов (0.01–0.02 %). В качестве пеногасителей используют природные масла с высоким содержанием жирных кислот. Очень существенное значение имеет уровень аэрации культуры.

В производстве лимонной кислоты применяют несколько вариантов процесса. Поверхностный способ реализуется на твердой сыпучей среде и в жидкой фазе. При жидкофазной поверхностной ферментации питательную среду разливают в кюветы слоем от 8 до 18 см. Кюветы размещают на стеллажах в предварительно простерилизованной парами формалина бродильной камере. Через специальные воздухопроводы с током стерильного воздуха поверхность среды засевают исходной музейной культурой. В качестве посевного материала используют предварительно полученные также в условиях поверхностной культуры и высушенные споры (конидии)

из расчета 50–75 мг конидий на 1 м<sup>2</sup> площади кювет. Известно несколько вариантов процесса: бессменный, бессменный с доливами и метод пленок. При бессменном режиме процесс осуществляется на одной среде от момента засева спор до завершения стадии кислотообразования. При использовании метода пленок через 7 суток после завершения кислотообразования сброженный раствор мелассы сливают из кювет, мицелий промывают стерильной водой и в кюветы заливают новую среду. Бессменный способ с доливом характеризуется дробными добавками мелассы под пленку гриба на стадии кислотообразования (30–35 % от исходного объема), так называемый режим с подпиткой субстратом. Это позволяет повысить выход лимонной кислоты на 15–20 % с единицы поверхности при сокращении затрат сахаров на 10–15 % по сравнению с другими методами. В ходе стадии ферментации на первом этапе (первые 24–36 ч) происходит интенсивный рост мицелия. Температура среды в этот период стабилизируется на уровне 32–34 °С, интенсивность аэрации составляет 3–4 м<sup>3</sup> воздуха в ч/м мицелия. В период активного кислотообразования подачу воздуха увеличивают в 5–6 раз. В результате более интенсивного термогенеза температуру снижают до 30–32 °С. По мере снижения процесса кислотообразования режим аэрации становится менее интенсивным. Контроль процесса ведут по показателям титруемой кислотности среды. Процесс считают завершенным при остаточной концентрации сахаров около 1–2% и уровне титруемой кислотности 12–20 %. Содержание лимонной кислоты от уровня всех кислот достигает 94–98 %. Сброженный раствор сливают в сборник и направляют на обработку; промытый мицелий используют в кормопроизводстве.

Твердофазная ферментация имеет много общего с поверхностно-жидкофазным процессом. Разработанный в Японии процесс Коджи предусматривает использование в качестве среды пористого материала (багасса, картофель, пульпа сахарной свеклы, пшеничные отруби). Материала предварительно стерилизуют, после охлаждения инокулируют суспензией спор.

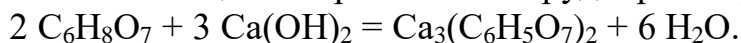
Ферментация происходит в лотках при 25–30 °С в течение 6–7 дней. Образованную лимонную кислоту экстрагируют водой. В Японии 20 % общего объема производства лимонной кислоты получают методом Коджи.

Начиная с 1950 года, промышленные процессы получения лимонной кислоты стали переводить в условия глубокой культуры. Стабильный процесс возможен при его организации в две стадии: рост мицелия на полной среде в ходе первой стадии и на второй (при отсутствии фосфора в среде) – образование лимонной кислоты. Глубинная ферментация проводится в аппаратах емкостью 50 м<sup>3</sup> с заполнением на 70–75 %. В качестве посевного материала используют мицелий, подрощенный также в условиях глубокой культуры. В производственном аппарате, куда подрощенный мицелий передается по стерильной посевной линии, питательная среда содержит 12–15 % сахаров. Ферментацию проводят при 31–32 °С при непрерывном перемешивании.

В ходе процесса кислотообразования (5–7 суток) реализуют интенсивный режим аэрации (до 800–1000 м<sup>3</sup>/ч) с дробным добавлением сахаров, 2–3 подкормки. Выход лимонной кислоты составляет от 5 до 12 %, остаточная концентрация сахаров – 0.2–1.5 %, доля цитрата – 80–98 % от суммы всех органических кислот.

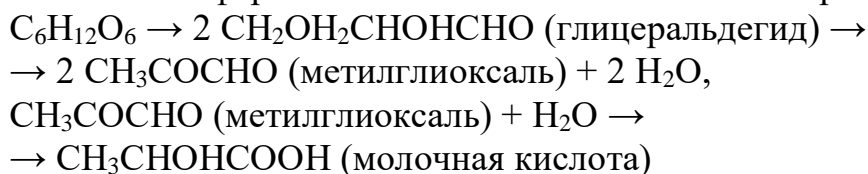
В 60-е годы начали разрабатывать процессы получения лимонной кислоты на основе жидких углеводов (C<sub>9</sub>–C<sub>30</sub>) с использованием в качестве продуцентов дрожжей (*Candida*) и бактерий (*Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*), а также с применением метода проточных культур. Эти технологии, пока не реализованные в промышленных масштабах, обещают в будущем определенные технологические перспективы.

Готовый продукт – высокоочищенную кристаллическую лимонную кислоту – получают в ходе постферментационной стадии. В сброженных растворах содержатся, помимо целевой кислоты, также глюконовая и щавелевая кислоты, остатки несброженных сахаров и минеральные соли. Для выделения лимонной кислоты из данного раствора ее связывают гидроокисью кальция с образованием труднорастворимого цитрата кальция:



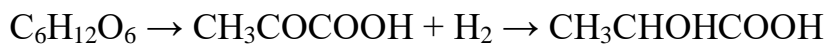
Одновременно образуются кальциевые соли глюконовой и щавелевой кислот, глюконат кальция  $\text{Ca}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2$  и оксалат кальция  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ . Кальциевые соли лимонной и щавелевой кислот выпадают в осадок, а глюконат кальция и основная часть органических и минеральных компонентов мелассы остаются в растворе. Осадок отделяется на вакуум-фильтре, промывается и высушивается. Далее для перевода лимонной кислоты в свободное состояние и освобождения от оксалата кальция осадок обрабатывают серной кислотой с последующей фильтрацией. Раствор лимонной кислоты фильтруют, концентрируют вакуум-выпаркой и затем подвергают кристаллизации при медленном охлаждении до 8–10 °С. Полученные кристаллы отделяют в центрифуге от маточника и высушивают в пневматических сушилках при 30–35 °С. Готовый продукт содержит не менее 99.5 % лимонной кислоты (в пересчете на моногидрат), зольность – не выше 0.1–0.35 %.

**Получение молочной кислоты.** Молочная кислота ( $\text{CH}_3\text{CHONCOOH}$ ) – органическая одноосновная кислота, образуемая в результате анаэробного превращения углеводов молочнокислыми бактериями. В 1847 году С. Блодно доказал, что данная кислота является продуктом брожения, а Л. Пастер установил, что этот процесс вызывают бактерии. Образование молочной кислоты из глюкозы возможно несколькими путями. При сбраживании гомоферментными молочнокислыми бактериями:





Второй путь, гетероферментный, включает распад глюкозы до пировиноградной кислоты и восстановление последней до молочной кислоты:



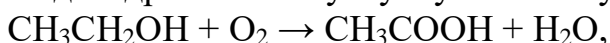
Для промышленного получения молочной кислоты используют гомоферментные молочнокислые бактерии. У гомоферментных молочнокислых бактерий только 3 % субстрата превращается в клеточный материал: а остальной – трансформируется в молочную кислоту, выход которой достигает до 1.5 %. Теоретически из 1 моля глюкозы должно образоваться 2 моля лактата. На практике эта величина несколько ниже, 1.8 моля, то есть выход продукта от субстрата достигает 90 %.

Применяют молочную кислоту в пищевой промышленности для получения напитков, мармеладов, в процессах консервирования, а также в кормопроизводстве. Соли молочной кислоты используют в фармацевтике. Промышленное производство молочной кислоты начато в конце XIX века с участием молочнокислых бактерий *Lactobacillus delbrueckii*, *L. leichmannii*, *L. bulgaricus*. Молочнокислое брожение протекает в анаэробных условиях, однако лактобациллы относятся к факультативным анаэробам, поэтому при ферментации воздух полностью не удаляют из ферментеров. В качестве сырья используют сахарную и тростниковую мелассу и гидролизаты крахмала, при этом концентрация сахаров в исходной среде в зависимости от характера брожения составляет примерно от 5 до 20 %. Используют восстановленные формы азота, сульфаты или фосфаты аммония, а также солод и кукурузный экстракт в качестве источника факторов роста. Возможно использование сульфитного щелока с участием бактерий *L. delbrueckii*. Ферментацию проводят в глубинной культуре при pH 6.3–6.5 и строго постоянной температуре 50 °С. Длительность процесса составляет до 7–11 суток. В ходе процесса брожения для коррекции изменяющегося pH в культуру вносят мел, 3–4 раза в течение суток. Конечная концентрация образующегося лактата кальция составляет 10–15%, остаточная концентрация сахаров – 0.5–0.7 %.

На стадии получения готового продукта культуральную среду нагревают до 80–90°, затем нейтрализуют гашеной известью до слабощелочной реакции. После отстаивания в течение 3–5 ч взвешенные частицы декантируют. После этого раствор лактата кальция подают на фильтр-пресс. Фильтрат упаривают до концентрации 27–30 %, охлаждают до 25–30°С и далее кристаллизуют. Промытый лактат кальция отделяют центрифугированием и подвергают расщеплению серной кислотой при 60–70°С. Сырую молочную кислоту 18–20 % концентрации упаривают в несколько этапов в вакуум-выпарных аппаратах до 70 % концентрации. Отфильтрованную кислоту после фильтр-пресса подают на розлив с внесением небольших количеств мела, при этом около 10 % кислоты превращается в кристаллический лактат, который связывает молочную кислоту.

**Получение уксусной кислоты.** Уксусная кислота (СН<sub>3</sub>СООН) широко используется в пищевой, химической, микробиологической промышленности, в медицине. Получение уксусной кислоты из спиртосодержащих жидкостей было известно более 10 тыс. лет назад. В те времена древние греки и римляне использовали уксус в качестве освежающего напитка и получали, главным образом, оставляя вино открытым. В больших масштабах уксус долго получали в плоских открытых бочках, в которых пленка бактерий плавала на поверхности. В XIX веке поверхностные процессы стали заменять более эффективными. Так, был разработан процесс в струйном генераторе. В середине XX века появились глубинные процессы ферментации. Усовершенствованный генератор Фрингса используется в настоящее время.

Уксуснокислое брожение основано на способности уксуснокислых бактерий окислять спирт кислородом воздуха с участием алкогольдегидрогеназы в уксусную кислоту:



при этом из 1 моля этанола образуется моль уксусной кислоты, а из 1 л 12 об. % спирта получается 12.4 весовых % уксусной кислоты.

Данный процесс могут реализовать многие бактерии, но в промышленных технологиях для получения уксуса используют уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter*, интерес представляют также бактерии *Gluconobacter*.

Большую часть уксуса получают, используя разведенный спирт. В настоящее время процесс реализуют как поверхностным, так и глубинным способом. Поверхностный режим протекает в струйных генераторах, наполненных древесной стружкой, объемом до 60 м<sup>3</sup>. Исходный питательный раствор с бактериями распыляют по поверхности стружек, и он стекает, собираясь в нижней части аппарата. После этого жидкость собирают и вновь закачивают в верхнюю часть аппарата. Процедуру повторяют 3–4 раза, в результате в течение 3-х дней до 90 % спирта трансформируется в ацетат. Этот старый способ протекает более эффективно и равномерно в генераторах Фрингса с автоматическим поддержанием температуры и принудительной подачей воздуха. По такой технологии производят до 400 млн. л уксусной кислоты в год.

Современные промышленные процессы получения уксуса реализуют в глубинной культуре в специальных аэрационных аппаратах с термостабилизацией и механической системой пеногашения. Скорость аэрации составляет 3.4 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup>·ч., вращение ротора – 1500 об/мин, температура 30 °С. Исходная инокулируемая смесь содержит этанол и уксусную кислоту, соответственно, около 5 и 7 %; конечная концентрация уксуса через 1.5 суток составляет 12–13 %. Процесс полупроточный, отливно-доливный. Каждые 30–35 часов до 60 % культуры заменяют на свежее сусло. При глубинной ферментации выход продукта на 1 м<sup>3</sup> в 10 раз выше по сравнению с поверхностной ферментацией. К началу 90-х годов таким способом производили до 715 млн. литров 10 % уксусной кислоты в год.

Разработан и реализован эффективный непрерывный способ получения уксусной кислоты в батарее последовательно работающих ферментеров (обычно 5 аппаратов). Температура культивирования составляет 28 °С для *Acetobacter* и 35 °С при использовании в качестве продуцента культуры *Vact.schutzembachii*. Наилучшим сырьем для процесса является этиловый спирт, полученный из зерно-картофельного сырья, при его концентрации около 10 %. Оптимум рН для развития бактерий – около 3. При увеличении содержания уксусной кислоты в культуре свыше 8 % рост бактерий замедляется, при 12–14 % прекращается. Поэтому процесс проводят в батарее последовательно соединенных аппаратов. Первый выполняет роль инокулятора, поэтому в него непрерывно подают свежую среду и поддерживают условия, оптимальные для быстрого образования биомассы бактерий. Культура из первого аппарата поступает во второй аппарат и далее – в последующие, при этом транспортировка культуральной жидкости осуществляется воздухом. В каждом аппарате условия ферментации стабилизируются в соответствии с требованиями течения хода ферментации, при постепенном понижении температура среды от 28 °С в первом аппарате до 25 °С – в последнем. Режим аэрации также изменяется, от 0.4 до 0.15 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup> мин. Концентрация спирта со второго по четвертый аппараты стабилизируется на требуемом уровне подачей в них среды с 40%-м этанолом. Из последнего аппарата выводится культуральная жидкость с содержанием ацетата не ниже 9.0 и не выше 9.3 %. Выход кислоты составляет до 90 кг из 100 л безводного спирта.

На постферментационной стадии после отделения бактериальной биомассы раствор уксуса фильтруют, освобождая от окрашенных и взвешенных частиц, и далее подвергают пастеризации. Для повышения концентрации исходные растворы вымораживают до 20–30 %. Дальнейшее концентрирование до получения ледяной уксусной кислоты (98.0–99.8 %) проводят методом перегонки.

**Получение пропионовой кислоты.** Пропионовая кислота (СН<sub>3</sub>СН<sub>2</sub>СООН) синтезируется грамположительными пропионовокислыми бактериями (*Propionibacterium*), используется в химико-фармацевтической промышленности, при получении косметических средств, в качестве фунгицида для сохранения зерна.

Химизм образования пропионовой кислоты заключается в следующем: пировиноградная кислота при участии биотина и углекислоты карбоксилируется в щавелевоуксусную, которая через яблочную и фумаровую кислоты восстанавливается до янтарной кислоты. Янтарная кислота при участии АТФ и КоА превращается в сукцинил-КоА, последний под воздействием метилмалонил-КоА-изомеразы и при участии кофермента В<sub>12</sub> превращается в метилмалонил-КоА. В результате карбоксилирования метилмалонил-КоА расщепляется с образованием свободного КоА и пропионовой кислоты.

Среди промышленных штаммов-продуцентов – бактерии *Pr. Arabinosum*, *Pr. shermanii*, *Pr. rubrum* и др. В качестве субстрата брожения

бактерии используют различные сахара (лактозу, глюкозу, мальтозу, сахарозу, органические кислоты – яблочную и молочную). Получают пропионовую кислоту в глубинной аэробной культуре на средах, содержащих (%): сахара 2, органический азот 0.4 (источник – дрожжевой экстракт), соли молочной кислоты.

Процесс реализуется за 12 суток при 30°C и pH 6.8–7.2; при этом свыше 70 % сахаров трансформируется в органические кислоты, на образование углекислоты расходуется менее 20 % углеродного субстрата.

Биотехнологические методы получения органических кислот совершенствуются. Недавно в Японии разработан способ получения 2-кетоглюконовой кислоты на основе биосинтеза бактерий *Pseudomonas*, выход кислоты достигает 90 % от использованного сахара. Разработана технология получения щавелевой кислоты на средах с сахарами на основе грибов *A. ozyzae*. На основе селективированных штаммов дрожжей (*Candida lipolytica*) созданы технологии получения лимонной и изолимонной кислот. Специально отселектированные штаммы дрожжей рода *Candida* синтезируют на средах с нормальными парафинами фумаровую, яблочную, янтарную кислоты. Процесс на данном сырье постоянного состава более стабилен, чем на комплексных природных средах на основе мелассы; также упрощается стадия выделения и очистки готового продукта.

#### **4.5 Промышленный синтез антибиотиков**

Антибиотики (антибиотические вещества) – это продукты обмена микроорганизмов, избирательно подавляющие рост и развитие бактерий, микроскопических грибов, опухолевых клеток. Образование антибиотиков – одна из форм проявления антагонизма. В научную литературу термин введен в 1942 году Ваксманом, – «антибиотик – против жизни». По Н. С. Егорову: «Антибиотики – специфические продукты жизнедеятельности организмов, их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (бактериям, грибам, водорослям, протозоа), вирусам или к злокачественным опухолям, задерживая их рост или полностью подавляя развитие». Специфичность антибиотиков по сравнению с другими продуктами обмена (спиртами, органическими кислотами), также подавляющими рост отдельных микробных видов, заключается в чрезвычайно высокой биологической активности. Например, минимальная концентрация эритромицина (0.01–0.25 мкг/мл) полностью подавляет многие грамположительные формы.

Механизмы повреждающих воздействий антибиотиков на клетки различны. Отдельные антибиотики (пенициллины, новобиоцин, цефалоспорины) подавляют процессы образования клеточных стенок; другие (стрептомицин, полимиксины) изменяют проницаемость мембран; третьи (грамицидины) подавляют окислительное фосфорилирование; хлорамфеникол подавляет отдельные этапы синтеза белка на рибосомах;

азасерин и сарколизин вызывают нарушения в процессах синтеза нуклеиновых кислот и т.д.

Существует несколько подходов в классификации антибиотиков: по типу продуцента, строению, характеру действия. По химическому строению различают антибиотики ациклического, алициклического строения, хиноны, полипептиды и др. По спектру биологического действия антибиотики можно подразделить на несколько групп:

- антибактериальные, обладающие сравнительно узким спектром действия (пенициллин, эритромицин, грамицидин, бацитрацин), подавляют развитие грамположительных микроорганизмов (стафилококки, стрептококки, пневмококки), и широкого спектра действия (стрептомицин, тетрациклины, неомицин, хлоромидетин), подавляющие как грамположительные, так и грамотрицательные микроорганизмы (кишечную палочку, дифтерии, брюшного тифа);

- противогрибковые, группа полиеновых антибиотиков (нистатин, гризеофульвин и др.), действующих на микроскопические грибы;

- противоопухолевые (актиномицины, митомицин и др.), действующие на опухолевые клетки человека и животных, а также на микроорганизмы.

В настоящее время описано свыше 6000 антибиотиков, но на практике применяется только около 150, так как многие обладают высокой токсичностью для человека, другие – инактивируются в организме и пр.

Антибиотики широко применяются в различных сферах человеческой деятельности: медицине, пищевой и консервной промышленности, сельском хозяйстве. Открытие антибиотиков вызвало переворот в медицине. Широко известно применение антибиотиков с бактерицидным и бактериостатическим действием; благодаря антибиотикам стали излечимыми многие инфекционные заболевания (чума, туберкулез, пневмония, брюшной тиф, холера и т.д.).

В течение многих лет антибиотики применяют в сельском хозяйстве в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных животных, средств борьбы с болезнями животных и растений. Антибиотические вещества также широко применяют для борьбы с посторонней микрофлорой в ряде бродильных производств и в консервной промышленности. Однако нельзя не отметить, что длительное и неконтролируемое применение антибиотиков приводит к возникновению и широкому распространению в микробных популяциях R- фактора устойчивости к антибиотикам, передающегося от одной бактериальной клетки к другой при помощи плазмид в процессе конъюгации.

Средствами борьбы с проявлением лекарственной устойчивости к антибиотикам служат обоснованное и строго контролируемое их применение и получение новых, модифицированных антибиотических препаратов, обладающих биологической активностью к резистентным формам.

Способность синтезировать антибиотики широко распространена среди различных представителей микробного мира. Связи между таксономическим положением микроорганизмов и способностью синтезировать тот или иной

антибиотик нет. Так, микроорганизмы, принадлежащие к одной группе, способны синтезировать самые разнообразные по химическому строению и действию антибиотики, и один и тот же антибиотик может продуцироваться различными микроорганизмами. Продуцентами антибиотиков являются бактерии, актиномицеты, мицелиальные грибы.

Описано около 600 антибиотиков, которые синтезируются бактериями. Эти антибиотики по химическому строению принадлежат к полипептидам и низкомолекулярным белкам. Однако в промышленных масштабах выпускается незначительное число антибиотиков бактериального происхождения.

Важнейшие из них: грамицидин (*Bacillus brevis*), полимиксины (*Bac. polymyxa*, *Bac. circulans*), бацитрацины (*Bacillus licheniformis*), низины (*Streptococcus lactis*).

Самое большое количество (свыше 70 %) антибиотиков, выпускаемых промышленностью и широко применяемых, синтезируется актиномицетами. Среди них – антибиотики различного химического строения, которые относят к нескольким группам:

а) аминогликозиды – стрептомицин (*Streptomyces griseus*), неомицины (*Streptomyces fradiae*, *Str. albogriseolus*), канамицины (*Str. kanamyceticus*), гентамицины (*Micromonospora purpurea*) и др.;

б) тетрациклины – хлортетрациклин (*Str. aureofaciens*), окситетрациклин (*Str. rimosus*);

в) актиномицины – большая группа близких по строению препаратов, синтезируемых различными микроорганизмами, в том числе (*Streptomyces antibioticus*, *Str. chrysomallus*, *Str. flavus*);

г) макролиды – эритромицин (*Streptomyces erythreus*), олеандомицин (*Str. antibioticus*), магнамицин (*Str. halstedii*), филиппин (*Str. filipensis*);

д) анзамицины – стрептоварицины (*Str. spectabilis*), рифамицины (*Nocardia mediterranea*), галамицины (*Micromonospora halophytica*), нафтамицин (*Str. collinus*) и др.

Мицелиальные грибы также синтезируют достаточно большое количество антибиотиков (около 1200). Наиболее известны среди них следующие: пенициллины (*Penicillium chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *Aspergillus flavus*, *Asp. nidulans*), цефалоспорины (*Cephalosporium acremonium*), фумалгин (*Aspergillus fumigatus*), гризеофульвин (*Penicillium nigricans*, *P. griseofulvum*), трихоцетин (*Trichothecium roseum*).

Синтез антибиотиков микробными клетками – это специфический процесс обмена веществ, возникший и закрепленный в процессе эволюции организма. Каждый микробный вид способен образовывать один или несколько вполне определенных антибиотических веществ. Выделенные из природных источников, так называемые «дикие» штаммы обладают низкой антибиотической активностью. В промышленности применяют в качестве продуцентов штаммы, которые по сравнению с исходными штаммами обладают повышенной на 2–3 порядка антибиотической активностью. Это достигается, как и во многих других биотехнологических процессах, двумя

способами: генетическими усовершенствованиями организмов и оптимизацией условий ферментации.

Антибиотики – это вторичные продукты обмена микроорганизмов, (идиолиты). Характерной особенностью развития продуцентов антибиотических веществ является ярко выраженная двухфазность: в первой фазе развития микроорганизмов происходит накопление биомассы, во второй – синтез антибиотика. При этом очень важно создать условия ферментации, адекватные этой двухфазности с учетом ингибирующего действия антибиотика как продукта обмена на продуцент.

Нельзя не отметить, что создание промышленности антибиотиков – крупнейшее достижение биологии нашего столетия. Организация этого производства потребовала коренных преобразований существующей микробиологической промышленности: при этом были решены вопросы обеспечения строжайших условий стерильности в ходе всех стадий биотехнологического процесса, разработаны и созданы эффективная аппаратура с высокими газо-динамическими характеристиками, средства борьбы с сильным пенообразованием, методы получения стерильных препаратов антибиотиков высокой степени чистоты. Распространение этих достижений и применение их в других, сложившихся биотехнологических процессах, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов, сыграло решающую роль в становлении современной биотехнологии в целом.

В процессах производства антибиотиков очень большое значение имеет правильный выбор состава питательной среды. В зависимости от природы используемого микроорганизма в качестве источника углерода возможно применение различных субстратов. Например, для получения пенициллина лучшим источником углерода и энергии служат глюкоза и лактоза; грамицидина – глицерин и соли янтарной кислоты; стрептомицина и неомицина – глюкоза. При разработке состава среды для каждого отдельного продуцента индивидуально подбирают не только тип углеродного субстрата, но и его концентрацию. В качестве источника азота многие продуценты антибиотиков используют восстановленные формы (аммоний и аминокислоты), однако некоторые предпочитают нитраты. Когда источник азота должен присутствовать в виде готовых аминокислот, полипептидов или белков, используют пшеничную и кукурузную муку, экстракты дрожжевой биомассы. Большое значение имеет также концентрация в среде фосфора, а также других минеральных элементов (серы, марганца, железа, кобальта и др.). В ряде случаев существенного увеличения выхода антибиотического вещества достигают в результате внесения в среду предшественников синтеза конкретного антибиотика. В связи с интенсивным пенообразованием, сопровождающим процесс синтеза антибиотиков, в состав среды вводят пеногасители (растительные и животные жиры, минеральные масла). Помимо состава среды, большое влияние на выход антибиотиков оказывают другие физико-химические факторы среды: pH, температура, обеспечение кислородом, которые подбираются и задаются индивидуально для каждого продуцента.

На предферментационной стадии получают инокулят из музейной культуры и готовят питательную среду. После стерилизации технологического оборудования и среды в ферментер вносят требуемое количество инокулята и начинают процесс ферментации. В промышленности используют аппараты различной емкости, от 500 л до 100 м<sup>3</sup> и более. В ходе ферментации культура непрерывно аэрируется стерильным подогретым воздухом. Температура среды, рН и ряд других параметров автоматически регулируются в соответствии с регламентом производства конкретного антибиотика.

Процесс ферментации осуществляется в строго стерильной, глубинной, аэробной и периодической культуре и носит выраженный двухфазный характер. Первая фаза сбалансированного роста (тропофаза) характеризуется быстрым накоплением биомассы продуцента на фоне исчерпания углеродного субстрата, а также азота, фосфатов и др. При этом может наблюдаться некоторое изменение величины рН; синтез антибиотиков отсутствует. На второй фазе (идиофаза) прирост биомассы прекращается, может иметь место снижение концентрации клеток в культуре в результате гибели и лизиса части популяции. При этом среда обогащается продуктами обмена и продуктами автолиза погибших клеток, и начинается активный процесс синтеза антибиотиков. Исключительно важным на этом этапе становится правильно организованный режим пеногашения. Наряду с пеногасителями химической природы, дополнительно применяют механическое пеногашение с использованием специальных устройств. В большинстве случаев антибиотики выделяются в культуральную среду, хотя возможно и сохранение их внутри клеток. Локализация антибиотика, а также сфера применения последнего определяют специфику приемов постферментационной стадии. Если антибиотик находится в клетках, на первом этапе обработки биомассу выделяют из культуральной жидкости (фильтрацией или центрифугированием); далее после разрушения клеток антибиотик экстрагируют и переводят в растворимую фазу.

Затем данный раствор, а также культуральные среды (если антибиотик в процессе идиофазы выделяется из клеток в среду) подвергают различным методам экстракции, разделения, очистки и концентрирования для получения готового продукта. Особенность процедуры выделения и очистки антибиотиков – разбавленные исходные растворы (около 1 %) и возможность инактивации антибиотика в ходе постферментационной стадии. Цель всех процедур постферментационной стадии – получение стерильных препаратов высокой степени чистоты. Особенно высокие требования предъявляют к антибиотикам медицинского назначения. Поэтому выделение, очистка, концентрирование, высушивание, а также расфасовка и упаковка медицинских антибиотиков осуществляются в асептических условиях. Готовый продукт подвергается тщательному биологическому и фармакологическому контролю. Биологический контроль определяет степень стерильности препарата. В ходе фармакологического контроля проводят всесторонние испытания препарата на токсичность, пирогенность,



токсикогенность и пр., устанавливают максимально переносимую дозу антибиотика, дозы, вызывающие полную и 50 %-ю гибель экспериментальных животных. Готовая форма лекарственного препарата антибиотического вещества поступает к потребителю с указанием биологической активности и даты выпуска.

Антибиотики немедицинского назначения, применяемые в сельском хозяйстве, получают также в условиях строго стерильной регламентированной культуры, однако готовый продукт представляет собой высушенную биомассу продуцента или культуральную среду. В таком препарате, помимо антибиотика, содержатся также другие биологически активные вещества (витамины группы В, ферменты, витамины, аминокислоты). Наиболее известны среди применяемых в качестве кормовых антибиотических препаратов – биовит и биомицин, являющиеся препаратами хлортетрациклина, а также гризин, бацитрацин, гигромицин и др. Подавляя развитие болезнетворных микроорганизмов, тем самым снижая заболеваемость и смертность, антибиотики ускоряют рост и развитие животных и птицы. Так, применение антибиотиков в свиноводстве обеспечивает дополнительный привес от каждой тысячи животных до 120 ц при сокращении расхода кормов на 5–10 %. При добавлении антибиотиков в корм кур-несушек можно дополнительно получить до 15 тыс. яиц в год от 1000 кур. В течение последних 25 лет антибиотики применяют также для борьбы с фитопатогенами, возбудителями которых являются микроорганизмы. Антибиотические вещества наносят на вегетативные части растения, а также на семена или вносят в почву. В результате селективного действия на фитопатогенные микроорганизмы антибиотики задерживают рост или убивают микроорганизмы-возбудители, не нанося вреда растению. Наиболее эффективными фитопатогенными препаратами считаются трихотецин, полимицин, фитобактериомицин, гризеофульвин.

Поиск продуцентов новых антибиотиков непрерывно продолжается.

Огромные перспективы для получения высокопродуктивных штаммов открываются в связи с развитием новейших методов клеточной и генетической инженерии. Помимо усовершенствования природы микроорганизмов-продуцентов антибиотических веществ, оптимизации аппаратуры и технологий, большое значения для получения нового спектра препаратов, обладающих более ценными свойствами по сравнению с исходными, имеет так называемая модификация антибиотиков и получение полусинтетических препаратов.

Полученные микробиологическим путем антибиотики подвергают химической модификации, в результате которой возможно получение препаратов с более выраженным физиологическим действием.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Биотехнология аминокислот. Микробиологический синтез. Продуценты. Преимущества микробиологического синтеза перед другими способами получения.

2. Механизмы биосинтеза глутаминовой кислоты, лизина, треонина. Конкретные подходы к регуляции каждого процесса.

3. Получение аминокислот с помощью иммобилизованных клеток и ферментов. Химико-энзиматический синтез аминокислот. Получение оптических изомеров аминокислот путем использования ацилаз микроорганизмов.

4. Биотехнология витаминов и коферментов. Биологическая роль витаминов. Традиционные методы получения (выделение из природных источников и химический синтез).

5. Микробиологический синтез витаминов и конструирование штаммов-продуцентов методами генетической инженерии. Витамин В2 (рибофлавин). Основные продуценты. Схема биосинтеза и пути интенсификации процесса.

6. Микроорганизмы прокариоты - продуценты витамина В12 (пропионовокислые бактерии и др.). Схема биосинтеза. Регуляция биосинтеза.

7. Микробиологический синтез пантотеновой кислоты, витамина РР.

8. Биотехнологическое производство аскорбиновой кислоты (витамина С). Микроорганизмы-продуценты. Различные схемы биосинтеза в промышленных условиях. Химический синтез аскорбиновой кислоты и стадия биоконверсии в производстве витамина С.

9. Эргостерин и витамины группы D. Продуценты и схема биосинтеза эргостерина. Среды и пути интенсификации биосинтеза. Получение витамина D из эргостерина.

10. Каротиноиды и их классификация. Схема биосинтеза. Среды для микроорганизмов-продуцентов и регуляция биосинтеза. Стимуляторы каротинообразования.  $\beta$ -Каротин.

11. Образование из  $\beta$ -каротина витамина А. Убихиноны (коферменты Q). Источник получения: дрожжи и др. Интенсификация биосинтеза.

12. Биотехнология стероидных гормонов. Традиционные источники получения стероидных гормонов.

## 5. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

### 5.1. Конструирование штаммов с повышенной способностью к трансформации

Изучение нехромосомных элементов наследственности, контролирующих катаболизм у микроорганизмов многих органических веществ («плазмиды биодеградации»), навело на мысль об использовании их для создания «улучшенных» штаммов, трансформирующих органические соединения. Принципиальная возможность этого подхода показана на примере окисления нафталина в салициловую кислоту.

Процесс получения салициловой кислоты из нафталина с помощью бактерий рода *Pseudomonas* был описан достаточно давно. Недостатком исходных штаммов было то, что салициловая кислота после кратковременного накопления в среде потребляется культурой в качестве источника углерода, что значительно снижает производительность процесса. Штамм **Ps. putida 41**, полученный методом конъюгации в результате переноса плазмиды NPL-1, контролирующей первичный этап окисления нафталина до салициловой кислоты, от донорного штамма *Ps. putida 12A* к реципиенту **Ps. putida 4**, не обладающему способностью окислять нафталин до салициловой кислоты, накапливал салициловую кислоту без ее дальнейшего потребления и отличался от донорного штамма значительно более высокой производительностью. В присутствии анионообменной смолы Амберлит IR-45, связывающей образующийся салицилат, в ферментационной среде выход продукта, равный 90 %, достигался за 10 ч ферментации.

#### *Получение продуцентов с помощью мутагенеза in vivo*

Как было отмечено ранее, природные штаммы микроорганизмов не способны продуцировать в среду такое количество метаболита, которого было бы достаточно для его промышленного производства. Метаболизм клетки подвержен строгой и четкой регуляции, и поэтому для использования штамма микроорганизма в качестве промышленного продуцента эта регуляция должна быть изменена таким образом, чтобы использовать биосинтетический аппарат клетки для получения максимального количества необходимого метаболита. Одним из основных методов достижения поставленной цели является мутагенез. Мутации, приводящие к сверхсинтезу продукта, могут затрагивать различные гены: структурные, регуляторные, участвующие в транспорте и деградации метаболита и т. д.

#### *Типы мутаций, используемые для получения продуцентов*

По характеру локализации различают мутации:

- цитоплазматические;
- ядерные.

Материалом для селекции продуцентов служат ядерные мутации, затрагивающие хромосомные генетические детерминанты.

Ядерные мутации подразделяются:

- на генные (мутации на уровне отдельных генов);
- хромосомные (изменение структуры хромосом);
- геномные (изменение числа хромосом).

Генные мутации связаны с изменением последовательности нуклеотидов в пределах одного гена. В зависимости от механизма таких изменений различают:

- делеции (выпадение одного или нескольких оснований);
- вставки лишней пары нуклеотидов;
- транзиции (замена одних нуклеотидов на другие так, что это не меняет ориентации пурин-пиримидин в пределах пары);
- трансверсии (замены пар нуклеотидов, изменяющие ориентацию пурин-пиримидин).

Генные мутации связаны с явлением таутомеризации, которое влечет за собой изменение химических свойств. Транзиции и трансверсии часто приводят к миссенс-мутациям (мутации с изменением смысла), в которых последовательность кодирующего триплета оснований после замены кодирует уже другую аминокислоту. Часть мутаций с заменой оснований приводит к возникновению нонсенс-мутантов (бессмысленные мутации). Такие мутации приводят к образованию кодонов, не кодирующих никакой аминокислоты. Синтез белка в измененном кодоне прерывается, а образующиеся фрагменты белковой молекулы функционально неактивны из-за быстрого их протеолиза. Если мутация лишь частично нарушает функцию гена и новая аминокислота сходна с той, которая кодировалась геном дикого типа, то говорят о leaky-мутациях.

Делеции и вставки могут являться причиной frame-shift-мутаций (или мутаций со сдвигом рамки считывания), в результате чего синтезируется неактивный белок с измененной последовательностью аминокислот. При протяженных делециях, в результате которых удаляется значительная часть гена, синтезируются неактивные фрагменты белковых молекул.

Хромосомные мутации подразделяются:

- на делеции участков хромосомы;
  - дефишенсы (концевые нехватки, которые являются, по сути, частным случаем делеций);
  - инсерции (вставки в определенные участки хромосомы);
  - дупликации или амплификации (удвоения или умножения участков хромосомы);
  - инверсии (изменение чередования генов в хромосоме);
  - транслокации (обмен участками между негомологичными хромосомами);
  - транспозиции (перемещение небольших участков хромосомы в пределах одной хромосомы или между разными хромосомами).
- Хромосомные перестройки могут вызвать как утрату функций, так и возникновение новых. Результатом этого может явиться возникновение новых белков, уменьшение либо увеличение продукции определенных метаболитов.

## 5.2 Рекомбинантная ДНК

**Рекомбинантная ДНК** — молекула ДНК, полученная в результате объединения *in vitro* чужеродных (в природе никогда вместе не существующих) фрагментов ДНК с использованием методов генной инженерии

Рекомбинантная ДНК (recombinant DNA): ДНК, полученная в результате объединения молекулы векторной ДНК, способной к репликации в определенной клетке-хозяине, с ДНК, кодирующей продукт, синтез которого желательно осуществить в этой клетке-хозяине. Векторы для получения рекомбинантных ДНК могут быть плазмидами, вирусами или искусственными хромосомами на основе дрожжевых или животных хромосомных элементов. Существует большой набор различных систем, позволяющих осуществлять экспрессию гетерологичных генов в бактериях, дрожжах и других организмах, включая клетки человека.

Создаваемые генными инженерами рекомбинантные ДНК называют также химерными. Они были созданы для самых разнообразных целей, в том числе и для целенаправленного воздействия на ВИЧ. Число научных работ в этом направлении очень велико,

Для получения рекомбинантной ДНК плазмиды выделяют из *E. coli* и удаляют из них часть кольцевой молекулы ДНК. Для этого применяют рестриктазы. Комплементарные цепи молекулы ДНК разрезаются в разных местах, в результате чего образуются «липкие» концы — неспаренные участки цепей, способные присоединять комплементарные им полинуклеотиды. На фрагменте ДНК, выбранном для пересадки, тоже создают «липкие» концы, используя ту же рестриктазу, и, следовательно, на фрагменте ДНК образуются «липкие» концы, комплементарные «липким» концам рестриктированной плазмиды. Если теперь смешать фрагмент ДНК (ген) и плазмиду, то они соединятся «липкими» концами.

**Техника генной инженерии включает несколько последовательных процедур:**

1. выделение нужного (целевого) гена;
2. встраивание его в генетический элемент, способный к репликации (вектор);
3. введение вектора в организм-реципиент;
4. идентификация (скрининг) и отбор клеток, которые приобрели желаемый ген или гены.

Белки, полученные генно-инженерным способом, т. е. транслируемые с рекомбинантных ДНК, также называются рекомбинантными. Технология рекомбинантных ДНК оказала существенное воздействие на развитие современной биологии, позволив решать многие теоретические задачи, например, определять функции белков, изучать механизмы регуляции экспрессии генов. Затем с помощью фермента лигазы образуют фосфодиэфирную связь между концевыми нуклеотидами обеих молекул, и

вновь получают кольцевую молекулу ДНК, но теперь она вместе с плазмидной ДНК содержит ген, выбранный для пересадки. Это и есть рекомбинантная ДНК, т. е. ДНК, содержащая новую комбинацию последовательностей (или генов), такую, какой прежде в природе не было.

Основные типы вакцин, лицензированных для клинического использования, содержат живые ослабленные, убитые или инактивированные микроорганизмы. Меньшее количество препаратов основано на очищенных компонентах микроорганизмов, а совсем немногочисленная группа – на белках, синтезированных с помощью метода рекомбинантных ДНК.

#### *Конструирование рекомбинантных ДНК*

Под рекомбинантными понимают ДНК, образованные объединением *in vitro* (в пробирке) двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников. Ключевыми в этом определении являются слова "фрагмент ДНК" и "объединение *in vitro*", что указывает на сущность генетической инженерии и ее отличие от всех остальных методов получения гибридных (или химерных) организмов, таких как генетическая селекция, эмбриональная инженерия и т.д.

Фрагменты ДНК, в том числе и фрагменты, содержащие гены, получают с использованием ферментов рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с тупыми, так и с липкими концами. Сшивка фрагментов ДНК производится тремя основными методами, зависящими от того, какие концы имеют фрагменты сшиваемых ДНК.

#### *Сшивка по одноименным "липким" концам (рестриктазно-лигазный метод)*

Этот метод является самым распространенным и популярным. Впервые этим способом гибридная ДНК была получена С. Коэном с сотрудниками в 1973 году. Некоторые рестриктазы, например Pst I, внося в цепи ДНК симметричные, расположенные наискось друг от друга разрывы на равных расстояниях от центра сайта узнавания и образующие "ступеньку". Эти комплементарные друг другу участки имеют тенденцию к ассоциации за счет спаривания оснований, и поэтому их называют комплементарными или липкими концами. Спаривание оснований происходит только между комплементарными последовательностями, поэтому ААТТ-концы, образуемые Eco RI, не будут спариваться, например, с АГЦТ-концами, образуемыми Hind III. Но любые два фрагмента (независимо от их происхождения), образовавшиеся под действием одной и той же рестриктазы, могут слипаться за счет образования водородных связей между однонитевыми участками комплементарных нуклеотидов (рисунок 27).

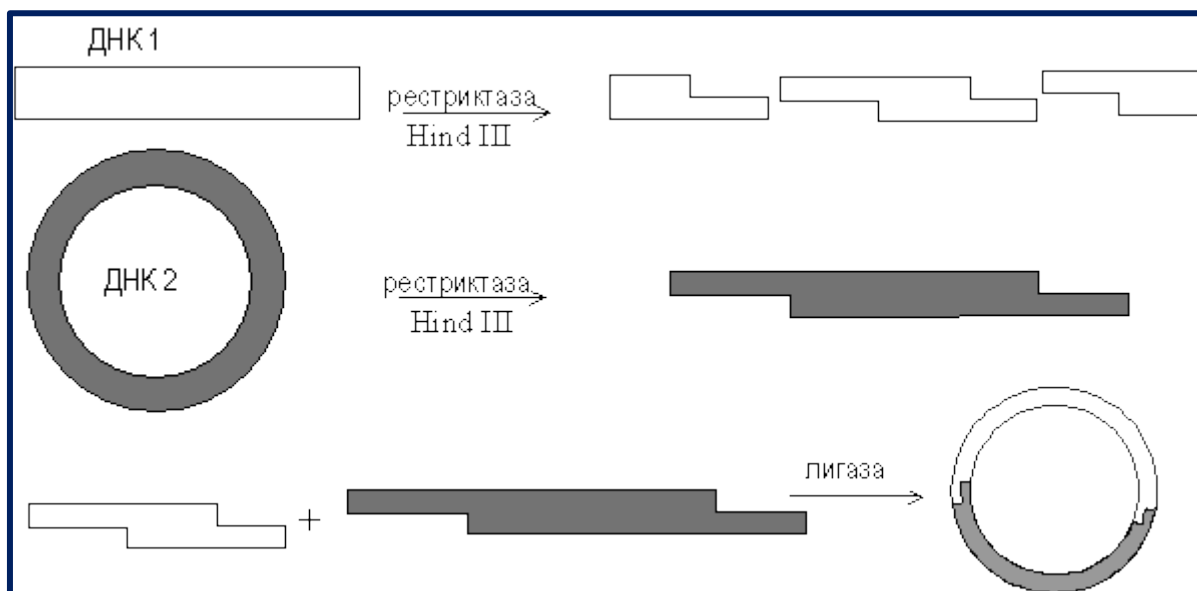


Рисунок 27 - Схема рестриктазно - лигазного метода

Однако после такого спаривания полной целостности двойной спирали не восстановится, поскольку останется два разрыва в фосфодиэфирном остове. Для его восстановления, то есть сшивания, или лигирования нитей используют фермент ДНК-лигазу. Этот фермент в живой клетке выполняет ту же функцию - сшивание фрагментов ДНК, синтезирующихся при репликации.

#### **Сшивка по "тупым" концам (коннекторный метод)**

Липкие концы не абсолютно необходимы для связывания фрагментов ДНК. Тупые концы также могут быть соединены за счет действия ДНК-лигазы, если и лигаза, и тупые концы присутствуют в реакционной смеси в высоких концентрациях. В этом случае реакция лигирования имеет свои особенности и ее эффективность ниже, чем при сшивке по липким концам. Впервые такие эксперименты были выполнены в 1972 году Полем Бергом в Стенфордском университете, США. Липкие концы также можно ферментативным путем присоединить к молекулам ДНК с тупыми концами. Для этого используют фермент - концевую трансферазу из тимуса тельца, которая присоединяет нуклеотиды к 3'-концам цепей ДНК. Если к 3'-концам одного из рекомбинируемых *in vitro* фрагментов ДНК с помощью концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы достроить одноцепочечные олиго (dA)-сегменты определенной длины, а к концам другого фрагмента — олиго (dT)-сегменты примерно такой же длины, то при смешении полученных таким образом фрагментов происходит спаривание за счет образования водородных связей между олиго (dA)- и олиго (dT)-последовательностями (рисунок 28). Для ковалентного соединения двух фрагментов используется ДНК-лигаза. Эти процедуры составляют основу для второго общего метода получения рекомбинантных молекул ДНК.

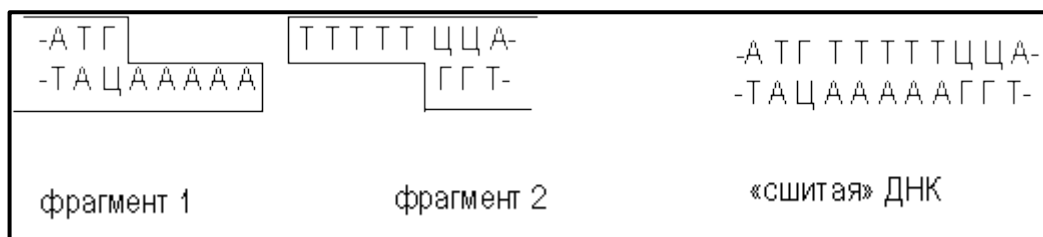


Рисунок 28 - Пришивание «липких» концов и сшивка фрагментов ДНК

Поскольку можно формировать достаточно длинные взаимокomплементарные одноцепочечные концы, гибридные молекулы образуются с высокой эффективностью. В частности, поэтому при клонировании ДНК-копий матричных РНК, которые доступны в ограниченных количествах, обычно используют коннекторный метод. При таком способе соединения между фрагментами встраиваются участки ААААА. Такие дополнительные последовательности ТТТТТ могут влиять на функции соединяемых молекул и поэтому всегда, когда только возможно, для получения рекомбинантных молекул ДНК пользуются липкими концами, образовавшимися в результате действия рестриктаз.

#### ***Сшивка фрагментов с разноименными липкими концами***

В ситуации, когда необходимо сшить фрагменты, образованные разными эндонуклеазами рестрикции, и имеющие разные, то есть неkomплементарные друг другу липкие концы, применяют так называемые линкеры (или "переходники"). Линкеры - это химически синтезированные олигонуклеотиды, представляющие собой сайты рестрикции или их комбинацию. Впервые эту идею предложил Шеллер с сотрудниками в 1977 году.

Существуют большие наборы таких генных "переходников". Естественно, что при использовании линкеров должна учитываться необходимость соблюдения правил экспрессии генетической информации. Часто в середину линкера помещают какой-либо регуляторный генетический элемент, например, промотор или участок, связанный с рибосомой. В этом случае линкеры обеспечивают не только объединение генов, но и обуславливают их экспрессию. Существуют линкеры "тупой конец - липкий конец".

При необходимости липкие концы можно превратить в тупые. Это достигается либо отщеплением липких концов с помощью фермента - эндонуклеазы S1, которая разрушает только одноцепочечную ДНК, либо липкие концы "защипывают", то есть с помощью ДНК-полимеразы I на односторонних липких концах синтезируют вторую нить.

#### ***Методы введения рекомбинантного вектора в клетку реципиента***

После того, как в структуру вектора был включен нужный ген или фрагмент ДНК, возникает задача введения этого вектора в клетку реципиента, который смог бы продуцировать вещество, кодируемое встроенным геном. В качестве реципиента в зависимости от целей



экспериментатора могут использоваться любые живые организмы – клетки бактерий, грибов, растений, животных и человека. В зависимости от этого различаются и методы введения рек-вектора в клетки реципиентов. Наиболее часто применяется метод трансформации (в различных модификациях, но могут использоваться и другие рекомбинативные методы, такие как конъюгация, трансдукция, трансфекция. Кроме того, применяются метод электропорации и метод “пушки”.

**Метод трансформации.** *Трансформация* – перенесение в реципиентную клетку изолированных фрагментов ДНК, что может приводить к появлению у клеток-трансформантов признаков, присущих организму, из которого получена эта ДНК. Организм, из которого получают ДНК для трансформации, называют *донором*, а организм, в который вводят ДНК, – *реципиентом*. Применение метода трансформации в генной инженерии основано на способности “голой” ДНК проникать в клетки практически любых организмов. Ограничением применения этого метода при использовании в качестве реципиентов микробных и растительных клеток является их плотная клеточная стенка. Для ее частичного или полного разрушения используют ферменты, однако ферментативный гидролиз необходимо проводить в мягких условиях (например, в изотоническом или гипертоническом растворе), чтобы не повредить мембраны клеток и сохранить их целостность. Для разрушения клеточных стенок бактерий используют такие ферменты, как лизоцим, лизоамидаза, субтилизин и др. Ферментативный гидролиз клеточных стенок дрожжей можно осуществить с помощью комплекса глюканаз, маннаназ и хитиназ. Для гидролиза оболочек растительных клеток используют целлюлозолитические ферменты. Трансформацию животных клеток проводят без обработки ферментами, так как они лишены плотных оболочек.

Эффективность трансформации зависит от многих факторов: количества вносимой ДНК, способа ее выделения и очистки, величины фрагментов, а также от физиологического состояния клетки-реципиента. При переносе ДНК в цельные клетки частота трансформации составляет в среднем  $10^{-5}$  -  $10^{-8}$ , при использовании протопластов (клеток, лишенных клеточных стенок) частота трансформации может быть значительно выше – до  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$ . Клетки, способные поглощать ДНК, называют компетентными. У бактерий *компетентность* – это особое состояние, при котором на поверхности оболочки появляются специфические белки и ферменты, обеспечивающие адсорбцию, частичную деградацию ДНК на фрагменты, разделение комплементарных цепей и проведение одноцепочечных фрагментов ДНК внутрь клетки. Компетентность в бактериальной культуре наблюдается обычно в экспоненциальной или стационарной фазах роста. Долю компетентных клеток можно повысить, используя специальные среды и условия культивирования. Так, у кишечной палочки частота трансформации существенно повышается под воздействием теплового шока, катионов  $Rb^{+}$ , хлорида гексамин- кобальта, при выращивании на среде с повышенным содержанием ионов магния (10-20 мМ).

Одним из самых простых методов трансформации является *кальцевый метод*, при котором клетки реципиента обрабатывают ледяным раствором хлорида кальция и выдерживают суспензию при 42<sup>0</sup>С в течение 1,5 мин. Благодаря локальному разрушению клеточных стенок бактерий частота трансформации увеличивается до 10<sup>-3</sup>. Иногда для трансформации клеток бактерий, животных и растений используют полиэтиленгликоль, который также повышает компетентность реципиентных клеток.

В некоторых системах “донор-реципиент” оказывается невозможным провести эффективную трансформацию. В этом случае для доставки плазмид-векторов в клетки реципиента используют *метод конъюгации*. Так, если ввести рек-вектор в промежуточную клетку, несущую F-фактор (плазида, несущая гены для обеспечения конъюгативного переноса), то векторная плазида может интегрироваться в F-фактор и вместе с ним по F-пилям переноситься в клетку-реципиент.

Иногда гены для встраивания клонируют в фагах и других вирусах. В этом случае для переноса вирусных векторов в клетки реципиентов используют *метод трансдукции*, а именно, заражают клетки реципиента вирусной рек-ДНК и именно она осуществляет доставку чужеродных генов в геном, что придает реципиенту новые свойства. В том случае, если клетки бактерий поглощают ДНК бактериофагов и в результате происходит созревание фаговых частиц, говорят о *трансфекции* фаговой ДНК.

**Метод электропорации** основан на применении импульсного электрического тока высокой напряженности. Клетки вместе с векторной ДНК помещают в небольшую ячейку между двумя электродами и подвергают кратковременному (10-100 мкс) воздействию электрического поля. Это приводит к образованию временных пор в клеточных оболочках реципиентов, повышает их проницаемость и проводимость для макромолекул. Специально созданные для этих целей лазерные инжекторы способны за одну секунду формировать в облучаемой клетке до 600 пор. Это позволяет существенно увеличить частоту трансформации и особенно для крупных плазмид-векторов.

**Метод молекулярной пушки** чаще применяется в случаях, когда клетки реципиента являются трудно проницаемыми для трансформируемой ДНК. С помощью специального устройства реципиентные клетки «обстреливают» микроскопическими ядрами из золота, кадмия или других металлов, на которые нанесена векторная рек-ДНК, что обеспечивает проникновение чужеродной ДНК в клетку и геном.

### 5.3 Получение моноклональных антител (гибридомная технология)

Для использования большинства иммунологических и серологических методов исследования необходимо иметь стандартные превраты антител. Основные требования к этим препаратам - специфичность, стабильность, достаточное содержание антител. Сложность получения таких препаратов путем иммунизации животных связана с гетерогенностью получаемых при этом антител. Каждый природный антиген многокомпонентен, и к каждому его эпитопу формируются отдельные клоны антителообразующих клеток, что обуславливает большое разнообразие продуцируемых антител. Более того, к одной антигенной детерминанте может образоваться множество вариантов молекул антител. Таким образом, антитела, получаемые от разных особей одного вида, иммунизированных одним антигенным препаратом, не полностью идентичны.

Получить абсолютно однородные антитела можно, только используя клетки - антителопродуценты одного клона - потомков одной специализированной клетки. Решить задачу, используя специально отобранные лимфоциты иммунного человека или животного, невозможно, поскольку срок жизни каждого клона клеток ограничен и количество продуцируемых антител очень невелико.

Положение коренным образом изменилось после того, как Г. Кёлер и Ц. Милштейн осуществили гибридизацию антителообразующих клеток, полученных от животного, с культивируемыми в пробирке клетками злокачественной опухоли - В-клеточной плазмацитомы. Полученные при этом гибридные клетки обладали свойствами обеих родительских клеток: способностью продуцировать антитела и способностью к неограниченному размножению вне организма.

Таким образом, были получены теоретически «бессмертные» клоны гибридных клеток (гибридомы), способные к образованию неограниченного количества однородных продуктов одного клона клеток - моноклональных антител.

Процедура получения гибридных клеток и моноклональных антител сводится к следующему (рисунок 29). Животное (чаще мышь) иммунизируют нужным антигенным материалом. После того как началась продукция антител, удаляют селезенку, и из нее извлекают клетки, среди которых имеются антителообразующие В-лимфоциты. Все клетки смешивают со специально отобранными клетками культуры В-миеломы, дефектными по ферменту метаболизирующему гипоксантин. К смеси клеток добавляют вещество, повреждающее оболочки клеток и способствующее их слиянию между собой (полиэтилен-гликоль, лизолецитин или вирус Сендай). В результате образуются разнообразные гибридные клетки, а часть клеток остается негибридизированной. Для того чтобы выделить только гибридные клетки, полученную смесь культивируют на специальной среде ГАТ (содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин), в которой не могут жить родительские клетки. В среде остаются живыми только гибридные

клетки, но с разными свойствами, так как в селезенке иммунизированного животного наряду с антителообразующими клетками, которые было необходимо получить, содержится много других лимфоцитов. Поэтому следующим этапом является отбор гибридных клеток, способных продуцировать необходимые антитела. Для этого взвесь полученных клеток разбавляют питательной средой и помещают в лунки специальных панелей так, чтобы в каждую лунку попало по одной клетке. Через определенное время определяют антитела, образовавшиеся в каждой лунке, и находят те клетки, которые можно использовать как родоначальников клона гибридных клеток.

Отобранные гибридные клетки можно культивировать *in vitro* или *in vivo*, получая необходимые количества клеток и моноклональных антител. Гибридные клетки могут храниться в замороженном состоянии, пересылаться из лаборатории в лабораторию. В ходе приготовления гибридных клеток может быть выделено несколько клонов клеток, продуцирующих антитела к разным эпитопам антигена, что позволяет провести его разносторонний анализ.

Моноклональные антитела могут использоваться для разных практических целей:

- для идентификации клеток - выявления Т- и В-лимфоцитов и других клеток, определения их свойств;
- для осуществления современных радиоиммунных, иммуноферментных и иммунолюминесцентных методов выявления антигенов и антител;
- для определения локализации антигенов в организме и доставки к ним (например, в опухоль) лекарственных веществ, присоединенных к антителам;
- для приготовления иммуносорбентов, позволяющих выделить или удалить из организма антигены или клетки данной специфичности.

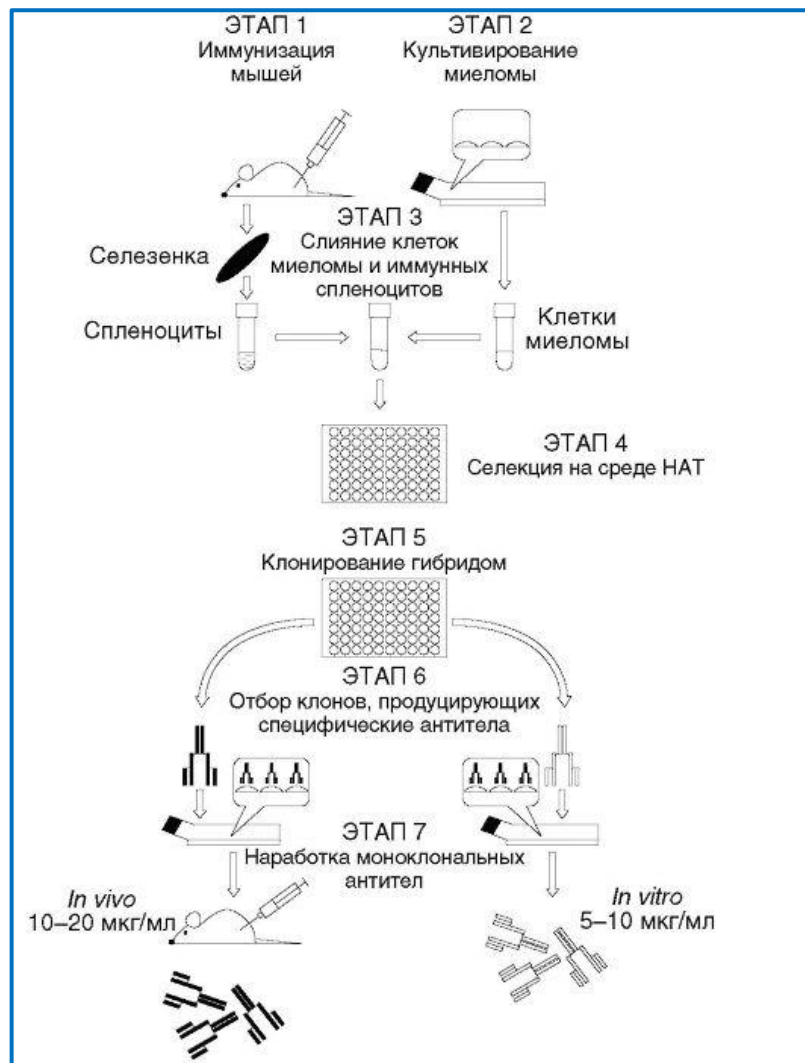


Рисунок 29 - Схема получения гибридом

## 6. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЖИВОТНЫХ

### 6.1 Клонирование животных

Клонирование – точное воспроизведение какого-либо объекта любое требуемое количество раз. Природными клонами являются однояйцевые близнецы.

Задачи клонирования животных:

1. В сельскохозяйственной отрасли создание высокопродуктивных животных с желаемым фенотипом, т.е. копий животных-рекордистов (например, по надоям молока, настригу шерсти и т.д.).

2. Размножение генетически модифицированных трансгенных животных-биореакторов, которые производили бы ценные биологически активные вещества.

В основе искусственного клонирования животных лежит технология переноса ядер соматических клеток (рисунок 30). Процесс начинается с оплодотворенной яйцеклетки и соматической клетки, взятых от разных организмов. Ядро оплодотворенной яйцеклетки удаляется и заменяется ядром соматической клетки. Новая яйцеклетка с ядром соматической клетки развивается в эмбрион, который имплантируется в реципиентную женскую особь (суррогатная мать). Из нее развивается организм, идентичный организму, из которого была получена соматическая клетка.

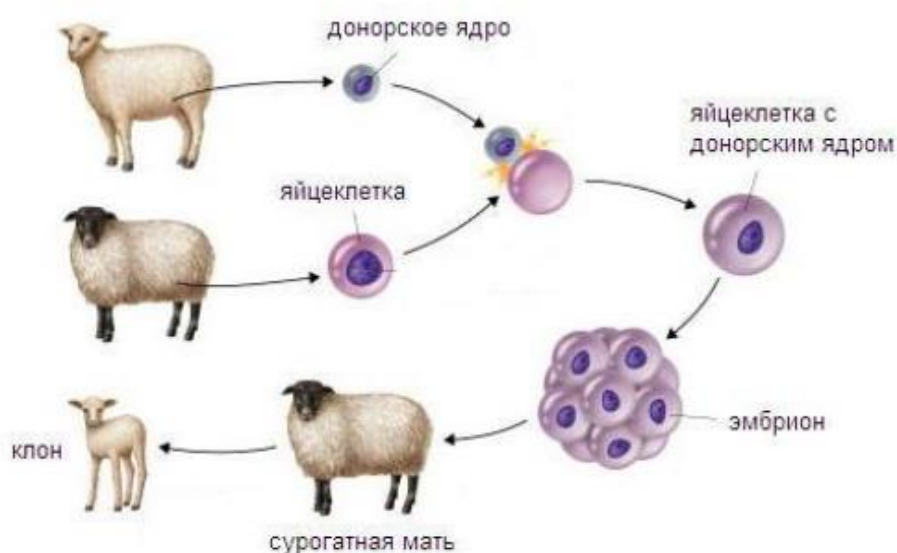


Рисунок 30 – Технология переноса ядер соматических клеток

В 1996 г. в лаборатории Яна Вильмута Рослинского института (Эдинбург, Шотландия) в результате разработки эффективного метода клонирования млекопитающих было получена овечка Долли (рисунок 31).

Ооциты (яйцеклетки) извлекали из овец породы Шотландская черномордая, помещали в искусственную питательную среду с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки при температуре 37°C и проводили операцию энуклеации (удаления ядра). Собственное ядро ооцита было заменено на ядро клетки из культуры эпителиальных клеток молочной железы взрослой лактирующей овцы породы финский Дорсет. Развивающийся зародыш культивировали в течение 6 дней в искусственной химической среде, на стадии бластоцисты эмбрионы трансплантировали в матку приемной матери, где они могли развиваться до рождения. Из 277 реконструированных эмбрионов успех сопутствовал лишь одному, в результате которого и родилась овечка Долли, содержащая генетический материал взрослой овцы, умершей три года назад. Была доказана возможность клонирования теплокровных животных, включая уже вымерших, если от них остался необходимый генетический материал. Долли родила шестерых ягнят. Её первый ягненок, Бонни, родился в апреле 1998 года. В следующем году родились ягнята Салли и Розы. А затем Долли родила тройню — Люси, Дарси и Коттон. К осени 2001 года у Долли был обнаружен артрит, ей стало трудно ходить. Но заболевание успешно лечили противовоспалительным препаратом. 14 февраля 2003 на седьмом году её жизни Долли пришлось усыпить. Причиной послужили прогрессирующее заболевание лёгких и тяжёлый артрит. 9 апреля 2003 года чучело Долли было выставлено в Королевском музее Шотландии. А первые клонированные овцы, которым был введён человеческий ген, были названы похожими на неё именами — Полли и Молли.

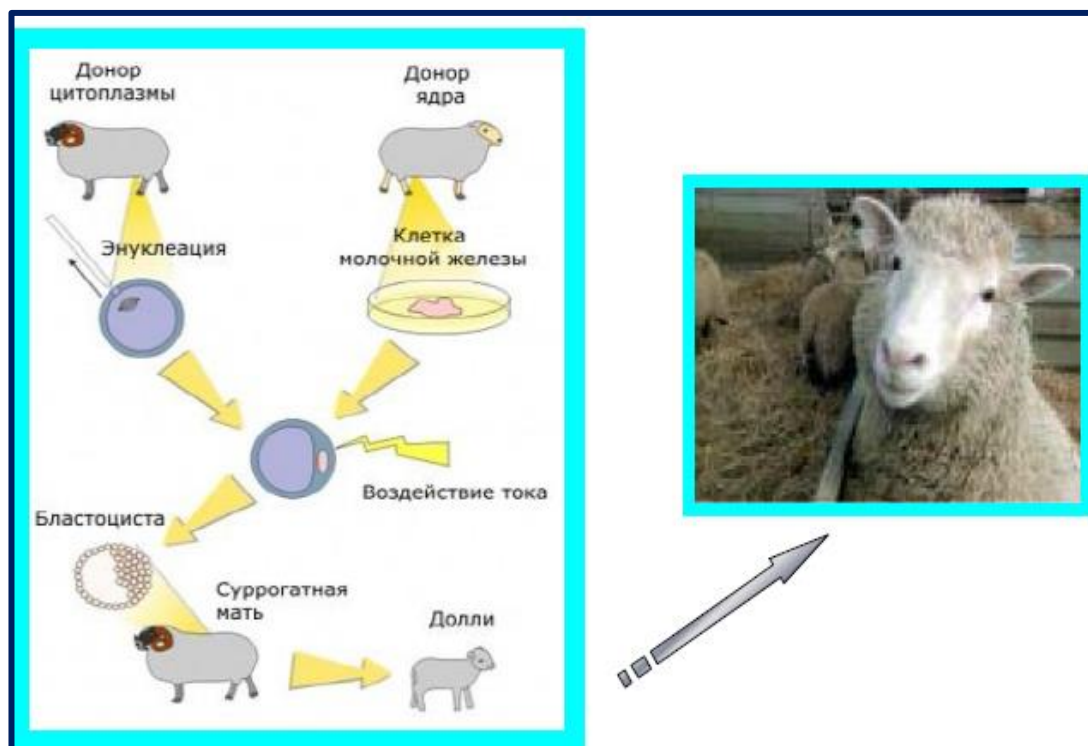


Рисунок 31 – Клонирование овечки Долли

В дальнейшем британскими и другими учёными были проведены эксперименты по клонированию различных млекопитающих, включая лошадей, быков, кошек, собак. В них также использовалась технология замещения ядер ооцита ядрами соматических клеток, взятых у живых взрослых теплокровных животных. Также проводились эксперименты по той же технологии с клонированием замороженных мёртвых животных.

## 6.2 Получение химерных животных

Сущность метода получения химер заключается в искусственном объединении эмбриональных клеток двух и более животных. Животные могут быть как одной породы, так и разных пород и даже разных видов. Химерные животные, обладая признаками животных разных генотипов, используются для решения проблем генетики, эмбриологии, в биомедицинских исследованиях, а также могут представлять интерес для практики животноводства.

Для получения химерных животных используют агрегационный метод либо инъекционный метод.

Агрегационный метод был предложен в 1961-1962 гг. По данному методу используют зародыши разных животных, достигшие стадии 8 бластомеров (рисунок 32). Помещают их в условия, способствующие агрегации и образованию 16-ти клеточного зародыша. Составные (химерные) зародыши развиваются *in vitro* до стадии бластоцисты, после чего их имплантируют в матку приемной матери, где они продолжают развиваться. Преимущество метода – не требует вмешательства микрохирургической техники, поэтому широко используется в эмбриогенетике.

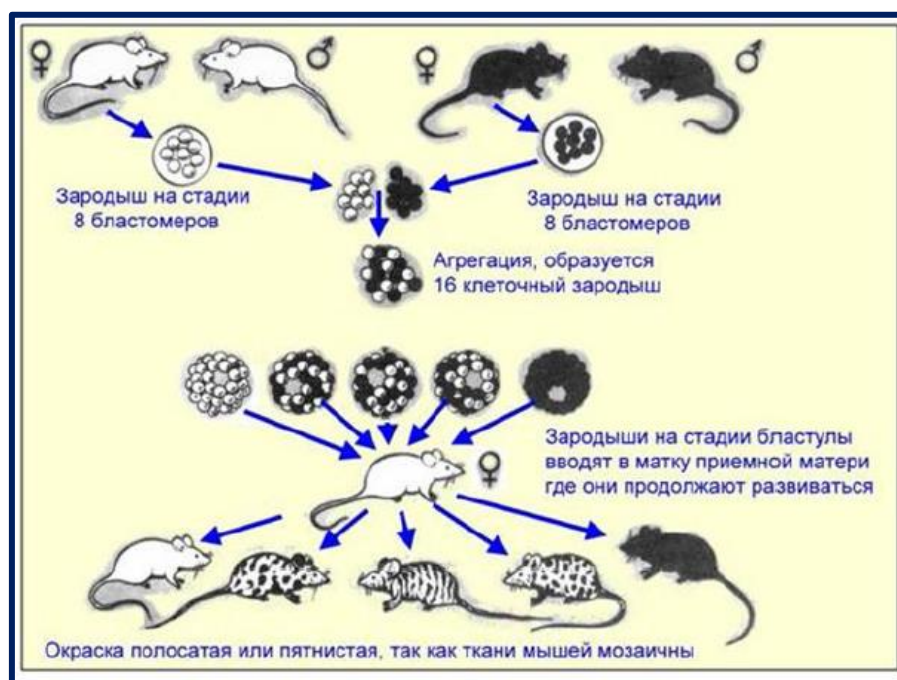


Рисунок 32 – Получение аллофенных мышей



Инъекционный метод был предложен в 1968 г. В данном варианте используются эмбрионы на стадии бластоцисты. С помощью микроманипулятора путем инъекции вводят клетки донора в бластоцель эмбриона-реципиента. Метод нашел применение при получении межвидовых химер, например овцекоз. Половым путем овцы и козы не скрещиваются, так как имеют разный набор хромосом: коза  $2n = 60$ , овца  $2n = 54$ . В 1984 году были получены межвидовые химеры между овцой и козой - овцекозы, причем практически одновременно в Англии и ФРГ.

Химерные животные не передают потомкам генетическую мозаичность. У них происходит расщепление, как у гетерозигот, поэтому ценные генетические комбинации нарушаются.

### 6.3 Получение трансгенных животных

В отличие от растений, где существует возможность получения целого фертильного растения из одной трансформированной соматической клетки и вегетативное размножение, получение трансгенных животных – очень сложный и длительный процесс.

Этапы технологии получения трансгенных животных:

1. Клонированный ген вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки.
2. Оплодотворенные яйцеклетки с экзогенной ДНК имплантируют в реципиентную женскую особь (поскольку успешное завершение развития эмбриона млекопитающих в иных условиях невозможно).
3. Отбирают потомков, развившихся из имплантированных яйцеклеток, которые содержат клонированный ген во всех клетках.
4. Скрещивают животных, которые несут клонированный ген и получают новую генетическую линию.

Некоторые методы получения трансгенных животных – метод микроинъекции (введение ДНК в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки) (рисунок 33);

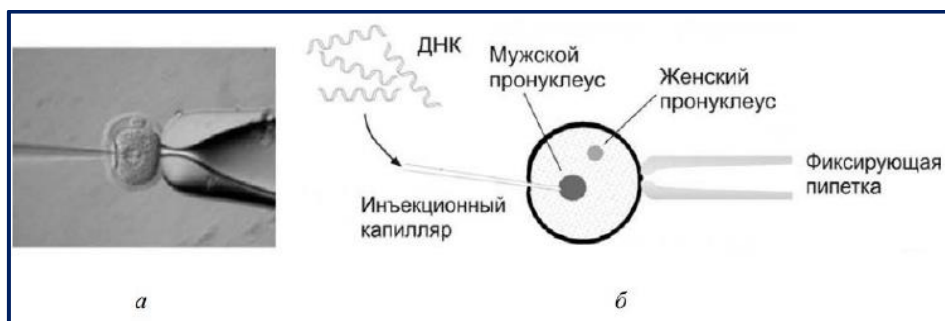
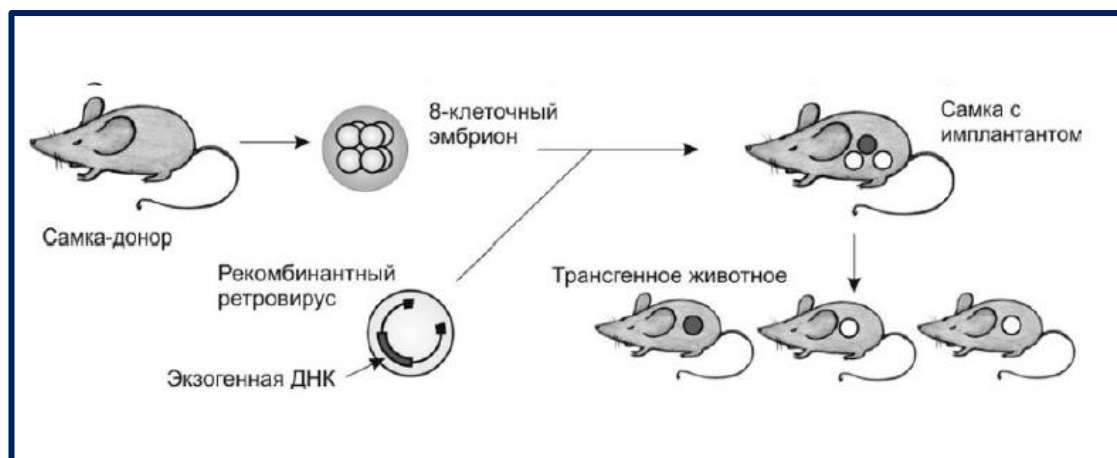


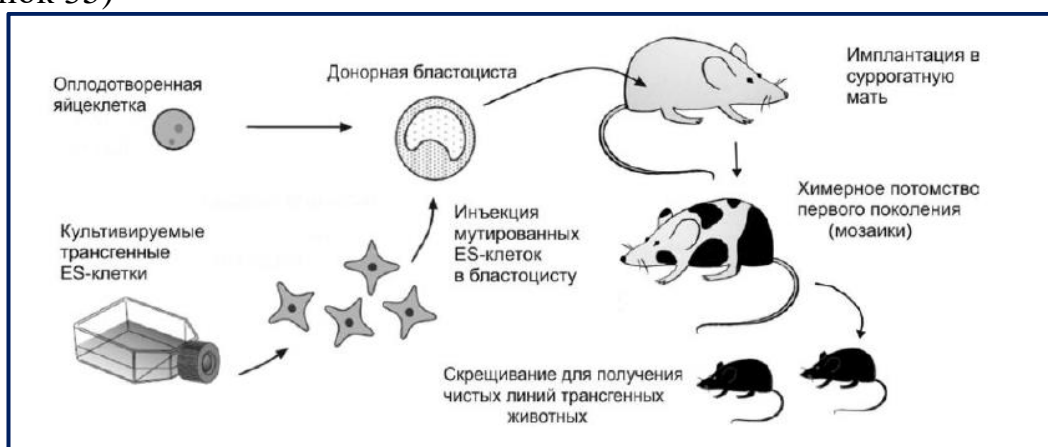
Рисунок 33 – Введение ДНК в яйцеклетки  
 а) Микроинъекция экзогенной ДНК в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки  
 б) схема эксперимента

– перенос генов с помощью вирусов (рисунок 34);



*Рисунок 34 – Введение ДНК с помощью векторов на основе вирусов  
Схема получения линии трансгенных мышей с использованием ретровирусных векторов*

– использование модифицированных эмбриональных стволовых клеток (рисунок 35)



*Рисунок 35 – Введение ДНК в стволовые клетки  
Получение трансгенных мышей методом реконструкции эмбрионов с помощью генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток (ES - клеток). ES – клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши.*

Направления создания трансгенных животных

1. Трансгенные животные как источники для производства фармацевтических препаратов

Фармацевтические препараты, получаемые из культур животных клеток, зачастую имеют высокую стоимость. Один из путей преодоления

этой проблемы – получение трансгенных животных, несущих человеческие гены.

«Фарминг» (pharming) - процесс получения из молока трансгенных домашних животных белков человека или фармацевтических препаратов. Действительно самая мощная белоксинтезирующая система находится в клетках молочной железы. Первый фармацевтический препарат из молока трансгенных животных (коза) - антитромбин III. В 2006 г. зарегистрирован как лекарство в Европейском союзе.

При реализации проекта «БелРосТрансген» получены трансгенные козы, в молоке которых есть человеческий белок лактоферрин. Этот белок содержится в грудном молоке и обеспечивает младенцам защиту от инфекций.

Получены трансгенные бычки, продуцирующие антитела человека в своей крови для уничтожения раковых клеток. Получены трансгенные куры, которые продуцируют антитела против меланомы (рака кожи) в яичном белке; производят человеческий интерферон.

## 2. Трансгенные животные, служащие источником пищи

В геном свиней перенесены гены, ускоряющие рост животных. Получен трансгенный лосось со встроенным геном гормона роста. Получены трансгенные коровы с повышенным содержанием казеина в молоке (важно для сыроваренного производства). Ведутся работы по получению трансгенных коров с минимальным содержанием лактозы в молоке (безлактозное молоко).

## 3. Трансгенные животные как источники трансплантантов для человека

В данном направлении осуществляется выведение генетически модифицированных свиней, органы которых могут использоваться для трансплантации. Задачи:

- 1) преодоление иммунологических барьеров (гистосовместимость);
- 2) недопущение переноса патогенов от донорного животного к человеку;
- 3) анатомическая и физиологическая совместимость донорного органа с человеческим.

## 4. Модельные системы для изучения болезней человека

В настоящее время на мышах смоделированы такие заболевания человека, как СПИД, болезнь Альцгеймера, артрит, мышечная дистрофия, гипертония, образование опухолей, нейродегенеративные нарушения, дисфункция эндокринной системы, сердечно-сосудистые заболевания и многие другие. Получена дрозофила с болезнью Паркинсона

## 5. Трансгенные домашние любимцы

Декоративные рыбки – пример успешной коммерциализации трансгенных животных. Под торговой маркой GloFish в США продаются разноцветные рыбки-зебры *Danio rerio*, окрашенные флуоресцентными белками кораллов. При соответствующем освещении красные, зеленые и желтые рыбки начинают ярко флуоресцировать, хотя природная окраска *D. rerio* скромного серого цвета. При наличии в воде определенных токсических

веществ светящиеся данио меняют окраску, становясь, таким образом, живым индикатором загрязнений.

**Контрольные вопросы:**

1. Клеточная инженерия и использование ее методов в создании микроорганизмов и клеток растений - новых продуцентов биологически активных (лекарственных) веществ.
2. Методы клеточной инженерии применительно к животным клеткам. Гибридомы. Значение гибридом для производства современных диагностических препаратов.
3. Генетическая инженерия и создание с помощью ее методов продуцентов новых лекарственных веществ. Основные принципы технологии рекомбинантной ДНК.
4. Понятие вектора в генетической инженерии. Векторные молекулы на основе плазмидной и фаговой ДНК. Химический синтез фрагментов ДНК. Методы секвенирования (определения последовательности нуклеотидов). Химический синтез гена.
5. Ферменты, используемые в генетической инженерии. Рестриктазы. Классификация и специфичность. Формирование "липких концов". Рестриктаза *E.coli* R1 и распознаваемая ею последовательность нуклеотидов. Лигаза и механизм их действия.
6. Генетические маркеры. Методы идентификации и изоляции клонов с рекомбинантной ДНК.
7. Проблемы экспрессии чужеродных генов в микроорганизмах. Гены животной клетки; экзоны, нитроны. Обеспечение возможности экспрессии генов млекопитающих в микробной клетке. Обратная транскриптаза.
8. Способы преодоления барьеров на пути экспрессии чужеродных генов. Стабилизация чужеродных белков (целевых продуктов) в клетке. Генетические методы, обеспечивающие выделение чужеродных белков в среду.
9. Кто в своих опытах продемонстрировал, что клетки бластулы недетерминированы?
10. Кто и когда добился большего успеха в клонировании эмбрионов амфибий?
11. Кто показал, что соматические клетки могут сливаться с оплодотворенными и неоплодотворенными мышинными яйцеклетками и развиваться в условиях *in vitro* до стадии морулы?
12. Как называется полностью энуклеированная зигота?
13. Почему обработка кариопластов, подсаживаемых под *zona pellucida*, вирусом Сендай оказалась менее эффективной?

## Глоссарий

**Ауксин** – специфический фактор роста растительной клетки и регулятор синтеза вторичных метаболитов растений – производных индолилуксусной кислоты (индолил-3-уксусная кислота, нафтилуксусная кислота и др.).

**Ауксотрофы** — это биохимические мутанты клеток, которые вследствие мутации утратили способность расти на обычной питательной среде и требуют добавления какого-либо вещества, синтез которого у них блокирован мутацией.

**Барда** - отход производства спирта

**Биомасса** — общая масса особей одного вида, группы видов или сообщества в целом на единицу поверхности или объема местообитания.

**Биореактор** - закрытая или открытая емкость, в которой при определенных условиях протекает на клеточном уровне контролируемая реакция, осуществляемая с помощью микроорганизмов

**Биотехнология** – это отрасль науки и производства, использующая биологические системы и процессы для производства экономически важных веществ и продуктов.

**Биотрансформация** – процесс превращения веществ с помощью микроорганизмов или ферментов в определенные продукты с ценными практическими свойствами.

**Вторичный метаболит** – вещество, не являющееся обязательным для роста или функционирования клетки, но синтезирующееся в стационарной фазе (обычно участвует в защите клеток или микроорганизмов от воздействий). **Гаплоиды** — организмы, соматические клетки которых содержат одинарный набор хромосом ( $n$ ), то есть половину полного набора ( $2n$ ), свойственного виду.

**Вектор** - молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК любого происхождения и обеспечить там ее размножение

**Генотип** – совокупность всех локализованных в хромосомах генов организма, его наследственная материальная основа.

**ДНК-лигаза** - фермент «сшивающий» участки молекулы ДНК

**Дедифференциация** – переход специализированных, неделящихся клеток к пролиферации.

**Дифференциация** – комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими клетками.

**Закрытая проточная система** - суспензионная культура непрерывно снабжается свежей средой, приток которой сбалансирован оттоком равного количества использованной среды.

**Изолированный протопласт** - растительная клетка, лишённая клеточной стенки с помощью ферментов или механическим способом.

**Инокулюм** – часть суспензионной культуры, используемая для пересадки на свежую среду.

**Иммобилизация-** (создание неподвижности) клеток обеспечивает условия, приводящие к дифференциации, и способствует увеличению выхода вторичных веществ. Метод иммобилизации позволяет клеткам расти в тесном физическом контакте друг с другом.

**Инокулюм** — это часть суспензионной культуры, используемая для пересадки на свежую среду.

**in vitro** (от лат. - «в стекле», «в склянке») используется для описания условий протекания процессов в стерильной искусственной окружающей среде.

**in vivo** – (от лат. «на живом») применяют по отношению к естественным нестерильным условиям протекания процессов жизнедеятельности в организме.

**Иммобилизация** - перевод ферментов в нерастворимое состояние

**Каллус** – это особый тип ткани, возникший путем неорганизованной пролиферации (деления) клеток или органов растений.

**Кариотип** – набор хромосом, характерный для данного вида.

**Компетенция** — способность клетки воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития.

**Клеточная инженерия** — это метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции.

**Клеточная селекция** – метод выделения мутантных клеток и соматоклональных вариантов с помощью селективных условий (например, NaCl, нитрозоэтилмочевина, ультрафиолетовое облучение и т.п.).

**Клеточная линия** – популяция клеток, поддерживаемая в культуре путем пересева.

**Клон** – генетически однородное потомство одной клетки.

**Клональное микроразмножение** – получение *in vitro* неполным путем растений, генетически идентичных исходному.

**Клеточная реконструкция** — это создание жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток (ядра, цитоплазмы, митохондрий, хлоропластов, хромосом).

**Каллусные клоны** - соматоклональные варианты, возникающие из каллусов.

**Клеточные линии** — это потомство от нескольких клеток, например, составляющих один агрегат в суспензионной культуре.

**Культура зародышей** – стерильное выращивание на питательной среде незрелых или зрелых зародышей.

**Культура каллусных тканей** – выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации (деления) клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов растений (пыльники, семязачатки, мезофилл листа, кусочки стебля и т.п.).

**Культура клеток растений** – называется выращивание клеток, тканей и органов растений на искусственной питательной среде в асептических (стерильных) условиях.

**Культура меристем побегов** – асептическое выращивание на питательной среде изолированных апексов или пазушных почек побегов конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями.

**Клонирование-** размножение в бактериальной клетке рекомбинантной молекулы ДНК

**Криоконсервация** - глубокое замораживание клеток

**Лаг-фаза** - Медленный рост культуры

**Линия** – культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования и имеющая маркерные признаки.

**Лиофильное высушивание-** обезвоживание после замораживания

**Липкий конец** — свободный одноцепочечный конец двухцепочечной ДНК, комплементарной одноцепочечному концу, принадлежащему этой же или другой молекуле ДНК.

**Меласса** - Отход производства сахара

**Меристема** – образовательная ткань с активно делящимися клетками.

**Модификация продукта** - Перестройка полученных соединений животного, растительного или микробного происхождения с целью придания им специфических свойств.

**Мутация** – изменение в генетическом материале клеток путем перестройки ДНК ядер и органелл, в результате изменения структуры хромосом или путем полиплоидизации.

**Открытая проточная система** - обеспечивает баланс между притоком свежей питательной среды и удалением равного объема клеточной суспензии. Скорость удаления части клеток из системы должна соответствовать скорости образования новых клеток в результате деления, это создает равновесное состояние между ростом клеток (постоянством скорости клеточного деления) и биосинтезом (постоянством состава и метаболической активности).

**Органогенез** – процесс возникновения *in vitro* в неорганизованной растущей массе зачатков органов (корней и побегов).

**Плаزمид** - Добавочные кольца молекулы ДНК бактерий

**Рестриктаза** - Фермент разрезающий молекулу ДНК

**Реципиент** - Клетка, в которую переносят чужеродный ген

**Популяция клеток** – совокупность культивируемых клеток.

**Пролиферация** – новообразования клеток и тканей путем размножения.

**Протопласт** – микробная или растительная клетка, лишенная клеточной стенки. Оболочку составляет только цитоплазматическая мембрана. Протопласты стабильны только в гипертонической среде (например, в 20% сахарозе).

**Прямая селекция** - отбор устойчивых клеток, выживающих на среде с селективным фактором.

**Пролиферация** — это новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.

**При полупроточном режиме** выращивания - определенная часть суспензии время от времени отбирается и оставшаяся часть разбавляется свежей средой.

**Растение-регенерант** – растение, сформировавшееся в результате морфогенеза в культуре изолированных клеток и тканей растений.

**Ростовой цикл** – рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризуется S-образной кривой. Фазы ростового цикла: латентная, экспотенциальная, замедления роста, стационарная, деградации.

**Слияние протопластов** – формирование одной клетки из двух и более путем объединения поверхностных мембран.

**Соматическая (парасексуальная) гибридизация** - процесс слияния протопластов соматических клеток, приводящий к появлению гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений.

**Субкультивирование** – перенос инокулюма (транспланта) в другой культуральный сосуд на свежую среду.

**Суспензионная культура** – выращивание отдельных клеток или небольших групп клеток во взвешенном состоянии в жидкой питательной среде при постоянном перемешивании.

**Тотипотентность** – свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свою наследственную программу онтогенетического развития при определенных условиях выращивания вплоть до образования взрослых растений и семян;

**Трансгенез** – перенос различными способами чужих генов в клетки растения.

**Трансплант (трансплантат)** – часть каллусной культуры, используемая для пересадки на свежую среду; исходный трансплант – первично культивируемая ткань растения.

**Фитогормоны** - регуляторы роста растений;

**Цикл выращивания** – период от помещения инокулюма или транспланта в свежую среду до последующего субкультивирования.

**Цитопласт** – ограниченный мембраной участок цитоплазмы, возникший при фрагментации изолированного протопласта.

**Цитопласт** - безъядерный субпротопласт, в которое не попало ядро.

**Штамм** – культура, возникшая после первого субкультивирования. Состоит из многих клеточных линий, которые произошли из клеток первичной культуры.



## Использованные источники

1. Акимбаева А.М., Сартбаев М.М. / Состояние и перспективы развития биотехнологии Казахстана // Вклад молодых исследователей в индустриально-инновационное развитие Казахстана. – 2009. -№2
2. Пищевая биотехнология / Л. А. Иванова. - М. : КолосС. - 2008
3. Биотехнология животных / Г. А. Джамалова. - Алматы: Агентство Маматай, 2004. - 304 с.
4. Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: электрон.учеб. пособие / Т. Г. Волова. – Электрон. дан. (2 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2008.
5. Прикладная биотехнология / Л. В. Антипова, И. А. Глотова, А. И. Жаринов. - СПб. : ГИОРД, 2003. – 284 с.
6. Биотехнология / И. В. Тихонов [и др.]; ред. Е. А. Воронин. - СПб. : ГИОРД, 2005. - 792 с.
7. Основы биотехнологии / К. Х. Алмагамбетов. - Астана : [б. и.], 2006. - 200 с.
8. Современные методы в биотехнологии / С. С. Кенжебаева. - Алматы: Бастау, 2013. - 272 с.
9. Словарь по биотехнологии / Симонян А.В., Покровская Ю.С. – Волгоград. – 2002.
10. Тимофеева О.А., Румянцева Н.И. / Культура клеток и тканей растений. – Казань. – 2012. – с.91
11. Воронин Е. С. Биотехнология. Лань, 2005. – 748 с.
12. Основы биотехнологии/ Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. - 3-е изд., стер. - М. : Академия, 2006. - 208 с.
13. Биотехнология / А. П. Андреева. - Караганда: КарГУ им. Е.А. Букетова, 2004.
14. Биотехнология / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева ; ред. А. В. Катлинский. - 3-е изд., стер. - М. : Академия, 2008. - 255 с.
15. Блинов В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. Ч.П.ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов. – 2004. – 144 с.
16. Блажевич О.В. Культивирование клеток: Курс лекций-Мн.:БГУ,2004.-78с.
17. Ильин Д.Ю. Основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции: учебное пособие – Пенза: РИО ПГСХА, 2016.-115 с.: ил.
18. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию. Курс лекций.- Минск. БГУ. – 2002. – 104 с.